

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA
**ESTUDIO DE LA RELOCALIZACIÓN SUBNUCLEAR DE
LA ENZIMA TDP1 EN RESPUESTA AL VENENO DE
TOPOISOMERASA II, ETOPÓSIDO, EN CÉLULAS HUMANAS.**

López Schneider, Florencia – LU1068129

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

de Campos Nebel, Idelfonso Marcelo, Academia Nacional de Medicina

Co-Tutor:

Cardozo, Julián, Universidad Argentina de la Empresa

Colaborador/es:

Gosso, María Camila, Academia Nacional de Medicina

Aznar, Nestor, Academia Nacional de Medicina

2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

RESUMEN

Los venenos de la Topoisomerasa II (Top2) son usados con frecuencia en el tratamiento de distintas clases de tumores sólidos y hematológicos. Entre los venenos más utilizados se encuentran varias antraciclínicas y epipodofilotoxinas, entre estas últimas el Etopósido (ETO). Su mecanismo de acción involucra la estabilización de aductos proteicos de Top2 en el ADN (complejos de clivaje de Top2), los cuales conducen a la formación de rupturas de doble cadena (DSBs, por sus siglas en inglés) que persisten en el genoma. Las células presentan mecanismos especializados para detectar el daño ocasionado por estos agentes, y además diversos mecanismos de reparación para restaurar el producto de las lesiones genómicas generadas de manera satisfactoria.

Uno de los efectos adversos que tienen las drogas mencionadas, se relaciona a la inducción de neoplasias secundarias, principalmente leucemia mieloide aguda relacionada al tratamiento (t-AML), que se caracteriza por la aparición de rearrreglos cromosómicos que involucran al gen MLL, localizado en el cromosoma 11q23.

El hecho de que el tratamiento para la cura de una determinada enfermedad sea causante de otra, convierte en una prioridad investigar los mecanismos que hay detrás de la señalización y localización del daño, y de los distintos mecanismos de reparación que intervienen para subsanar las rupturas de doble cadena generados por estos aductos proteicos. A medida que se obtengan avances en el conocimiento básico de estos fenómenos subyacentes, se podrán formular nuevas terapias, o terapias más específicas contra las células tumorales, que minimicen los efectos genotóxicos y citotóxicos colaterales sobre el tejido normal. (*de Campos Nebel et al., 2017; M. de Campos-Nebel et al., 2016; M. I. de Campos-Nebel et al., 2016*).

El presente PFI tratará de determinar si la localización de TDP1 (Tirosil-ADN-fosfodiesterasa 1), proteína capaz de hidrolizar aductos proteicos del ADN, está compartimentalizada sobre determinadas regiones genómicas en respuesta al agente quimioterapéutico ETO, lo cual nos permitirá avanzar en el conocimiento de cómo estas estructuras covalentes ADN-Top2 son removidas durante el proceso de reparación del ADN.

ABSTRACT

Topoisomerase II (Top2) poisons are frequently used in the treatment of different classes of solid and hematological tumors. The most widely used Top2 poison includes various anthracyclines and epipodophyllotoxins, among the latter Etoposide (ETO). Its mechanism of action involves the stabilization of Top2 protein adducts in DNA (Top2 cleavage complexes), which lead to the formation of double-stranded breaks (DSBs) that persist in the genome. The cells coordinate specialized mechanisms to detect damage caused by these agents, as well as various repair mechanisms to successfully restore the genomic lesions.

A side effect of Top2 poisons is related to the induction of secondary neoplasms, mainly treatment-related acute myeloid leukemia (t-AML), which is characterized by the appearance of chromosomal rearrangements involving the MLL gene, located in chromosome 11q23.

The fact that treatments for any disease might cause other one, makes relevant to investigate the mechanisms behind the signaling and localization of the damage, and the different repair systems involved in the restoration of genome integrity. As advances are made in the basic understanding of the underlying mechanisms, new or more specific therapies against tumor cells may be formulated to minimize genotoxic and cytotoxic collateral effects on normal tissues. (de Campos Nebel et al., 2017; M. de Campos-Nebel et al., 2016; M. I. de Campos-Nebel et al., 2016)

This PFI was aimed to determine whether the localization of TDP1 (Tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1), a protein capable of hydrolyzing DNA-protein adducts, is compartmentalized to certain genomic regions in response to ETO. This will allow us to advance in the knowledge of how these DNA-Top2 covalent structures are removed from the genome as an initial step in the repair process of ETO-induced DSBs.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
MARCO TEÓRICO	6
Heterocromatina y eucromatina	6
Topología del ADN	8
Topoisomerasas	9
Topoisomerasas de tipo I:	11
Topoisomerasa de tipo II:	11
La interacción topoisomerasa-cromatina:	16
Topoisomerasas como blanco de acción en el tratamiento contra el cáncer:	18
Topoisomerasa II y leucemia:	19
Mecanismos de reparación y respuesta al daño inducido por topoisomerasas de tipo II:	21
Tirosil-ADN-fosfodiesterasa 1 (TDP1)	23
Sustratos	23
Estructura de TDP1	24
Mecanismo catalítico.....	26
Regulación de TDP1, modificaciones postraduccionales y asociación con vías de reparación: ...	27
Tirosil-ADN Fosfodiesterasa 2 (TDP2)	28
Sustratos	28
Estructura de TDP2	29
Mecanismo catalítico DE TDP2.....	29
Regulación de TDP2 y vías de reparación asociadas	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Inmunomarcación para colocalización de proteínas por microscopía confocal	31
Inmunomarcación:.....	31

Análisis de Imágenes.....	32
ChIP-qPCR:.....	33
Lisis celular y cross-linking:	33
Recuento de células en cámara de Neubauer:	33
Fragmentación de la cromatina	34
Inmunoprecipitación.....	34
Elución de complejos proteína/ADN y reversión de cross-links	35
Extracción de ADN con Fenol:IAC	35
Gel de agarosa:	36
Procesamiento de las imágenes:	36
q-PCR	36
RESULTADOS.....	38
Asociación de TDP1 a compartimentos nucleares eucromáticos en respuesta a ETO	38
Asociación de TDP1 a compartimentos heterocromáticos en respuesta a ETO.....	47
CONCLUSIONES.....	53
DISCUSIÓN.....	54
ANEXO DE RESULTADOS.....	60
Inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP).....	60
Puesta a punto de la sonicación de muestras	61
Prueba del n° de ciclos para la obtención de fragmentos del tamaño deseado:	61
Prueba de diferencias en el scraping y confirmación de 6 ciclos como la cantidad de ciclos óptimo:.....	63
REFERENCIAS	66

MARCO TEÓRICO

HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA

El ADN en el núcleo existe en dos formas que reflejan el nivel de actividad de la célula, la eucromatina y la heterocromatina. La heterocromatina aparece como pequeñas partículas irregulares, de tinción pignótica, esparcidas por todo el núcleo o acumuladas junto a la envoltura nuclear o en los alrededores del nucléolo. El nucléolo es una estructura más o menos redondeada y con menor contenido de ADN, en la que se encuentra una porción de la cromatina relacionada con la transcripción del ARN ribosomal y donde se produce el ensamblaje de los ribosomas. La heterocromatina se divide en heterocromatina facultativa, que pasa de eucromatina a heterocromatina, y en heterocromatina constitutiva, la cual se mantiene condensada y corresponde entre el 10-30 % de la cromatina total del núcleo. Aunque existen regiones de la heterocromatina constitutiva que se transcriben, aquí se localizan genes que normalmente no se expresan (*Alberts et al., 2015*). Por su parte, la eucromatina prevalece en las células transcripcionalmente activas, mientras que la heterocromatina es más abundante en células menos activas o inactivas (*van Steensel & Furlong, 2019*).

La heterocromatina comprende regiones de los cromosomas eucariotas que involucran dominios genómicos con propiedades funcionales específicas. La capacidad de la heterocromatina para restringir la actividad de los elementos móviles, aislar la reparación del ADN en regiones repetitivas y asegurar una segregación cromosómica precisa es crucial para mantener la estabilidad genómica. Las diferentes variedades de heterocromatina se distinguen por su combinación de modificaciones postraduccionales de histonas (PTM). Estas modificaciones afectan el reclutamiento de proteínas y el plegamiento de la cromatina. Las secuencias encontradas en heterocromatina a menudo contienen elementos repetitivos, como secuencias α -satélite y elementos transponibles. Los nucleosomas en las regiones de heterocromatina facultativa muestran PTM de histonas que contribuyen a la regulación del desarrollo al restringir la expresión génica específica de linaje (*Allshire & Madhani, 2018*).

Las PTM de histonas regulan la factibilidad de que el ADN esté sujeto a transcripción, replicación, reparación y recombinación. Existen PTM específicas que controlan la unión de proteínas a los nucleosomas a través de dominios proteicos particulares. Estos dominios pueden unirse a otros que modifican la cromatina, o pueden ser parte de complejos que contienen/reclutan modificadores de cromatina, que modifican histonas mediante la adición o la eliminación de PTM. Otras enzimas reclutadas por las PTM de histonas son los remodeladores de la cromatina, que alteran los contactos entre el octámero de histonas y el ADN para una variedad de funciones. Las PTM mejor estudiadas en la heterocromatina se asocian a la adición de uno (me1), dos (me2) o tres (me3) grupos metilo a la lisina 9 o 27 de histona H3 (H3K9me, H3K27me) (*Allshire & Madhani, 2018*).

La proteína HP1 α es un componente de la heterocromatina, que reconoce y se une a las colas de H3K9me, lo que conduce a la represión epigenética. Esta se excluye de la cromatina cuando se fosforila H3Y41p. También puede interactuar con el receptor de laminina-B (LBR), contribuyendo a la asociación de la heterocromatina con la membrana nuclear interna. También está involucrada en la formación del cinetocoro funcional, por la interacción con proteínas del complejo MIS12. Por lo tanto, HP1 α es un buen marcador de heterocromatina constitutiva (*Allshire & Madhani, 2018*).

Los centrómeros son los loci cromosómicos donde se ensamblan los cinetocoros. Los centrómeros eucariotas están compuestos por secuencias repetitivas de ADN; la mayoría de estas repeticiones están embebidas en heterocromatina en forma dependiente de H3K9me, y su ADN está fuertemente metilado en células somáticas de mamíferos. Los nucleosomas del centrómero, suelen reemplazar a H3 por una variante, la proteína centromérica A (CENP-A), formando la base física del cinetocoro (*Allshire & Madhani, 2018*).

La heterocromatina tiene dos funciones importantes en el centrómero y el cinetocoro. Primero, ella influye en el ensamblaje de CENP-A en los nucleosomas. Las PTMs dirigidas por heterocromatización y/o la asociación entre el núcleo y la periferia pueden promover la incorporación de CENP-A. La heterocromatina también limita el tamaño del dominio CENP-A-cinetocoro. Un segundo rol de la heterocromatina en los centrómeros implica la cohesión de las

cromátidas hermanas mediada por cohesinas. En metafase, las cromátidas hermanas permanecen asociadas a través de la cohesión solo en sus centrómeros. Esto se debe a que la cohesión centromérica, está protegida de la degradación hasta la anafase. Se requiere heterocromatina centromérica para mediar la cohesión física de los centrómeros hermanos atrapando altos niveles de cohesina centromérica (*Allshire & Madhani, 2018*).

Las regiones eucromáticas están densamente pobladas por genes activos y elementos enhancers; y típicamente están marcadas por una multitud de PTM de histonas tales como metilación de H3K4 y acetilación de varios residuos lisina de histonas. La eucromatina se localiza generalmente en el interior nuclear, aunque también puede interactuar con los poros nucleares. (*van Steensel & Furlong, 2019*).

TOPOLOGÍA DEL ADN:

El ADN es una molécula extensa en comparación con su diámetro, y para que esta pueda ser replicada, la doble hebra debe ser separada. Esto significa que las hebras deben rotar por delante de la horquilla de replicación. Este sobregiro, involucra la generación de superenrollamientos positivos de la doble hebra sobre sí misma, y la consecuente acumulación de fuerzas de torsión. Mientras que el superenrollamiento negativo promueve muchos procesos que lleva a cabo el ADN, tales como la transcripción, el superenrollamiento positivo los inhibe. Si no hubiera mecanismos capaces de aliviar estas tensiones, la doble hebra no podría separarse y por lo tanto no se llevarían a cabo procesos tan importantes como son los antes mencionados.

Este problema fue advertido por James Watson y Francis Crick en 1953 (*WATSON & CRICK, 1953*), luego de haber determinado la estructura del ADN. Tiempo después se logró dilucidar el mecanismo encargado de aliviar las tensiones generadas por el superenrollamiento. Este mecanismo es llevado a cabo por enzimas denominadas topoisomerasas. (*Bates & Maxwell, 2005*)

TOPOISOMERASAS:

Las topoisomerasas son enzimas cuya función es regular el estado topológico del material genético, haciendo posible la supervivencia de todos los organismos vivos. Estas enzimas ubicuas realizan una serie de funciones celulares críticas al generar roturas transitorias en la doble hélice de ADN. Durante este evento catalítico, las topoisomerasas mantienen la estabilidad genómica formando enlaces fosfotirosilo covalentes entre los residuos del sitio activo y los extremos de ADN recién generados. Las topoisomerasas son esenciales para la supervivencia celular. Sin embargo, debido a que escinden el material genético, estas enzimas también tienen el potencial de fragmentar el genoma. Esta última característica de las topoisomerasas es explotada por algunos de los fármacos contra el cáncer y antibacterianos más utilizados actualmente en la clínica (*Deweese et al., 2008*)

Como se observa en la Figura 1, las seis topoisomerasas humanas, Top1, Top1mt, Top2 α , Top2 β , Top3 α y Top3 β , tienen roles compartidos y especializados, aunque a grandes rasgos tienen un mecanismo de acción similar. Todas las topoisomerasas tienen residuos tirosilo en el sitio activo que inician la escisión del ADN por ataque nucleofílico al fosfato de la columna vertebral del ácido nucleico. Esta reacción de transesterificación da como resultado la formación de un enlace fosfotirosilo covalente que une la proteína con el extremo recién generado de la cadena de ADN. También se forma un grupo hidroxilo en el extremo opuesto de la hebra cortada. El enlace covalente que se origina entre la enzima y el ADN desempeña dos funciones importantes en el mecanismo de acción de la topoisomerasa. Primero, conserva la energía de enlace del esqueleto azúcar-fosfato del ADN. Segundo, debido a que no permite que la cadena de ADN escindida se disocie de la enzima, la unión proteína-ADN mantiene la integridad del material genético durante el evento de escisión (*Pommier et al., 2016*).

Tras la alteración de la topología del ADN mediante el paso de la/s hebra/s o la rotación controlada, la ligación del ADN se inicia mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo terminal al enlace fosfotirosilo. Esta acción regenera la integridad de la cadena de ADN, así como el sitio activo de la topoisomerasa. La estructura química del ADN ligado es idéntica a la del

sustrato original, solo las propiedades topológicas de la doble hélice son alteradas por las acciones de las topoisomerasas (*Pommier et al., 2016*).

Hay dos clases principales de topoisomerasas, tipo I y tipo II, que se distinguen por el número de cadenas de ADN que se escinden y el mecanismo por el cual alteran las propiedades topológicas del material genético (*Champoux, 2001*).

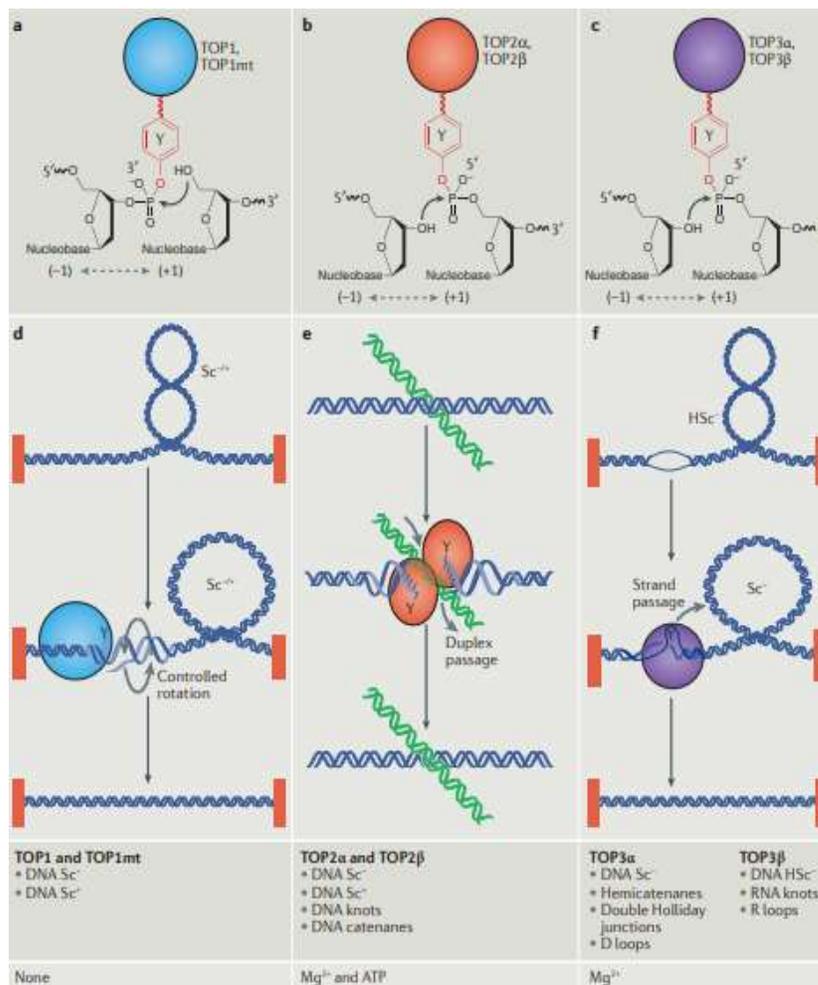


Figura 1: Topoisomerasas eucariotas: a-c) Las topoisomerasas actúan escindiendo el enlace fosfodiéster de la cadena de ADN y formando enlaces covalentes transitorios entre un residuo Tyr y el extremo de ADN 3' (a, enzimas Top1) o el extremo 5' (b y c, enzimas Top2 y Top3). El ligado de las roturas se lleva a cabo mediante un ataque nucleofílico del extremo 5'-hidroxilo (Top1) o del extremo 3'-hidroxilo (Top2 y Top3). d) Las enzimas Top1 alivian las tensiones generadas por

superenrollamientos negativos y positivos (Sc -/+) cortando una hebra y permitiendo una rotación controlada de la cadena cortada sobre la intacta. Las enzimas Top1 pueden volver a ligar extremos no homólogos. e) Las enzimas Top2 funcionan como homodímeros para relajar los Sc -/+ y resolver distintas topologías del ADN, explicando de esta manera su rol fundamental en la división celular. Cada monómero escinde una hebra del ADN a cuatro pares de bases de su sitio de unión, y dirige un segundo dúplex para que pase a través de la ruptura generada para luego volver a ligar el ADN concluido el pasaje. Las Top2 requieren tanto de Mg²⁺ como de la hidrólisis de ATP para su ciclo catalítico. f) Las enzimas Top3 relajan el superenrollamiento hipernegativo (HSc-) escindiendo una de las dos cadenas de ADN y pasando la cadena intacta a través de la escindida. Ellas necesitan de Mg²⁺ como cofactor. (Adaptado de (Pommier et al., 2016)).

TOPOISOMERASAS DE TIPO I:

Estas enzimas son de naturaleza monomérica y no requieren de cofactores para su funcionamiento. Hay dos subclases de enzimas de tipo I: tipo I α y tipo I β . Las topoisomerasas de tipo I actúan creando roturas transitorias de una sola hebra en la doble hélice, seguidas del paso de la hebra intacta opuesta a través de la ruptura (tipo I α) o mediante la rotación controlada de la hélice alrededor de la ruptura (tipo I β). Las enzimas tipo I α requieren iones metálicos divalentes para la actividad catalítica y se unen covalentemente al fosfato 5'-terminal del ADN. En contraste, las enzimas tipo I β no requieren iones metálicos divalentes y se unen covalentemente al fosfato 3'-terminal. Por lo tanto, las topoisomerasas de tipo I eliminan el estrés torsional de las moléculas superenrolladas cambiando el giro del ADN, pero no son capaces de desenrollar, desenredar o desanudar moléculas dúplex. Esta última acción requiere una enzima que pueda actuar sobre las deformaciones del ADN, es decir, que pase una doble hélice intacta, a diferencia de una única cadena de ADN, a través de otra (Bates & Maxwell, 2005; Marchand et al., 2002).

TOPOISOMERASA DE TIPO II:

En las células de los humanos se expresan dos isoformas de topoisomerasas tipo II, α y β . Estas isoformas comparten una identidad de secuencia de aminoácidos extensa (70%) pero están

codificadas por diferentes genes (ubicados en las bandas cromosómicas 17q21–22 y 3p24, respectivamente). Ambas isoformas generan homodímeros y muestran propiedades enzimológicas casi idénticas. A pesar de sus similitudes, la topoisomerasa II α (Top2 α) y II β (Top2 β) tienen patrones de expresión distintos y funciones nucleares específicas. (*McClendon & Osheroff, 2007; Nitiss, 2009a; Vávrová & Simunek, 2012*)

La Top2 α es esencial para la supervivencia de las células en proliferación y su expresión está vinculada al crecimiento celular, mientras que es casi inexistente en tejidos no proliferantes y diferenciados. Top2 α se asocia a las horquillas de replicación y permanece estrechamente unida a los cromosomas durante la mitosis. Por lo tanto, es una isoforma que presenta funcionalidad en los procesos celulares relacionados con el crecimiento y es necesaria para la segregación cromosómica. Por otra parte, la Top2 β es prescindible, aunque necesaria para el desarrollo neuronal adecuado en los mamíferos, y su presencia no puede compensar la pérdida de Top2 α en las células humanas. Además, la concentración de Top2 β es independiente del estado de proliferación, y se encuentran altos niveles de esta isoforma en la mayoría de los tipos celulares. Top2 β se disocia de los cromosomas durante la mitosis pero juega un papel importante en la transcripción de genes regulados hormonalmente y en el desarrollo. (*McClendon & Osheroff, 2007; Nitiss, 2009a; Vávrová & Simunek, 2012*)

Las topoisomerasas de tipo II requieren magnesio (Mg²⁺) y, además, necesitan la energía proveniente de la ruptura del enlace trifosfato del ATP para su actividad catalítica. Las enzimas topoisomerasas de tipo II de los eucariotas, se dividen en dos subfamilias α y β en base a su secuencia y estructura, pero ambas poseen dos dominios conservados, uno ATPasa y otro de unión al ADN. Dentro de la holoenzima, dos pares de dominios similares dimerizan y controlan el paso de ADN a través de la enzima (ver Figura 2A). En la Figura 2B se aprecia el mecanismo catalítico de la topoisomerasa II α . Esta comienza cuando un segmento de la doble hebra de ADN, denominado segmento G (*gate segment*), se une a dos elementos catalíticos: los dominios toprim y 5Y-CAP (*catabolite gene activator protein*). Un segundo segmento de ADN bicatenario, denominado el segmento T (*transfer segment*), es luego capturado por la dimerización de los dominios ATPasa inducida por ATP (*ATP gate*), que se componen de dos módulos funcionales

denominados el GHKL (girasa, proteína de choque térmico 90, histidina quinasa y MukL) y dominios transductores. La captura y dimerización conduce a la escisión y apertura del segmento G, y esto permite el pasaje del segmento T a través del espacio del segmento G, y por último este es religado. La liberación de ADP, seguida de la apertura de la “puerta” de ATP (*ATP gate*), reinicia el ciclo de la enzima para otra ronda de catálisis (*Schoeffler & Berger, 2005*).

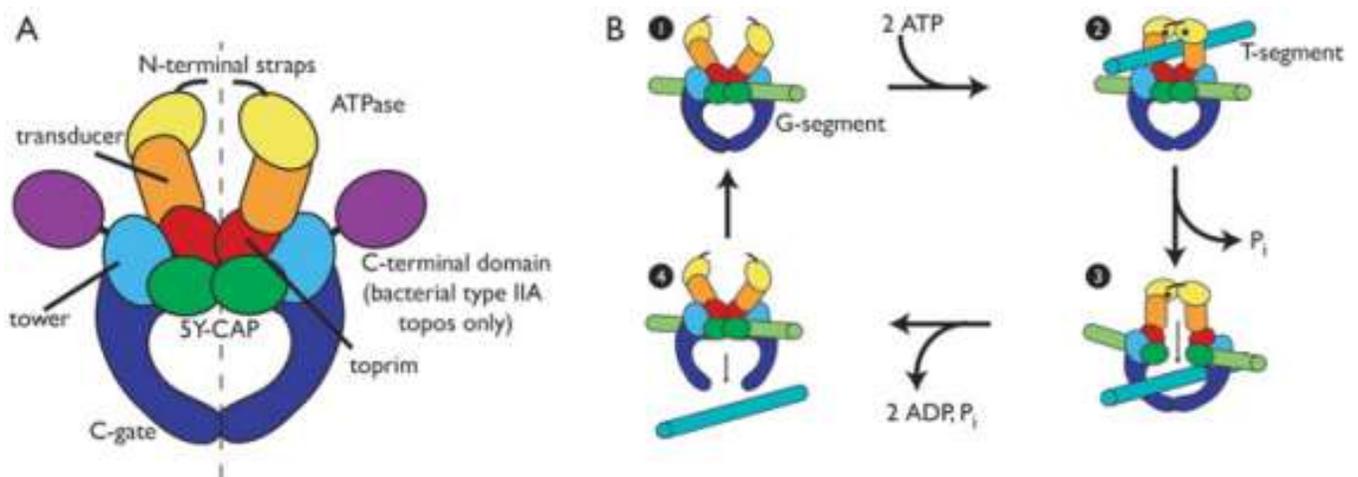


Figura 2: Estructura cuaternaria y mecanismo catalítico de las topoisomerasa II: A) Disposición general de elementos topográficos de la topoisomerasa tipo IIa. Los dominios ATPasa (con su subdominio GHKL) se muestran en amarillo y el subdominio del transductor en naranja (con las regiones N-terminales representadas por líneas negras). La “puerta” del ADN, formada por dos dominios 5Y-CAP (verde) y un par de pliegues toprim (rojo), ayuda con la catálisis y escisión del ADN. Los dominios “tower” son de color celeste, la puerta C azul oscuro y el CTD violeta. Se indica el eje de simetría doble de la holoenzima. La topoisomerasa de tipo II eucariota actúa como un homodímero. B) Representación esquemática del ciclo catalítico. El segmento G (verde claro) se une primero a la puerta de ADN (paso 1). Un segmento T (verde azulado) es capturado por dimerización de los dominios ATPasa tras la unión de ATP (paso 2). La hidrólisis de ATP seguida de la liberación de Pi desencadena la apertura de la puerta del ADN y paso del segmento en T (paso 3). La apertura de la puerta C permite que escape el segmento T (paso 4), mientras que la religación del segmento G y la liberación de los productos de hidrólisis conducen a la apertura de

la puerta de ATP, restableciendo así la enzima para otra ronda de catálisis (paso 1). Tomado y adaptado de (Schoeffler & Berger, 2005)

Las topoisomerasas tipo II modulan la topología del ADN al generar una ruptura transitoria de doble cadena en el esqueleto del ADN, pasando una doble hélice por la abertura y volviendo a sellar la ruptura. Para ello, requieren de iones metálicos divalentes. Cada monómero de Top2 escinde el esqueleto fosfodiéster de una cadena de ADN mediante un ataque nucleofílico que involucra a un residuo tirosina catalítico, que se une al extremo 5' fosfato de la cadena de ADN en el que se encuentra la ruptura doble cadena. La reacción de escisión de las topoisomerasas de tipo II genera intermediarios de ADN con extremos 5' cohesivos de 4 bases que se unen covalentemente a cada monómero de la enzima a través de sus fosfatos 5'-terminales. Estos intermediarios catalíticos, denominados complejos de clivaje Top2 (Top2cc), se revierten rápidamente y no representan una amenaza para la integridad del genoma. Sin embargo, varios factores endógenos y exógenos, incluidos los agentes quimioterapéuticos como el etopósido (ETO) tienen la capacidad de atrapar el Top2cc, aumentando su vida media y, por lo tanto, la probabilidad de colisión de las maquinarias de replicación o transcripción con dichas estructuras (McClendon & Osheroff).

La Top2 es una enzima esencial pero genotóxica. Los Top2cc son intermediarios necesarios en la reacción de paso de la cadena. El equilibrio entre el clivaje del ADN mediado por enzimas (requerido para sus funciones fisiológicas) y la ligadura de estos es fundamental para la supervivencia celular, como se observa esquematizado en la Figura 3 (Pendleton et al., 2014).

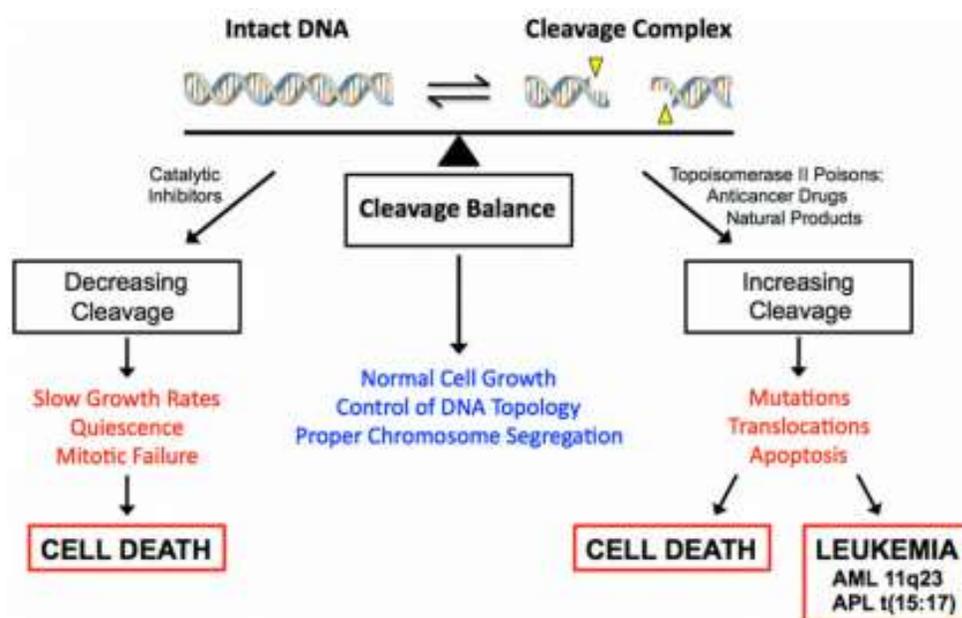


Figura 3: Balance de clivaje: Los niveles de los complejos de clivaje deben mantenerse en un equilibrio crítico. Una disminución en su concentración generalmente refleja una disminución en la actividad catalítica global. Si los complejos de clivaje caen por debajo de un umbral crítico, la Top2 no puede desenredar completamente los cromosomas hijos post-replicación, y las células mueren como resultado de una falla mitótica (izquierda). Si el nivel de clivaje es demasiado alto (derecha), las células también sufren efectos fisiológicos catastróficos, pero por razones diferentes. Cuando las horquillas de replicación, los complejos de transcripción y otros sistemas de rastreo sobre el ADN intentan atravesar estos complejos, pueden generar roturas permanentes de doble cadena. El daño resultante induce vías de reparación que pueden desencadenar mutaciones, translocaciones cromosómicas u otras aberraciones cromosómicas. Si la tasa de daño del ADN es muy alta, pueden desencadenar la muerte celular; y en esto se fundamentan varias drogas contra el cáncer. En algunos casos, las células se recuperan y pueden sobrevivir, pero conteniendo mutaciones o aberraciones cromosómicas. Estas aberraciones cromosómicas pueden iniciar una transformación leucemogénica. La exposición a los venenos de Top2 se asocia con la formación de tipos específicos de leucemia mieloide aguda relacionada a terapia (t-AML) y leucemias infantiles que involucran el gen MLL (leucemia de linaje mixto) en la banda cromosómica 11q23 y t-APL que presentan translocaciones cromosómicas t(15:17) entre el gen

PML (leucemia promielocítica) y el RARA (receptor de ácido retinoico) (flecha inferior derecha) (Pendleton et al., 2014).

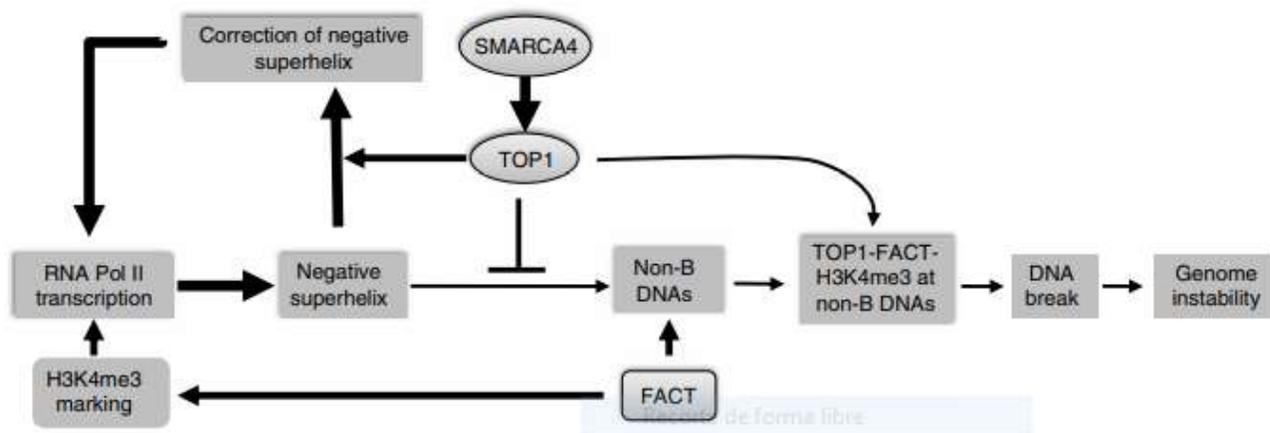
La acción de Top2 también se ha relacionado a la inducción de tipos específicos de leucemia, ya que agentes quimioterapéuticos que se dirigen a esa enzima inducen translocaciones genómicas que conducen a tumores malignos secundarios al tratamiento. En este contexto, se ha sugerido que Top2 β puede ser especialmente responsable de estos eventos. Los riesgos asociados a la rotura de hebras por topoisomerasas sugieren que hay aspectos de procesos fundamentales, como la transcripción, que plantean desafíos topológicos únicos y que las células necesitan un amplio repertorio de respuestas y vías de reparación específicas para salvaguardar la integridad del genoma (Pendleton et al., 2014).

LA INTERACCIÓN TOPOISOMERASA-CROMATINA:

Las topoisomerasas pueden funcionar frente a diversos escenarios topológicos. Las enzimas Top1 y Top2 no requieren que el ADN esté superenrollado, ya que pueden cortar sustratos lineales tan cortos como 18-20pb (Pourquier et al., 1997). Las topoisomerasas tipo 1 β tienen una localización exclusiva dentro de las células (nuclear para Top1 y mitocondrial para Top1mt), mientras que Top2 α , Top2 β y Top3 α pueden estar presentes tanto en el núcleo como en mitocondrias (Wang et al., 2002; Zhang et al., 2014).

Existe una dinámica en la interacción entre las topoisomerasas y la cromatina. Los nucleosomas protegen el ADN de la acción de las topoisomerasas restringiendo su acción (Capranico et al., 1990; Salceda et al., 2006). Sin embargo, incluso en regiones libres de nucleosomas, la acción de las topoisomerasas está limitada para preservar el superenrollamiento negativo que requiere el inicio de la transcripción (Baranello et al., 2016; Kouzine et al., 2013) y la replicación (Seinsoth et al., 2003), además de minimizar los complejos de clivaje nocivos. Existen proteínas que se unen al ADN superenrollado negativamente y lo protegen de las topoisomerasas, mientras que otras regulan la actividad de estas últimas. Por ello, las topoisomerasas son reclutadas a regiones específicas por remodeladores de cromatina (Husain et al., 2016).

Los switch/sacarosa no fermentables (SWI/SNF, o complejo BRG1 o BAF) son remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP que cambian la estructura de la cromatina alterando contactos ADN-histonas, y regulando la metilación de histonas. Top1 y Top2 α están controlados por SMARCA4 (o BRG1), subunidad catalítica ATPasa de los complejos SWI/SNF. SMARCA4 y otros componentes de los complejos SWI/SNF se asocian y reclutan a Top1 a la cromatina (Figura 4) para mantener la estabilidad genómica, y suprimir la formación de estructuras secundarias de ADN potencialmente mutagénicas, como los cuádruplex de Guanosina (*Husain et al., 2016*).



*Figura 4: Rol de SMARCA4, FACT y H3K4me3 en la inestabilidad genómica mediada por Top1. Los altos niveles de transcripción conducen a la acumulación de superenrollamientos negativos. SMARCA4 recluta Top1 durante la transcripción activa de la cromatina para corregir la acumulación excesiva de superhelix negativo y prevenir la formación de ADN non-B en regiones repetitivas. La falta de reclutamiento de Top1 provoca la acumulación de superhelix negativo y la formación de estructuras de ADN non-B en regiones repetitivas. FACT se une al ADN no-B a través de SSRP1 y atrapa una fracción de Top1 reclutada por SMARCA4, facilitando la formación de un complejo de Top1, FACT y H3K4me3 en cromatina que no contiene ADN B, resultando en roturas al ADN (*Husain et al., 2016*).*

La unión de Top2 α a la cromatina, para prevenir enredos en el ADN durante la mitosis, también depende de la actividad ATPasa de SMARCA4. La eliminación de SMARCA4 conduce

a la formación de puentes en la anafase, donde las cromátidas hermanas permanecen unidas por hebras catenadas de ADN, un fenotipo compartido con la deficiencia de Top2 α (*Dykhuizen et al., 2013*). Top1 también es reclutado a la cromatina transcripcionalmente activa mediante la unión al complejo de transcripción de cromatina (FACT), que es una chaperona de histona y un factor de elongación de la transcripción. Además del reclutamiento de Top1 por SMARCA4, el complejo FACT ha sido propuesto de reclutar Top1 a estructuras de ADN no canónicas (ADN no-B) (*Husain et al., 2016*). Top2 α es clave del andamiaje cromosómico y también para la condensación cromosómica y la compactación de cromosomas mitóticos. La sumoilación de Top2 α regula su actividad de decantación que permite la segregación adecuada del ADN replicado (*Bachant et al., 2002*).

Estudios recientes (*Trotter et al., 2015*), encontraron que Ku70 (XRCC6) se asocia con un fragmento BRG1. Los ensayos utilizados demostraron que Ku70/86 y los componentes del complejo Top2 β /poli (ADP ribosa) polimerasa 1 (PARP1) son necesarios para la activación transcripcional dependiente de SWI/SNF mediada por el receptor nuclear a partir de promotores endógenos. Además, demostraron que las rupturas de ADN de doble hebra mediadas por Top2 β son necesarias para la eficiente transcripción de receptores de glucocorticoides. Esto sugiere una interacción directa entre Ku70/86 y BRG1, que involucra la capacidad de remodelación de SWI/SNF y la actividad de Top2 β para aumentar la actividad transcripcional en respuesta al estímulo hormonal.

TOPOISOMERASAS COMO BLANCO DE ACCIÓN EN EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER:

El daño genómico inducido por las topoisomerasas es el resultado de la estabilización de complejos de clivaje que involucran a estas enzimas por una gran cantidad de drogas contra el cáncer, que inducen daño al ADN (*Ashour et al., 2015; Nitiss, 2009a, 2009b*).

Las ADN topoisomerasas alteran la estructura del ADN mediante la inducción de roturas transitorias de las hebras. Ellas utilizan residuos de tirosina para formar aductos intermediarios covalentes entre la enzima y el ADN, resultando en la rotura de una o ambas hebras del ADN,

permitiendo aliviar tensiones topológicas. Los inhibidores específicos de las topoisomerasas impiden la reacción de religación y generan aductos covalentes ADN-proteína estables. Cuando la horquilla de replicación o un complejo de transcripción se encuentra con Top2, colisiona y convierte la escisión transitoria del ADN en roturas permanentes. La reparación de estas lesiones requiere de vías de reparación específicas que incluyan la remoción de los aductos. Si las roturas afectan regiones importantes del genoma u ocurren en gran número, se activan vías apoptóticas. Por el contrario, si son detectadas y reparadas, aunque no de manera satisfactoria, las células logran sobrevivir con alto riesgo de contener translocaciones cromosómicas u otras aberraciones (*Nitiss et al., 2006*).

Los agentes que aumentan la vida media de los complejos Top2-ADN, por interrumpir su actividad catalítica, son llamados venenos de Top2. Una de las drogas más utilizados para tratar pacientes con tumores es el Etopósido (ETO), que afecta a la Top2. El ETO es una droga quimioterapéutica utilizada para el tratamiento de tumores sólidos, como cáncer testicular y pulmón, entre otros. ETO bloquea la actividad catalítica de las topoisomerasas, destruyendo de esta manera a las células cancerosas, ya que inhibe su replicación. ETO es un derivado de la podofilotoxina, también llamado VP-16 (*P. & Neil, 2008*).

La acumulación de Top2cc en las células tratadas conduce a la generación de roturas permanentes de la cadena de ADN, que si no son bien reparadas, pueden conducir a la mutagénesis, a translocaciones cromosómicas o la muerte celular. Si los Top2cc sobrepasan la capacidad de reparación de la célula, pueden desencadenar vías de apoptosis, y de esta manera controlar el crecimiento tumoral. Un problema frecuente ocurre cuando la célula logra sobrevivir, pero con un alto número de roturas de doble cadena (DSB) en su genoma. Las células sobrevivientes con su ADN lesionado, suelen desencadenar translocaciones cromosómicas que conducen a tipos específicos de leucemia (*Baldwin & Osheroff, 2005*).

TOPOISOMERASA II Y LEUCEMIA:

Estudios clínicos sugieren que Top2 inicia translocaciones cromosómicas que terminan derivando en tipos específicos de leucemia. La aparición de t-AML refleja el daño genético no

letal inducido por estos agentes en las células precursoras hematopoyéticas. Las leucemias agudas agresivas, tanto linfoblásticas como mieloides, se asocian a translocaciones del gen de leucemia de linaje mixto (MLL). Aproximadamente, entre el 2-12% de los pacientes que son tratados con terapias que usan ETO, desarrollan leucemia mieloide aguda, con un período de latencia corto (entre los 6 y 24 meses). La característica común entre ellas (cerca del 50%) consiste en la presencia de translocaciones que involucran al gen MLL (leucemia de linaje mixto), en la banda cromosómica 11q23 (*Baldwin & Osheroff, 2005*). Las translocaciones se observan en una región BCR (*breakage cluster region*) de 1 kb localizado en el gen MLL (ver Figura 5), en comparación con la región BCR mayor de 8.3 kb asociada a las AML *de novo* en adultos. MLL es una histona metiltransferasa que regula positivamente la transcripción génica, incluyendo genes homeobox (HOX), involucrados en el crecimiento y la segmentación celular. Esta proteína multidominio está involucrada en la regulación epigenética de genes hematopoyéticos y no hematopoyéticos (*Cowell & Austin, 2012; Muntean & Hess, 2012*).

El gen MLL se expresa en varios tejidos, incluyendo a células mieloides y linfoides. Las translocaciones que involucran al MLL están relacionadas tanto con AML como con ALL y son de pronóstico pobre (*Muntean & Hess, 2012*). Las translocaciones cromosómicas representan un evento temprano en el desarrollo de estas leucemias y los genes de fusión resultantes, como el MLL-AF9, pueden transformar precursores hematopoyéticos e inducir leucemia en modelos animales (*Chikamori et al., 2010; Cowell & Austin, 2012*).

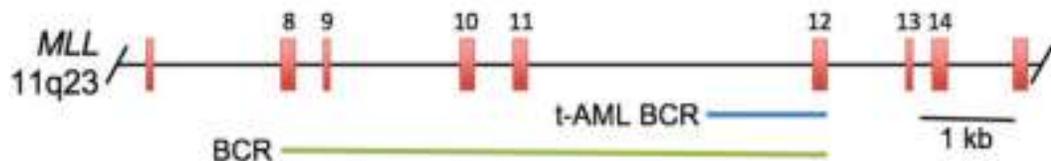


Figura 5: Esquema del locus MLL (banda cromosómica 11q23): Se observa la región de los puntos de ruptura (BCR). Los exones 8–14 se encuentran indicados. Los BCR caen dentro de una región de 8,3 kb del gen (línea verde). Aquellos observados en *t-AMLs* asociadas a Top2 y en las AMLs infantiles, se agrupan en el extremo telomérico de 1 kb del BCR (línea azul) (*Pendleton et al., 2014*).

MECANISMOS DE REPARACIÓN Y RESPUESTA AL DAÑO INDUCIDO POR TOPOISOMERASAS DE TIPO II:

Si el daño en el ADN no se repara correctamente, los procesos metabólicos nucleares como la replicación y la transcripción, en cromosomas que contienen DSB, pueden llevar a consecuencias catastróficas, incluso conducir a la pérdida de fragmentos cromosómicos durante la mitosis. Por lo tanto, en respuesta al daño del ADN, las células detienen el ciclo celular y proporcionan una ventana temporal para reparar las lesiones (*Karanika et al., 2015*).

Como resultado al ADN lesionado, las células activan una respuesta al daño en la cual hay una remodelación de la cromatina y se activan distintos *checkpoints* y factores que ayudan a la localización y reparación del mismo. Los daños en la doble hebra se detectan mediante complejos proteicos que reclutan ataxia-telangiectasia mutada (ATM) y ataxia-telangiectasia relacionada con Rad3 (ATR) al sitio de la lesión, lo que induce un aumento en la fosforilación de H2AX (γ H2AX, histona de la familia H2A). El reclutamiento de ATM, conduce a la activación de Chk2 (Checkpoint kinase 2) y la posterior estabilización de p53, promoviendo la detención del ciclo celular G1/S a través de p21, brindando tiempo para reparar el daño evitando la replicación del ADN dañado. Por otro lado, ATR que se localiza en regiones de ADN monocatenario que surgen por estrés replicativo, activa Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) que a su vez fosforila Cdc25 y Wee1, lo que lleva al arresto de la replicación en S y G2; y al inicio de la reparación del ADN (*Karanika et al., 2015*). La recombinación homóloga (HR) y la recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) son las principales vías implicadas en la reparación de DSB. Se ha encontrado también un proceso alternativo de reparación de extremos no homólogos (A-EJ). (*Pommier et al., 2016*).

Para remover los Top2cc, existen dos vías principales: la vía de escisión mediada por TDP y la vía mediada por nucleasas. En la Figura 6 se ilustran distintas vías para la remoción de Top1cc y Top2cc. Las vías alternativas para la liberación de Topcc dependen de la escisión endonucleolítica de la cadena de ADN que está unido a las topoisomerasas. Estas vías cortan el ADN que flanquean a los Topcc, y luego las polimerasas rellenan los nucleótidos faltantes basándose en la HR (*Menon & Povirk, 2016*).

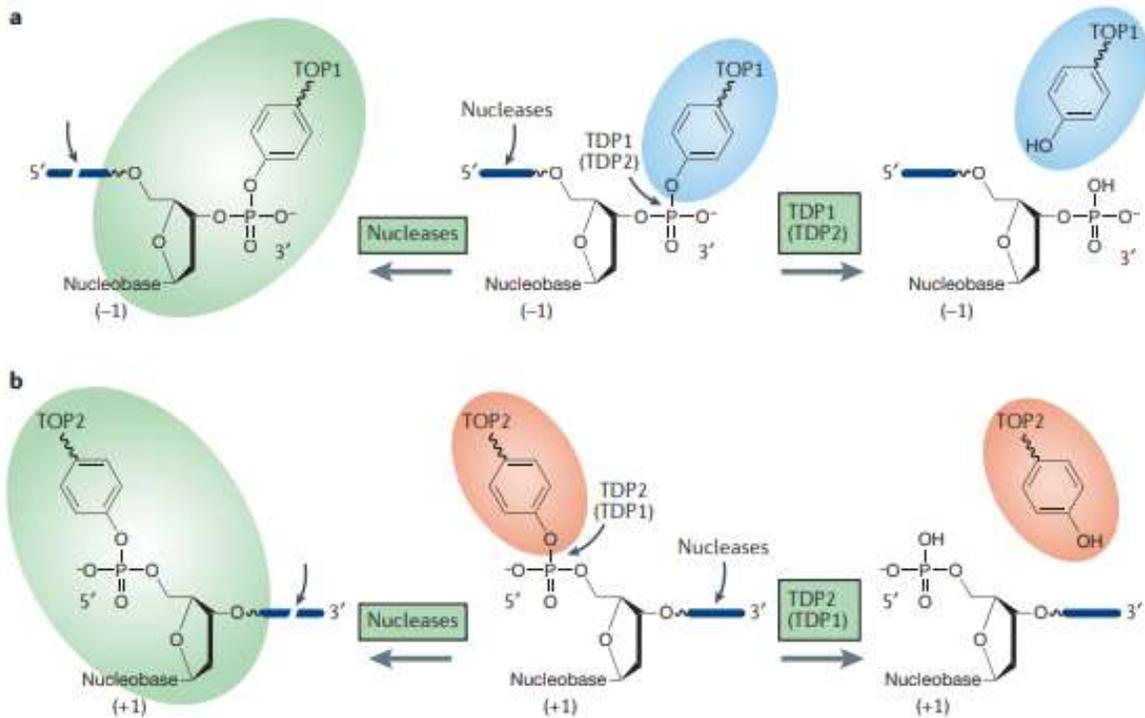


Figura 6. Reparación de ccTop1 y ccTop2. A) TDP1 y TDP2 cortan el enlace covalente Top1 tirosil-ADN (el de menor eficiencia entre paréntesis), liberando Top1 y dejando un extremo 3'-fosfato (derecha), el cual requiere un procesamiento adicional por la polinucleótido quinasa fosfatasa. B) Los Top2cc son reparados preferentemente por TDP2 y con menor eficiencia por TDP1 en vertebrados, liberando Top2 y dejando un extremo 5'-fosfato (derecha), que puede ligarse fácilmente. En la vía endonucleolítica (izquierda), las topoisomerasas se liberan con el segmento de ADN al que están unidas por la acción de las endonucleasas; la polaridad es opuesta para Top1cc y Top2cc (Pommier et al., 2016).

Se ha reportado que Top2 tiene actividad catalítica tanto en la eucromatina como en la heterocromatina (Agostinho et al., 2004; Blattes et al., 2006), lo cual es consistente con que puede inducir DSB en ambos compartimentos al verse afectada su actividad. Sin embargo, dada la naturaleza compacta de la heterocromatina en comparación con la eucromatina, junto a otros factores aún no dilucidados, los mecanismos de señalización y reparación del ADN dañado en un compartimento nuclear difiere sustancialmente respecto del otro.

Respuestas diversas y especializadas han sido demostradas en el nucléolo sobre secuencias

de ADN_r (Korsholm et al., 2019) , durante la replicación de la heterocromatina pericentromérica (Mendez-Bermudez et al., 2018), e incluso entre el ADN pericentromérico y el centromérico donde diferencias en el reclutamiento de factores de reparación han sido reportados (Tsouroula et al., 2016). En relación a esto, se ha demostrado que la quinasa ATM cumple un rol en la reparación de una fracción de las lesiones inducidas por las radiaciones ionizantes que ocurren en la heterocromatina (Goodarzi et al., 2008). Por otra parte, se ha vinculado a la nucleasa TDP2 con la reparación de DSB asociadas a transcripción inducidas por venenos de Top2 (Gómez-Herreros et al., 2017).

TIROSIL-ADN-FOSFODIESTERASA 1 (TDP1)

SUSTRATOS

La tirosil-ADN-fosfodiesterasa 1 (TDP1) está codificada en el cromosoma humano 14 a través de 17 exones y es miembro de la superfamilia Fosfolipasa D, familia que involucra varias fosfodiesterasas. TDP1 es una enzima de reparación del ADN capaz de remover péptidos covalentemente unidos mediante una unión fosfotirosina al extremo 3' del ADN. (*Pommier et al., 2016*).

Además de su amplio espectro de sustratos, TDP1 interactúa con varios factores de respuesta al daño del ADN. Participa además en la eliminación de Top2cc en un contexto cromatínico, aunque no es esencial en esa función. TDP1 actúa en la reparación de lesiones mediadas por Top2, ya que líneas celulares silenciadas en TDP1 son hipersensibles a drogas que tienen como blanco a Top2, acumulando roturas e inestabilidad del genoma (*Borda et al., 2015*).

La eliminación de Top1cc por TDP1 deja un fosfato 3', que impide que TDP1 elimine otro nucleótido y actúe como una exonucleasa (*Debéthune et al., 2002*) (*Interthal, Chen, & Champoux, 2005*). Por lo tanto, su actividad debe combinarse con la polinucleótido quinasa fosfatasa (PNKP) para generar extremos 3'-hidroxilo que pueden extenderse mediante polimerasas. Esto explica la importancia de PNKP y su proteína asociada XRCC1 en la reparación de Top1cc (*Plo et al., 2003*). TDP1 interactúa y es estabilizado por PARP1 en los sitios Top1cc (Das et al., 2014). TDP1 hidroliza 3'-tirosina en una variedad de estructuras de ADN con preferencia por ADN

monocatenario. Si bien TDP1 no puede eliminar completamente a Top1 nativo, la digestión proteolítica o desnaturalización de Top1, le permite ser hidrolizada por TDP1. TDP1 puede resolver enlaces 5'- fosfotirosilo, aunque es menos eficiente que TDP2, lo que resulta en una vía de respaldo para la reparación de Top2cc (*Debéthune et al., 2002; Pommier et al., 2014*).

Los sustratos de TDP1 incluyen extremos 3'-fosfoglicolato y 3'-fostato desoxirribosa, productos comunes del daño oxidativo del ADN. Las células *knockout* en TDP1 son deficientes en la reparación de daño oxidativo tanto en las mitocondrias como en el núcleo. La actividad nucleosidasa de TDP1 puede quitar 3'-desoxiribonucleótidos y 3'-ribonucleótidos, cuando no están fosforilados en sus extremos 3'. El hecho que TDP1 no procese extremos 3'-fosfato, limita su actividad a un solo nucleósido de los extremos. TDP1 hidroliza lesiones 3'-desoxirribosa resultantes de la alquilación de bases luego de la AP liasa. Esta actividad es relevante para sobre lesiones inducidas por diferentes agentes y radiaciones. La potente actividad fosfodiesterasa de TDP1 hidroliza varios aductos sintéticos unidos al extremos 3'-fosfato (*Debéthune et al., 2002; Interthal, Chen, & Champoux, 2005; Pommier et al., 2014*).

ESTRUCTURA DE TDP1

TDP1 humana es un polipéptido de 68 kDa y consta de dos dominios. El extremo N-terminal regula su reclutamiento y la estabilidad de la proteína. El dominio catalítico del extremo C-terminal pertenece a la familia de la fosfolipasa D (PLD), y contiene dos motivos HKN separados por 210 residuos (para TDP1 humano: H263K265N283 y H493K495N516). TDP1 se diferencia en que los aspartatos en los motivos HKD son reemplazados por asparaginas. TDP1 actúa como monómero, con los dos motivos HKN muy cercanos en un canal asimétrico estrecho de unión al sustrato (Figura 7A) y cargado positivamente para unir ADN monocatenario. El canal se ensancha para recibir el polipéptido, y se mezcla su distribución de cargas (Figura 7C). Los motivos HKN estabilizan el vanadato usado como intermediario de transición, a través de seis enlaces de H (Figura 7E). Los residuos N de los sitios activos (N283 y N516) estabilizan la K de la cadena vecina a través de enlaces de hidrógeno. El ADN monocatenario se mantiene por interacciones polares (Figura 7E) aunque también por interacciones hidrofóbicas con el ADN. Como la estabilidad del

sustrato se realiza por ambas interacciones, el reconocimiento del ADN no está restringido a su secuencia (Pommier et al., 2014).

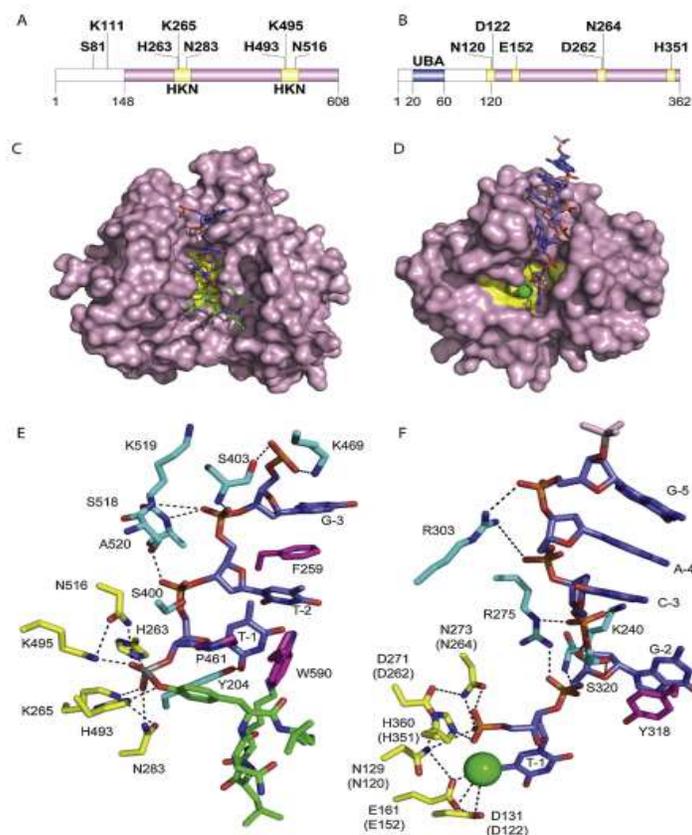


Figura 7: Estructuras cristalográficas de TDP1 (izquierda) y TDP2 (derecha). A) y B) Representación lineal de los polipéptidos TDP1 (A) y TDP2 (B). Los segmentos N-terminales (blancos) (residuos 1-148 en TDP1 y 1-120 en TDP2) están ausentes. UBA: dominio de unión de ubiquitina. Los segmentos catalíticos están resaltados en amarillo. C) y D) Estructuras de superficie de los cristales de TDP1 (C, PDB ID 1NOP) y TDP2 (D, PDB ID 4F1H). Las proteínas se muestran en rosa, los residuos catalíticos en amarillo, el ADN en líneas azules, el péptido en línea verde y en líneas coloreadas a cada elemento (N, azul; O, rojo; P, naranja; Vanadato, gris). Para TDP2, el Mg^{2+} se representa como esfera verde. E) y F) Contactos entre sustratos y residuos del sitio catalítico de TDP1 (E) y TDP2 (F). Los residuos catalíticos se representan con palos amarillos; aquellos involucrados en interacciones polares con líneas cian; los implicados en interacciones hidrofóbicas en magenta. Las líneas están coloreados por elemento (N, azul; O, rojo;

P, naranja; Vanadato, gris). Las líneas discontinuas marcan las interacciones polares (Pommier et al., 2014).

MECANISMO CATALÍTICO

TDP1 no requiere cofactores y procesa sustratos en dos pasos con un intermediario transitorio covalente. Primero ocurre un ataque nucleofílico del enlace fosfotirosilo de Top1-ADN a través del residuo H263 del motivo HKN N-terminal (Figura 8A). El residuo H493 del HKN opuesto actúa como ácido y dona un protón al péptido recién formado que contiene tirosina. Un enlace fosfoamida covalente transitorio se forma entre H263 y el extremo 3' del sustrato (Figura 8B). El residuo H493 actúa ahora como base e hidroliza este intermediario a través de un molécula de agua (Figura 8C). Esto genera un extremo 3' (Figura 8D) que debe ser procesado por PNKP. El cambio de una H catalítica por una R en la posición 493 (H493R) genera acumulación de intermediarios covalentes ADN-TDP1 (Figura 8E), que es responsable de una enfermedad neurodegenerativa, autosómica recesiva, llamada ataxia espinocerebelar con neuropatía axonal (SCAN1) (Connelly & Leach, 2004; Hirano et al., 2007; Pommier et al., 2014).

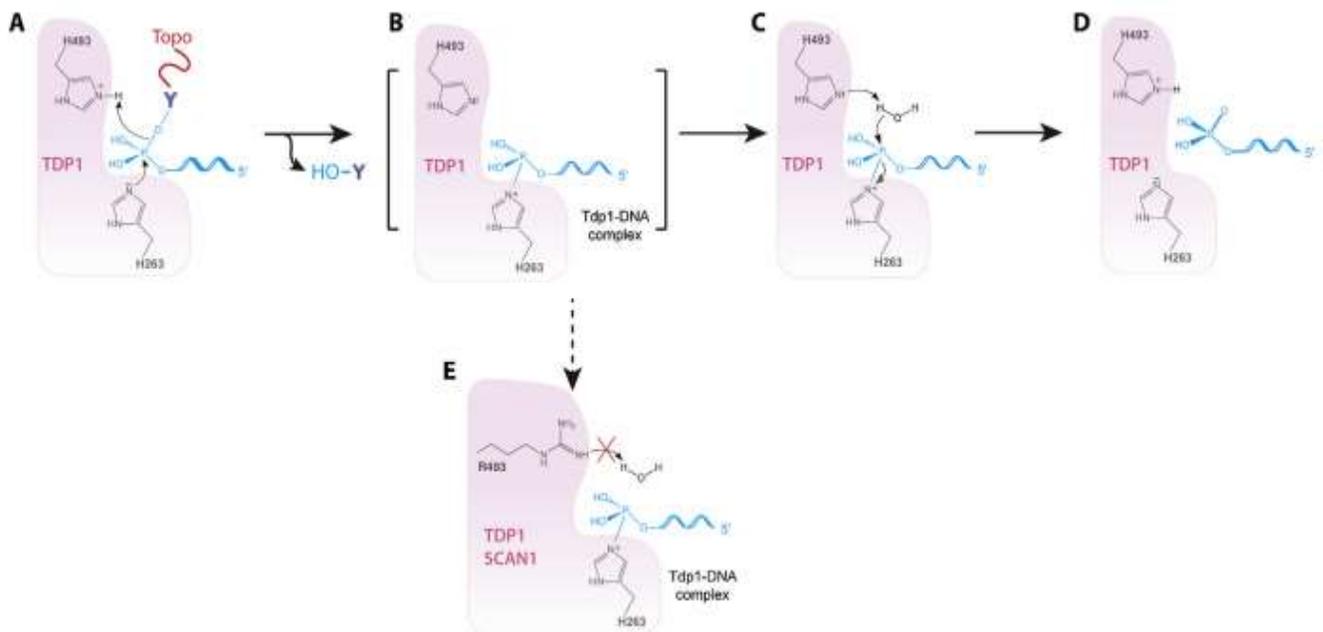


Figura 8: Ciclo catalítico de TDP1. (A) Ataque nucleofílico de la cadena fosfodiéster del ADN a través del átomo N2 del imidazol de H263. H493 dona un protón al grupo tirosilo del

péptido saliente. (B) Intermedio covalente de fosfohistidina. (C) Segundo ataque nucleofílico a través de una molécula de agua activada por H493. (D) Generación de un extremo 3'-fosfato como producto y liberación de la enzima TDP1. (E) Las mutaciones en SCAN1 (H493R) conducen a una acumulación del intermediario Tdp1-ADN (Pommier et al., 2014)

La presencia de una mutación homocigota en H493R que interrumpe el sitio activo de TDP1, y su asociación causal a la patología SCAN1, resalta la importancia de esta enzima. SCAN1 es el primer trastorno genético humano que resulta de una falla en la reparación de complejos ADN-proteína, en el que la proteína responsable de la enfermedad queda atrapada covalentemente sobre el ADN. Las células de los pacientes SCAN1 acumulan complejos Top1-ADN y TDP1-ADN (Hirano et al., 2007). Los complejos proteína-ADN no reparados interfieren con la transcripción en neuronales y contribuyen al fenotipo SCAN1. Líneas celulares mutantes para TDP1 derivadas de pacientes SCAN1, muestran hipersensibilidad al inhibidor de Top1 camptotecina (CPT). Las lesiones producidas por CPT son DSB, resultantes de las colisiones de horquillas de replicación con Top1cc (Hirano et al., 2007; Interthal, Chen, Kehl-Fie, et al., 2005).

REGULACIÓN DE TDP1, MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES Y ASOCIACIÓN CON VÍAS DE REPARACIÓN:

Las PTM por fosforilación, poli-ADP-ribosilación, SUMOilación y ubiquitinación regulan el reclutamiento, la actividad y la estabilidad de las proteínas de respuesta al daño del ADN (DDR). ATM y ADN-PK (proteína kinasa dependiente de ADN) activan TDP1 por fosforilación en Ser81 (Figura 7A). La fosforilación de TDP1 aumenta su estabilidad y reclutamiento a los sitios lesionados. La fosforilación de Ser81-TDP1 promueve interacciones de TDP1 con XRCC1 y la ligasa III, que luego reclutan a PNKP (Das et al., 2009; Pommier et al., 2014).

Existe un vínculo entre la vía ATM-Chk2 y la fosforilación de XRCC1. ADN-PK interactúa además y fosforila a XRCC1. En respuesta a CPT, XRCC1 colocaliza con γ H2AX y pSer81-TDP1. Estos sitios se correlacionan con la fracción de Top1cc que resultan en lesiones irreversibles por colisión con la horquilla de replicación y con la transcripción. TDP1 fosforilado en Ser81 protege a las células contra el daño inducido por IR y CPT (Das et al., 2009; Plo et al., 2003; Pommier et al., 2014).

La PARP1 está implicada en la reparación de Top1cc. Esta cataliza la reacción de ADP-ribosilación en polímeros (PAR), a partir de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) a ella misma y a otras proteínas, incluyendo Top1, XRCC1, Ligasa III e histonas. El dominio N-terminal de TDP1 se une al dominio catalítico de PARP1. PARP1, PARila TDP1 sin interferir con su actividad fosfodiesterasa, estabilizando a TDP1 en respuesta al daño. Además, esta PARilación recluta TDP1 y XRCC1 a los sitios de daño inducidos por Top1cc. Tanto la PARilación como la SUMOilación reclutan TDP1 a los sitios de daño del ADN (*Patel et al., 2012*).

TIROSIL-ADN FOSFODIESTERASA 2 (TDP2)

SUSTRATOS

TDP2 fue descubierto como una enzima que podría revertir aductos de proteínas unidas por grupos tirosilo a fosfatos del ADN (*Zeng et al., 2012*). Originalmente se identificó por su capacidad de remover complejos Top1-ADN, y luego se observó mayor actividad in vitro en complejos 5'tirosil-ADN e intermediarios de replicación viral. Después de la eliminación de Top2 del extremo 5' del ADN y la regeneración de un 5' fosfato, la religación directa puede ocurrir mediante NHEJ. Sin embargo, la HR también tiene un rol en el procesamiento de Top2cc (*Malik et al., 2006; Nitiss et al., 2006*). TDP1 repara principalmente Top1cc y TDP2 repara principalmente a Top2cc. La actividad de TDP2 está limitada a la remoción de proteínas atrapadas en extremos 5'-tirosilo de ADN. Las células deficientes en TDP2 son hipersensibles a los inhibidores de Top2 (*Cortes Ledesma et al., 2009*).

TDP2 y TDP1 tienen actividades que se superponen ya que TDP1 tiene una menor actividad en extremos 5'-fosfotirosilo y TDP2 presenta menor actividad sobre extremos 3'-fosfotirosilo. La actividad fosfodiesterasa de TDP2 es específica para enlaces fosfotirosilo. TDP2 escinde enlaces 5'-tirosilo en extremos de ADN monocatenario; así como sustratos que sobresalen del extremo 5'. TDP2 no requiere segmentos largos de ADN ni muestra actividad nucleosidasa (*Zeng et al., 2012*).

ESTRUCTURA DE TDP2

La TDP2 humana es más pequeña que TDP1 con una masa molecular de 41 kDa (362 residuos de aminoácidos). TDP2 consta de dos dominios, el catalítico en el extremo C-terminal y el N-terminal tiene un motivo de unión a ubiquitina (UBA) (Figura 7B). TDP2 pertenece a las nucleasas con dominio EEP que escinden cadenas de ADN y ARN. Tiene cuatro motivos catalíticos conservados (TWN, LQE, GDXN y SDH) compartidos con otras nucleasas dependientes de Mg^{2+}/Mn^{2+} . La estructura de TDP2 revela una organización monomérica con un sitio catalítico formado por cuatro residuos que quelan un ion Mg^{2+} . La Figura 7D y 7F muestra la estructura cristalográfica de TDP2 en *Zebra fish*. Presenta un canal de unión a ADN monocatenario que conduce al sitio catalítico formado por N129, E161, D271 y H320 (residuos N120, E152, D262 y H351 en humanos) que coordinan un ion Mg^{2+} (Gao et al., 2012; Pommier et al., 2014).

La estabilización del ADN en el sitio catalítico de TDP2 no es específica de secuencia. La cadena fosfodiéster del ADN se posiciona por enlaces de H entre los átomos de oxígeno de los grupos fosfato de los tres nucleótidos terminales y los átomos de nitrógeno de K240, R275, R303 y S320 (Pommier et al., 2014; Schellenberg et al., 2012; Shi et al., 2012).

MECANISMO CATALÍTICO DE TDP2

TDP2 requiere metales divalentes para su actividad, pero no forma un intermediario catalítico covalente transitorio. Los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} son los más eficientes para la actividad enzimática de TDP2. TDP2 genera extremos de ADN 5'-fosfato terminales, que pueden ser procesados fácilmente por ligasas (Adhikari et al., 2012).

REGULACIÓN DE TDP2 Y VÍAS DE REPARACIÓN ASOCIADAS

El procesamiento de Top2cc mediante TDP2 genera un DSB con 4 bases que sobresalen y con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo, los cuales son sustratos para la unión de extremos mediante las proteínas Ku y ligasa IV pertenecientes a la vía NHEJ. Sin embargo, la vía HR también es importante para la reparación del daño mediado por Top2. Es probable que ambas vías funcionen en paralelo. No se demostró aún ninguna PTM sobre TDP2 (Nitiss & Nitiss, 2013).

OBJETIVOS

La organización de la cromatina en sus distintos compartimentos sub-nucleares puede condicionar el acceso y la actividad de diferentes factores de reparación del ADN. Por otra parte, las actividades redundantes que han mostrado in vivo TDP1 y TDP2 frente a un mismo sustrato, no se ajustan a las diferencias de polaridad observadas in vitro.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que la actividad de reparación de TDP1 en respuesta al veneno de Top2 ETO se ve afectada por la organización que adopta la cromatina en los diferentes compartimentos del genoma.

De acuerdo a esto, los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

- Estudiar la asociación de señales nucleares de TDP1 con regiones eucromáticas en células humanas.
- Determinar la existencia de una asociación de señales de TDP1 con regiones heterocromáticas en células humanas.
- Establecer cambios en los patrones de asociación de TDP1 con las regiones eucromáticas y heterocromáticas en respuesta al veneno de Top2 Etopósido.

MATERIALES Y MÉTODOS

INMUNOMARCACIÓN PARA COLOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

INMUNOMARCACIÓN:

Se sembraron placas de 35mm conteniendo cubreobjetos estériles y se dejaron crecer de un día para el otro. Las placas fueron tratadas con 0,001% DMSO (vehículo) o 10 µg/ml Etopósido (ETO) durante 1 hora. Luego de la incubación con dicha droga, se descartó el medio de cultivo y se procedió rápidamente al lavado con 1ml de PBS frío para disminuir el metabolismo.

Seguidamente, se realizó una pre-extracción mediante el agregado de 1ml de solución fría de Triton-X100 al 0,5% en PBS; y se dejó en agitación suave (200 rpm) durante cinco minutos. Sin sacar la solución de pre-extracción, se agregó 1ml de solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (PFA 2% final) y se incubó durante quince minutos. Después se realizaron tres lavados con PBS 1X, cada uno por 2-5 minutos en agitación suave.

La inmunomarcación se realizó mediante la incubación de las células fijadas y permeabilizadas con 100µl de solución bloqueante (BSA 3%, Triton X100 0,5%, en PBS 1X) durante un hora a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario originado en conejo anti-TDP1 se incubó en dilución 1:200, durante toda la noche a 4°C y en cámara húmeda. Una vez finalizado, se lavó tres veces con PBS y se incubó con la porción Fab monovalente de un anticuerpo anti-conejo marcado con Alexa fluor 488 (1:150), por una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó luego tres veces en PBS 1X.

A continuación, se incubó el segundo anticuerpo primario, que podía ser: anti-RNP11 (1:100) o anti-H3AcK9/14 (1:100), ambos marcadores de eucromatina; o anti-HP1α (1:200) como marcador de regiones heterocromáticas. Se incubaron durante 2hs en cámara húmeda con solución bloqueante y luego se lavaron tres veces con PBS.

Seguidamente, se agregó el segundo anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-conejo marcado con Alexa fluor 594 (1:150) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en

cámara húmeda. Se lavó cuatro veces con PBS antes de realizar el montaje en los portaobjetos. La contratinción de los núcleos celulares se realizó con una solución (1:1000) de TO-PRO3 por 15 min o con DAPI incorporado al medio de montaje.

Para el montaje se colocó el cubreobjetos con las células sobre el mismo sobre portaobjetos conteniendo 8µl de medio de montaje. Se realizó un ligero *squash* para retirar el excedente y se sellaron los vidrios con esmalte.

Los portaobjetos se guardaron a -20°C en oscuridad al menos por 16h, para luego ser observados por microscopía confocal.

La adquisición de imágenes se llevó a cabo con un microscopio confocal Olympus FV1000 equipado con un objetivo Plan/Apo 63X de 1.42 NA, manipulando una combinación de filtros y láseres adecuados para excitar las moléculas fluorescentes de las longitudes de onda utilizadas. Se adquirieron 10 imágenes por núcleo (512x512 píxeles) a una distancia de 0,23 µm entre cada imagen en el eje Z de manera de cubrir todo el volumen nuclear. Las imágenes fueron luego segmentadas y analizadas con el software ImageJ.

ANÁLISIS DE IMÁGENES

En primer lugar se realizó un análisis de la distribución de las señales en cada célula mediante un gráfico de *scatter plot*, y se determinó el tipo de correlación entre las variables que luego fue corroborada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. De acuerdo a ello, el análisis de colocalización o asociación entre señales, fue realizado mediante el establecimiento de una matriz métrica de análisis (TOS, *Thresold overlapping score*); y la fracción de TDP1 asociada a los diferentes compartimentos, fue evaluado mediante el parámetro M1 del coeficiente de colocalización de Manders.

El análisis se realizó en al menos 200 células por tratamiento, provenientes de 3-4 experimentos independientes. Los resultados de colocalización se analizaron mediante el método estadístico de Costes. La comparación entre tratamientos, se realizó mediante el test estadístico de Mann-Whitney.

CHIP-QPCR:

LISIS CELULAR Y CROSS-LINKING:

Las células fueron tratadas o no con ETO 10µg/ml por 1h. Luego, fueron fijadas en 1% de PFA. Para esto se agregó 550 µl de PFA al 18,5% a 10 ml de medio de cultivo, por goteo con las placas en movimiento; y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 1ml de glicina 10X a cada placa moviendo para mezclar y homogeneizar. A continuación se incubó por otros cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron las placas en hielo, retirando todo el medio con pipeta y se agregó 10ml de PBS frío conteniendo un coctel de inhibidores de proteasas (PICII). Se colectaron las células utilizando un *scraper* y se traspasaron a un tubo cónico de 15 ml. Por último, se centrifugó a 800g a 4°C por cinco minutos, se retiró todo el buffer y el pellet seco se guardó en freezer a -80°C. Al comienzo del experimento se realizó una placa adicional, a la misma confluencia, para cuantificar el número de células mediante conteo en cámara de Neubauer.

Al momento de procesar las muestras, previo a la inmunoprecipitación, los pellets fueron resuspendidos en buffer para lo cual se agregó 100µl de buffer de lisis celular (BSA 3%, Triton X100 0,5%, en PBS 1X) por cada 1 millón de células. Luego, se incubó en hielo por 15 min mezclando en vortex cada 5 min. A continuación se centrifugó a 800g por 5 min a 4°C, y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. El pellet fue entonces resuspendido, a una concentración de 1×10^6 células/100µl, en buffer de lisis nuclear [10mM Tris (pH8.0), 2mM EDTA, 0,5% SDS] conteniendo PICII.

RECuento DE CÉLULAS EN CÁMARA DE NEUBAUER:

Para contar las células en una cámara de Neubauer, se utilizó una placa control que se sembró paralelamente con las placas a sonicar.

Primero se retiró el sobrenadante de las placas que contienen las células y se incubó con 500µl de Tripsina por 3 minutos y se revisó al microscopio que la totalidad de las células se hayan despegado, para luego ser recolectadas en un tubo cónico de 15ml conteniendo 4ml de medio de cultivo y suero fetal bovino. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 ml de PBS 1X.

Se retiró una alícuota para conteo y se realizaron diluciones cuando fue necesario. Posteriormente, se retiraron 10µl de la dilución y se mezcló con la misma cantidad de Trypan Blue 0,04% en otro tubo. El Trypan Blue sirve para diferenciar células vivas de muertas, ya que estas últimas son incapaces de expulsar el colorante hacia el exterior celular y se verán de coloración azul. Se armó la Cámara de Neubauer y se sembraron 8 µl sobre las rejillas para luego contar en las áreas de conteo y sacar la media (\bar{X}). A continuación, se calculó el número de células según la siguiente ecuación:

$$\text{Células/ml} = \bar{X} \times \text{Factor de dilución} \times 10000$$

FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA

Las muestras control (DMSO) o tratadas con ETO, fueron divididas en microtubos de 1,5ml a razón de 3×10^6 equivalentes celulares/300µl por tubo. En cada caso, se separó además un tubo como control negativo de fragmentación. Los tubos fueron sujetos a cavitación utilizando un sonicador Bioruptor Pico (Diagenode®). En primer lugar, se realizó la puesta a punto de la fragmentación de la cromatina, analizando el número de ciclos necesarios para generar fragmentos de entre 200-600pb con el número de equivalentes celulares y el volumen utilizado (ver Anexo a Resultados, figura 17). Una vez establecidas las condiciones, se utilizó 6 ciclos de sonicación con intervalos de 15 seg ON y 30 seg OFF. En todos los experimentos, se analizó mediante gel de agarosa el tamaño de los fragmentos generados.

INMUNOPRECIPITACIÓN

Antes de comenzar, se llevaron a temperatura ambiente el PICII y las soluciones de trabajo *low salt wash buffer* (LSWB, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150mM NaCl), *high salt* (HSWB, 500 mM NaCl, 2mM EDTA, 20mM Tris pH8,1, 1% Tritón-X100, 0,1% SDS), *LiCl WB* (10mM Tris pH 8,1, 1mM EDTA, 1% IGEPAL, 250Mm LiCl, 1% deoxicolato de sodio) y TE (1mM EDTA, 10mM Tris pH 8) en hielo. Luego se preparó la cantidad suficiente del buffer de dilución conteniendo PICII para el total de tubos a inmunoprecipitar (IP). Cada IP requirió 400µl de buffer de dilución y 2,25µl de PICII. Para cada IP se utilizó un tubo conteniendo 100µl de cromatina (1×10^6 equivalentes celulares), el cual se mantuvo en hielo; y se

adicionó el volumen requerido de buffer de dilución. Se removió el 1% de la muestra y se separó como control de carga o *input* para guardar en heladera a 4°C hasta el paso de elusión de los complejos y reversión de *cross-links*.

Para los ensayos de IP de TDP1, los controles de isotipo tanto en muestras control como ETO, fueron incubadas con 3µg de suero de conejo y 20µl de *beads* magnéticos acoplados a proteína A/G. Los tubos a inmunoprecipitar correspondientes a “IP-antiTDP1” tanto control como ETO se incubaron con 3µg de anti-TDP1 y 20µl de *beads* magnéticos asociados a proteína A/G.

Estos tubos se incubaron overnight a 4°C con rotación y luego fueron separados magnéticamente los *beads* asociados o no a los complejos proteína A/G – anticuerpo – antígeno y se removió el sobrenadante.

Una vez retirado el sobrenadante, los *beads* magnéticos fueron lavados, y resuspendidos en 500µl de buffer frío en la siguiente secuencia: primero se resuspenden con LSWB, segundo con HSWB, luego con el buffer de LiCl y por último con el buffer TE; y se los incubaba durante 3-5 min en rotación en cada caso. En todos los casos se utilizó un separador magnético para remover cuidadosamente la fracción del sobrenadante.

ELUCIÓN DE COMPLEJOS PROTEÍNA/ADN Y REVERSIÓN DE CROSS-LINKS

Se descongeló proteinasa K y se entibió el buffer de elución ChIP (provisto por el kit) a temperatura ambiente. Se preparó el buffer de elución ChIP para todos los tubos (incluyendo los controles de *input*) mediante el agregado de 100µl de buffer y 1µl de proteinasa K por cada muestra. Las muestras fueron incubadas a 62°C por 5 horas en *shaker*; y luego a 95°C por 10 minutos. Luego de permitir que las muestras alcancen temperatura ambiente, los *beads* fueron separados con un magneto y el sobrenadante trasvasado a un nuevo tubo.

EXTRACCIÓN DE ADN CON FENOL:IAC

Se incubaron las muestras con una solución 1:1 de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (o fenol:IAC, este último también en una relación 1:1). Se invirtieron 4 o 5 veces para mezclar y se

centrifugaron 5 min a 12000rpm. Se recuperó la fase acuosa (SN1) en un tubo limpio y se mezcló la muestra con una solución de IAC:H₂O en proporción 1:1.

Luego se centrifugaron por 5 minutos a 12000rpm y se recuperó la SN2, que luego fue precipitada con la adición de solución 3M de NaCl frío (1 vol de NaCl: 10vol de muestra). Se adicionaron 2 volúmenes de EtOH absoluto y se incubó por 15 min a -20°C. Luego de centrifugar 15 min a 4°C, se descartó todo el sobrenadante con cuidado de no dejar trazas de etanol. Se dejaron secar bien las muestras y se resuspendió en 20-40µl de TE (pH8.0).

GEL DE AGAROSA:

Se prepararon geles de agarosa al 1,4%, mezclando 40ml de buffer TBE con 0,56g de agarosa y calentando hasta obtener una solución homogénea. Se adicionó luego 1µl de bromuro de etidio. Las muestras fueron sembradas con buffer de carga y fueron corridas a 90V durante aproximadamente 30 minutos. Para la identificación de los tamaños de los fragmentos, se utilizó un *ladder* de ADN de 100pb.

PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES:

Luego de obtener un registro fotográfico digital de las corridas en gel, las imágenes fueron analizadas con el software de acceso gratuito Fiji (ImageJ). Para ello, se realizaron mediciones densitométricas de las señales obtenidas en las diferentes muestras analizadas.

Q-PCR

Cuantificación de TDP1 presente en heterocromatina:

Para la realización de las qPCR se contó con 2 tubos de control de *input*, 2 controles de isotipo, 2 IP-anti-TDP1 y 1 control negativo; tanto para el tratamiento control como para ETO. Las qPCR se realizaron por duplicado y los ensayos se realizaron a partir de 2 experiencias independientes.

Se utilizaron primers dirigidos contra una secuencia consenso de ADN alfa-satélite (Choo y col., 1991). La secuencia de los primers fue la siguiente:

Fw 5' CTCAGAACTTCTTTGTGATGTGT 3'

Rv 5' TATTCCTTTTGG AACGAAGGC 3'.

La composición de la *mix* para la PCR Ta-sat (*Total alpha-satellite*) fué la siguiente: 10µl de mezcla real, 1µl de primer Fw, 1µl de primer Rv y 4 µl de dH₂O por tubo. En tubos de qPCR se colocaron 16 µl de *Mix* con 4 µl de templado.

Se utilizó el siguiente programa de ciclado: 10 minutos a 95°C iniciales, 95°C por 30 segundos y 65°C por 45 segundos durante 45 ciclos.

El análisis de los resultados fue realizado considerando el % del input. El análisis mediante % de input representa la cantidad de ADN que fue arrastrado por el anticuerpo de interés en la reacción ChIP, respecto a la cantidad de material de inicio (muestra input). Por ello, se calculó el valor ΔCt para cada muestra (normalizada a la muestra input). La fórmula utilizada para cada muestra se detalla a continuación:

$$\Delta Ct [\text{ChIP normalizada}] = (Ct [\text{ChIP}] - (Ct [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{factor de dilución del Input})))$$

Donde el factor de dilución del Input = (fracción de la cromatina Input guardada)⁻¹ x factor de dilución del Input antes de la qPCR. Entonces:

$$\% \text{ Input} = 100/2^{\Delta Ct [\text{ChIP normalizado}]}$$

Por lo tanto, el valor % Input que se obtuvo en cada muestra representa el enriquecimiento en TDP1 de las regiones genómicas que presentan secuencias α -satélites.

RESULTADOS

ASOCIACIÓN DE TDP1 A COMPARTIMENTOS NUCLEARES EUCROMÁTICOS EN RESPUESTA A ETO:

La microscopía confocal es una técnica que permite recoger y detectar la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Esto es posible porque, por un lado, la fuente de iluminación utilizada es láser y la radiación se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Esta luz monocroma ilumina las muestras de forma específica con una intensidad muy elevada y estable. Esta disposición permite conseguir resoluciones microscópicas subcelulares. Por otro lado, en los microscopios confocales cuentan con un "díafragma de detección confocal" o "pinhole", que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de aquella procedente de otros planos de la muestra que no están siendo enfocados. Así, se obtiene sólo la información del "plano de imagen primario" o "plano focal", y se elimina el resto. Como resultado final se logran imágenes de mucha mejor calidad, pudiéndose realizar cortes virtuales de las muestras analizadas. Utilizando la microscopía confocal se puede estudiar la asociación (coincidencia) de diferentes marcadores o moléculas variadas, en una región concreta de la célula o tejido en estudio.

Para determinar la distribución sub-nuclear de TDP1 en relación a los compartimentos eucromáticos; y si dicha distribución se altera en respuesta a ETO, se realizaron experiencias de doble inmunomarcación. La acetilación de las histonas es una de las PTM que altera la accesibilidad a la cromatina, resultando en una estructura más relajada de la misma. La acetilación de las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (acK9/14H3) ha demostrado una elevada correlación con promotores bivalentes y *enhancers* activos; y por ende, están asociados a un estado activo de los promotores.

Luego de realizar la doble inmunomarcación para TDP1 y acK9/14H3 (figura 9A), se observó que TDP1 mostraba una distribución de señal pan-nuclear, con una acumulación de marcación a modo de depósitos sobre los nucléolos (regiones sub-nucleares DAPI -, dato no

mostrado), que no se alteró por el tratamiento con ETO. Por su parte, la marcación de acK9/14H3 mostró también una distribución pan-nuclear de las señal.

Para analizar la relación entre ambas señales en los núcleos, se realizó un gráfico de *Scatter plot* donde se observó una relación no monótonica entre las variables (figura 9B). Por otra parte, no se observó una alteración significativa en la intensidad de fluorescencia de las señales nucleares de TDP1 luego del tratamiento con ETO en relación al vehículo (figura 9C). Sin embargo, se determinó que luego del tratamiento con ETO, ocurrió una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia correspondiente a las señales de acK9/14H3 (figura 9D).

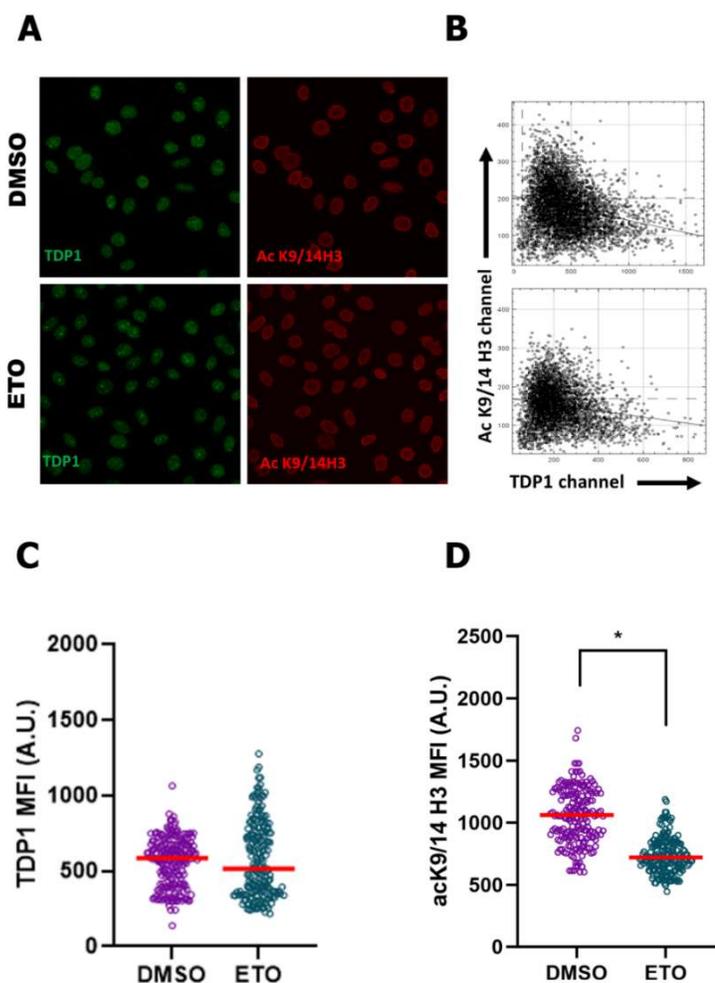


Figura 9. Análisis de la distribución de señales e intensidades de fluorescencia de TDP1 y acK9/14H3 en células HeLa en presencia o no de ETO. (A) Imágenes representativas de células

*HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o ETO 10 µg/ml por 1h (obj. 63X). (B) Gráficos de Scatter plot de señales TDP1 y acK9/14H3 para las células mostradas en (A). (C) Análisis de la media de intensidad de fluorescencia/unidad de área (MIF) de TDP1 en células tratadas con DMSO o ETO 10 µg/ml. La línea roja corresponde a la mediana de la intensidad de fluorescencia. A.U.: unidades arbitrarias. (D) Análisis de la media de intensidad de fluorescencia/unidad de área (MIF) de acK9/14H3 en células tratadas con DMSO o ETO 10 µg/ml. La línea roja representa la mediana de intensidad de fluorescencia. * $p < 0.0001$. A.U.: unidades arbitrarias.*

Varios de los sistemas métricos más utilizados para realizar determinaciones de asociación o colocalización entre señales, presentan diferentes inconvenientes que condicionan su utilización e interpretación cuando: i) se obtienen señales de baja intensidad comparada al background, o a las señales no específicas; ii) se encuentran relaciones no lineares entre las señales; iii) las señales presentan diferencias importantes en sus niveles de intensidad; o iv) cuando se observan patrones mixtos de localización.

Dada estas limitaciones, y teniendo en cuenta la relación observada entre las señales TDP1 y acK9/14H3 (Figura 9B), decidimos evaluar los eventos de colocalización entre señales mediante una matriz métrica denominada TOS (Threshold Overlap Score). Esta matriz permite obtener una visión de la asociación entre señales mediante valores calculados por una métrica que estima combinaciones de umbrales de intensidades entre ambas señales, y arroja un valor sencillo de interpretar y que difiere de otros métodos donde una elucidación certera es difícil de lograr. Además, se realizó también una estimación del factor M1 del coeficiente de correlación de Manders. En ambos casos, la asociación no monotónica entre las señales (Figura 9B) permite la utilización de ambos criterios de análisis.

En la Figura 10A, se observa una representación gráfica de la matriz métrica TOS para el tratamiento con el vehículo y con ETO (imágenes izquierda y derecha, respectivamente). En la Figura 10B puede observarse los resultados obtenidos mediante la métrica TOS. Como puede observarse, la asociación entre ambas señales se acerca al criterio de no colocalización, el cual se reduce aunque no de manera significativa luego del tratamiento con ETO. En la Figura 10C, se observa una ampliación de las marcaciones para TDP1 (izquierda) y acK9/14H3 (derecha),

expresado como mapa de calor, luego del tratamiento con ETO. Como puede observarse, las regiones de mayor concentración de señal de TDP1 no coinciden con aquellas regiones de mayor densidad de señal acK9/14H3 y viceversa.

Dado que la medición TOS considera las variaciones e interrelación entre ambas señales, y teniendo en consideración que las señales acK9/14H3 se redujeron considerablemente por el tratamiento con ETO, determinamos además la fracción de señal TDP1 que se asocia a la señal acK9/14H3 mediante el componente M1 del coeficiente de colocación de Manders. Como se observa en la Figura 10D, luego del tratamiento con ETO, la fracción de TDP1 que se mantiene asociada a regiones que presentan señales de acK9/14H3 se reduce de manera significativa.

Por lo tanto, concluimos que la asociación de TDP1 a regiones correspondientes a promotores y enhancers activos es baja y no se altera significativamente por el tratamiento con ETO. Sin embargo, se observa una reducción en la fracción de TDP1 que permanece asociada a dichas regiones.

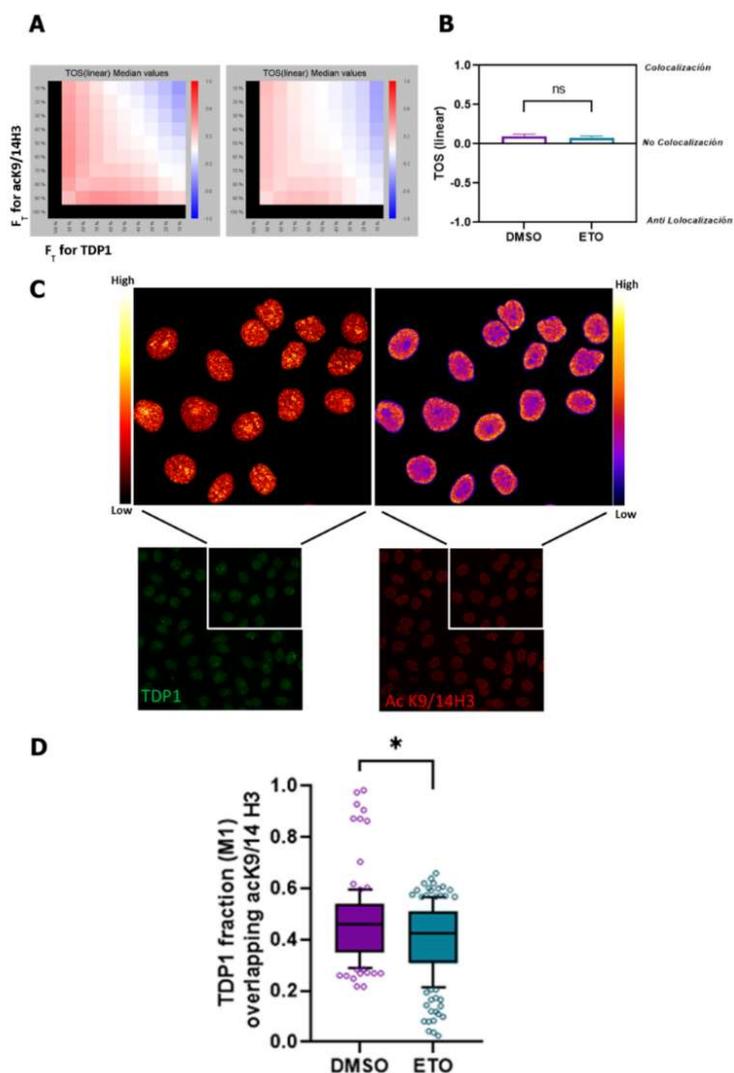


Figura 10. TDP1 aumenta su asociación a promotores/enhancers activos en respuesta al tratamiento con ETO. (A) Imágenes representativas de la matriz TOS (escala lineal) entre las señales de TDP1 y acK9/14H3 en células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o con ETO 10 $\mu\text{g/ml}$ por 1h. FT= porcentaje superior de intensidad de pixeles para el canal mencionado. (B) Resultados de la matriz métrica TOS (media \pm SD) para la asociación entre señales de TDP1 y acK9/14H3. Coloc: colocalización completa de señales; no coloc: no colocalización; anti Loc: anti localización completa. ns= no significativo. (C) Imágenes representativas de las marcaciones para TDP1 y acK9/14H3 de células HeLa tratadas con ETO 10 $\mu\text{g/ml}$ por 1h, expresadas como

*mapas de calor (Heat map) de acuerdo a su intensidad de señal. (D) Fracción de TDP1 (M1) asociada a señales acK9/14H3 luego del tratamiento con ETO por 1h. Se presenta en gráfico de caja-bigotes los percentiles 10-90, provenientes del análisis de 200 núcleos por tratamiento de 3 experimentos individuales. * $p=0.023$.*

A continuación, y para corroborar la disminución en la asociación de TDP1 con regiones eucromáticas luego del tratamiento con ETO, realizamos experiencias de doble inmunomarcación de TDP1 con RNPII y se analizaron mediante microscopía confocal.

Con esta finalidad, las muestras de células HeLa creciendo en monocapa fueron tratadas y al tiempo de análisis fueron sujetas a una permeabilización e incubación con buffer conteniendo bajas cantidades de sales, previo a la fijación de las mismas, lo cual permitió remover todas aquellas moléculas tanto de TDP1 como de RNPII que no se encontraran unidas a la cromatina.

En la Figura 11A se observan imágenes de inmunofluorescencia donde se puede apreciar ambas señales en presencia o no del tratamiento con ETO. Si bien la marcación de TDP1 fue descrita previamente, las señales de RNPII mostraron también una distribución pan-nuclear en forma de espículas, con porciones vacías de marcación en aquellos lugares que se relacionan a la presencia de nucléolos. De manera interesante, luego del tratamiento con ETO se observó una pérdida considerable en la cantidad de señal colectada de RNPII. El análisis por *Scatter plot* de la relación entre las señales (Figura 11B) mostró nuevamente un tipo de asociación no monotónica.

Por su parte, los niveles de intensidad de fluorescencia de TDP1 no se vieron modificados por el tratamiento con ETO, como observado previamente. Sin embargo, la medición de intensidad de fluorescencia de RNPII en la población celular luego del tratamiento con ETO, mostró una clara y significativa reducción de dicha señal.

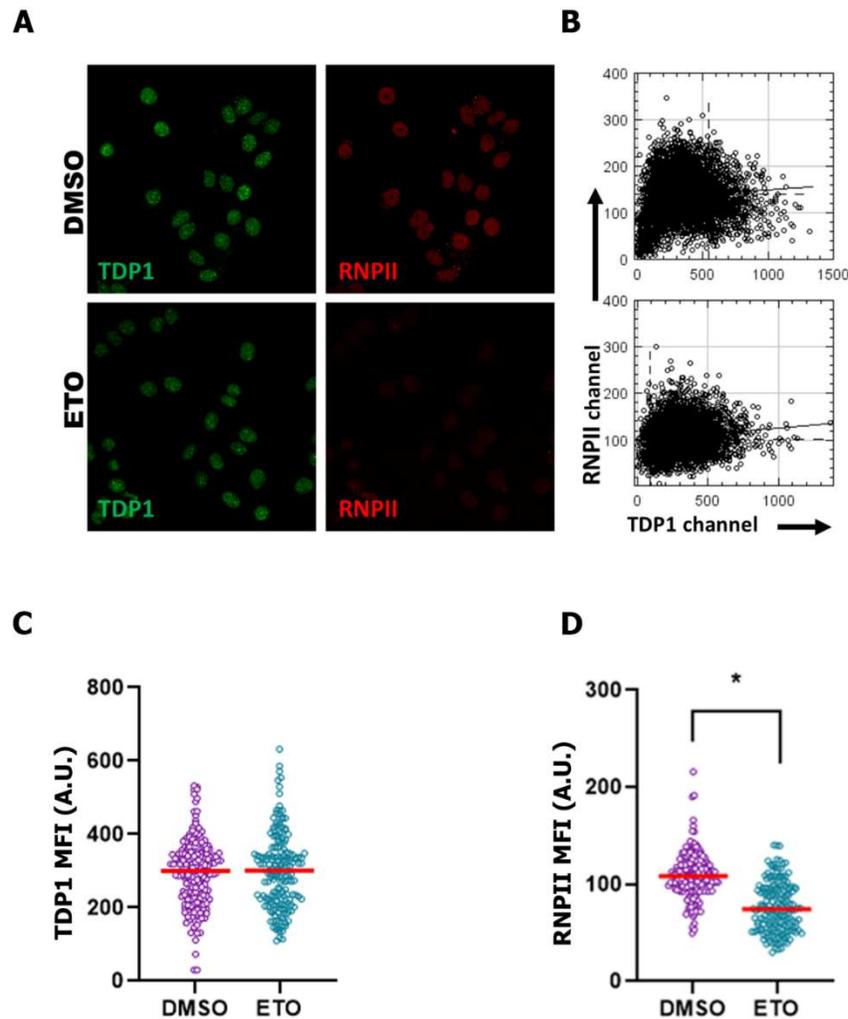


Figura 11. Análisis de la distribución de señales e intensidades de fluorescencia de TDP1 y RNPII en células HeLa en presencia o no de ETO. (A) Imágenes representativas de células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o ETO 10 µg/ml por 1h (obj. 63X). (B) Gráficos de Scatter plot de señales TDP1 y RNPII para las células mostradas en (A). (C) Análisis de la media de intensidad de fluorescencia/unidad de área (MFI) de TDP1 en células tratadas con DMSO o ETO 10 µg/ml. La línea roja corresponde a la mediana de la intensidad de fluorescencia. A.U.: unidades arbitrarias. (D) Análisis de la media de intensidad de fluorescencia/unidad de área (MFI) de RNPII en células tratadas con DMSO o ETO 10 µg/ml. La línea roja representa la mediana de intensidad de fluorescencia. * $p < 0.0001$. A.U.: unidades arbitrarias.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos realizar el análisis de colocalización o asociación entre señales mediante la matriz métrica TOS, y luego se calculó el factor M1 del coeficiente de colocalización de Manders. Ambos tipos de análisis son factibles de realizar frente a variables que presentan una asociación no monotónica, como explicado previamente.

En la Figura 12A se observan gráficos representativos de las matrices métricas con los valores TOS de acuerdo a las señales presentadas por las células tratadas con el vehículo o con ETO (izquierda y derecha, respectivamente) y divididas en percentiles. La Figura 12B muestra los resultados del análisis métrico TOS de la relación entre señales en escala lineal para TDP1 y RNPII. Como se observa, la asociación entre señales tiende a una no colocalización, es baja y disminuye aún más, aunque no significativamente, luego del tratamiento con ETO.

Por otra parte, en la Figura 12C se muestra mediante representaciones de mapas de calor, el análisis de distribución de patrones de marcación por cantidad de señal en células tratadas con ETO. A través de ellos se puede establecer que las regiones más densamente pobladas de señal de TDP1 no se asocian sustancialmente con aquellas observadas para la señal RNPII. Además, el análisis del factor M1 del coeficiente de colocalización de Manders (Figura 12D), el cual determina en este caso la fracción de la señal de TDP1 que se encuentra asociada a señales RNPII, demuestra una caída significativa de dicha fracción, luego de tratadas las células con ETO.

En conjunto, estos resultados demuestran que en respuesta al tratamiento con ETO, existe una redistribución de las señales de TDP1 y una disminución de señales RNPII, que conlleva a una menor asociación de ambas señales sobre regiones eucromáticas que concentran la actividad de elongación de RNPII.

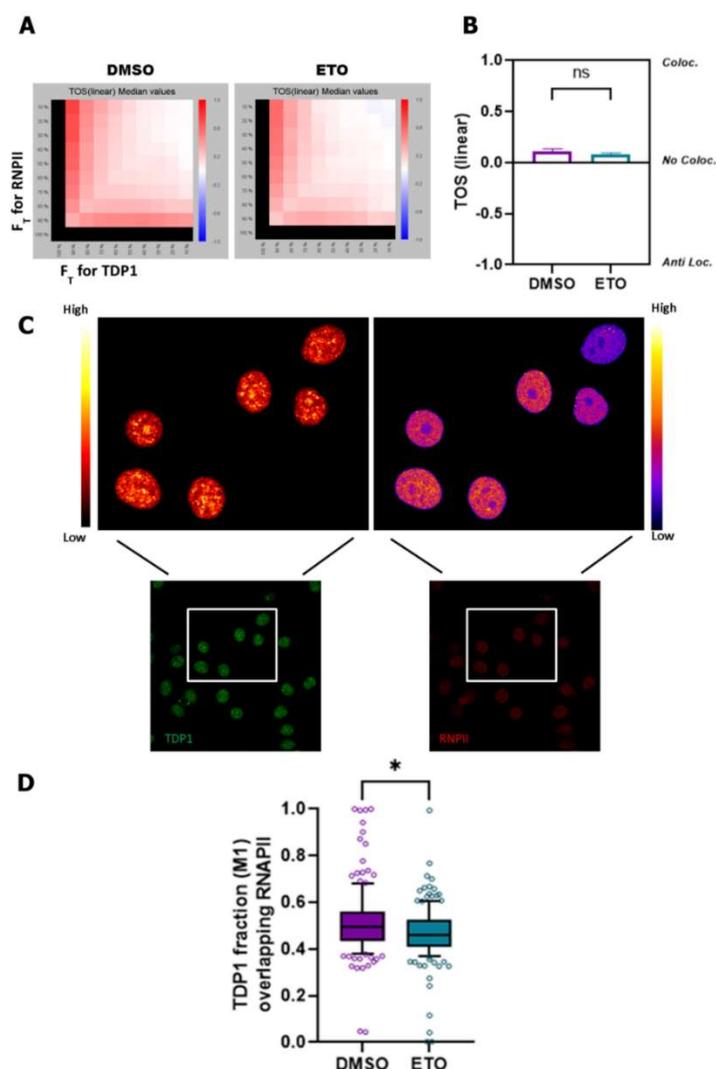


Figura 12. TDP1 aumenta su asociación a regiones transcripcionalmente activas en respuesta al tratamiento con ETO. (A) Imágenes representativas de la matriz TOS (escala lineal) entre las señales de TDP1 y RNPII en células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o con ETO 10 $\mu\text{g/ml}$ por 1h. F_T = porcentaje superior de intensidad de pixeles para el canal mencionado. (B) Resultados de la matriz métrica TOS (media \pm SD) para la asociación entre señales de TDP1 y RNPII. Coloc: colocalización completa de señales; no coloc: no colocalización; anti Loc: anti localización completa. ns= no significativo. (C) Imágenes representativas de las marcaciones para TDP1 y RNPII de células HeLa tratadas con ETO 10 $\mu\text{g/ml}$ por 1h, expresadas como mapas de calor (Heat

*map) de acuerdo a su intensidad de señal. (D) Fracción de TDP1 (o M1) asociada a señales RNPII luego del tratamiento con ETO por 1h. Se presenta en gráfico de caja-bigotes los percentiles 10-90, provenientes del análisis de 200 núcleos por tratamiento de 3 experimentos individuales. * $p=0.0024$.*

ASOCIACIÓN DE TDP1 A COMPARTIMENTOS HETEROCROMÁTICOS EN RESPUESTA A ETO:

Para determinar si la disminución en la asociación de TDP1 con regiones eucromáticas en respuesta a ETO se correlaciona con un incremento de su asociación a regiones heterocromáticas, realizamos experiencias de inmunomarcación de TDP1 junto al marcador de heterocromatina constitutiva HP1 α .

En la Figura 13A se observan imágenes representativas de la doble marcación para TDP1 y HP1 α en células HeLa, luego del tratamiento con el vehículo o ETO. En las imágenes pueden observarse acumulaciones de HP1 α en zonas perinucleares o incluso en zonas que rodean a los nucléolos, característicos de las regiones de heterocromatina constitutiva.

Al observar la relación entre las señales mediante gráficos de *Scatter plot* (Figura 13B), la distribución de las mismas muestran una relación no lineal monotónica débil entre las variables.

Al evaluar en la población de células HeLa las intensidades de fluorescencia de ambos marcadores, entre el vehículo y el tratamiento con ETO, se observó que TDP1 se mantuvo sin grandes variaciones (Figura 13C), como visto anteriormente. Sin embargo, la señal de HP1 α se incrementó de forma significativa luego del tratamiento con ETO (Figura 13D).

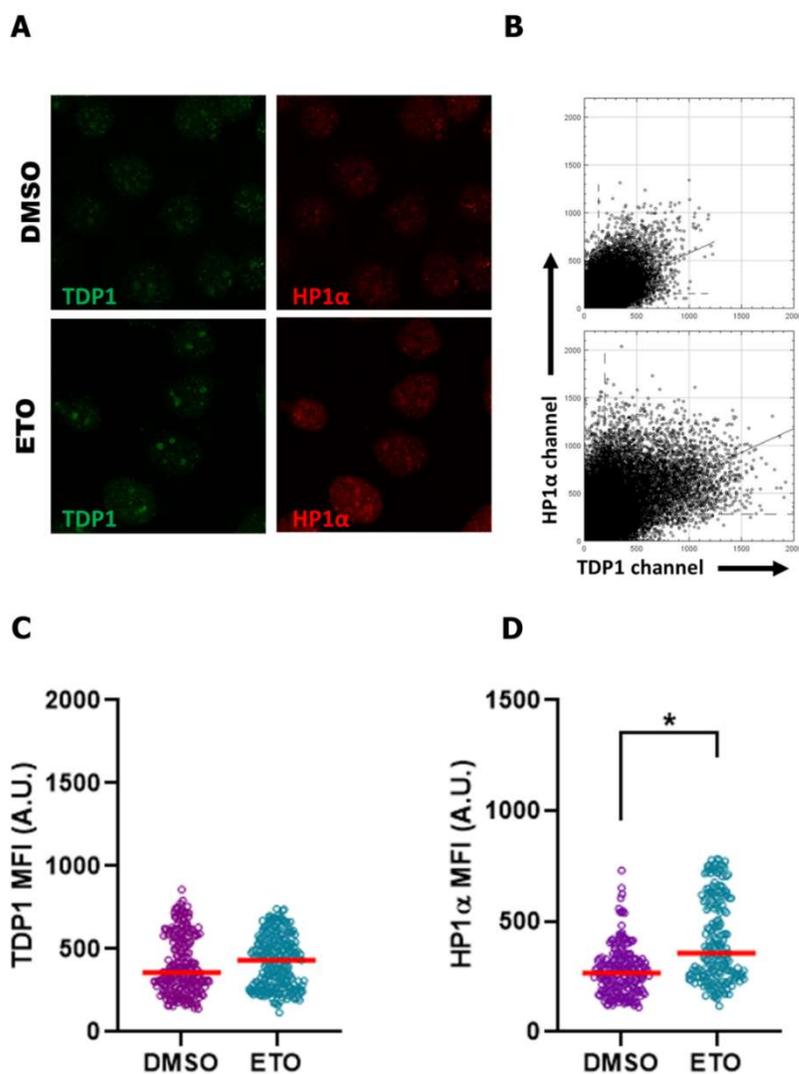


Figura 13. Análisis de la distribución de señales e intensidades de fluorescencia de TDP1 y HP1 α en células HeLa en presencia o no de ETO. (A) Imágenes representativas de células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o ETO 10 μ g/ml por 1h (obj. 63X, zoom electrónico 3X). (B) Gráficos de Scatter plot de señales TDP1 y HP1 α para las células mostradas en (A). (C) Análisis de la media de intensidad de fluorescencia/unidad de área (MIF) de TDP1 en células tratadas con DMSO o ETO 10 μ g/ml. La línea roja corresponde a la mediana de la intensidad de fluorescencia. A.U.: unidades arbitrarias. (D) Análisis de la media de intensidad de fluorescencia/unidad de área (MIF)

*de HP1 α en células tratadas con DMSO o ETO 10 μ g/ml. La línea roja representa la mediana de intensidad de fluorescencia. * $p < 0.0001$. A.U.: unidades arbitrarias.*

Dado que frente a relaciones entre variables no lineares monotónicas, la utilización de una métrica TOS o el cálculo de factores pertenecientes al coeficiente de colocalización de Manders se ajustan en forma adecuada, se realizó el análisis de asociación de las mismas mediante dichas estimaciones. En la Figura 14A se muestran gráficos representativos de las matrices TOS de acuerdo a las señales presentadas por las células tratadas con el vehículo o con ETO (imágenes izquierda y derecha, respectivamente) sub-divididas en porcentajes. En la Figura 14B se detallan los resultados del análisis métrico TOS de la relación entre señales para TDP1 y HP1 α . Como se observa, la asociación entre señales muestra un mayor grado de colocalización de señales, la cual se incrementa de manera significativa luego de realizado el tratamiento con ETO.

Por otra parte, en la Figura 14C se muestra mediante representaciones de mapas de calor, el análisis de distribución de patrones de marcación por cantidad de señal en células tratadas con ETO. A través de ellos, se puede determinar que varias de las regiones más densamente pobladas de señal de TDP1 se asocian de forma sustancial con regiones densamente pobladas de señales HP1 α . En línea con este análisis, el cálculo del factor M1 del coeficiente de colocalización de Manders (Figura 14D), el cual refleja la fracción de la señal de TDP1 que se encuentra asociada a señales HP1 α , demuestra un incremento significativo en dicha fracción, luego de tratadas las células con ETO.

Por lo tanto, de estos experimentos concluimos que el tratamiento con ETO conduce a una redistribución de TDP1 que incrementa su asociación a regiones de heterocromatina constitutiva, caracterizadas por la presencia de la proteína HP1 α .

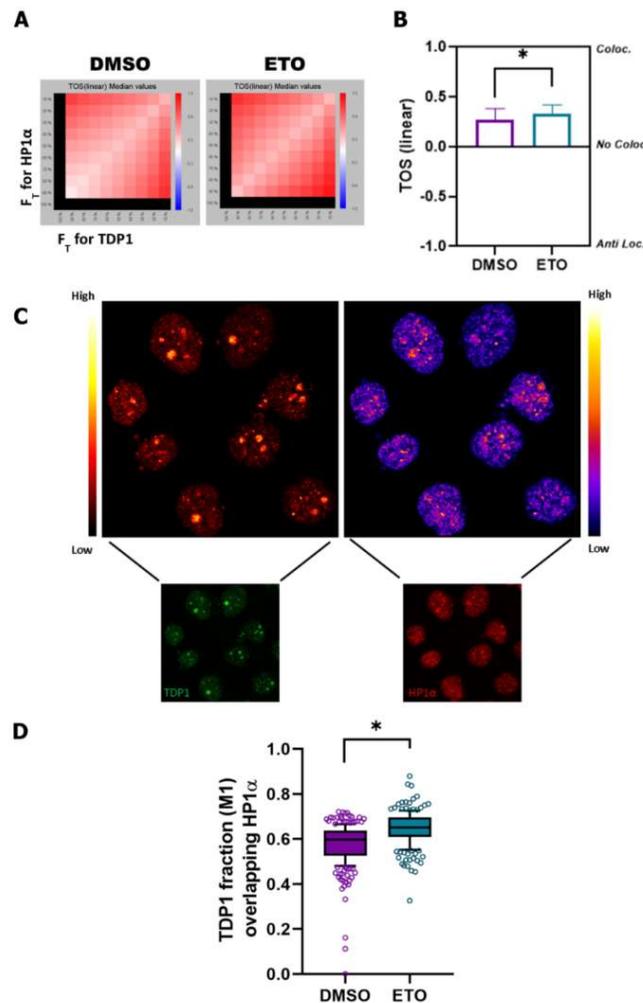


Figura 14. TDP1 aumenta su asociación a marcadores heterocromáticos en respuesta al tratamiento con ETO. (A) Imágenes representativas de la matriz TOS (escala lineal) entre las señales de TDP1 y HP1α en células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o con ETO 10 µg/ml por 1h. FT= porcentaje superior de intensidad de pixeles para el canal mencionado. (B) Resultados de la matriz métrica TOS (media±SD) para la asociación entre señales de TDP1 y HP1α. Coloc: colocalización completa de señales; no coloc: no colocalización; anti Loc: anti localización completa. * $p < 0.0001$. (C) Imágenes representativas de las marcaciones para TDP1 y HP1α de células HeLa tratadas con ETO 10 µg/ml por 1h, expresadas como mapas de calor (Heat map) de acuerdo a su intensidad de señal. (D) Fracción de TDP1 asociada a señales HP1α luego del tratamiento con ETO por 1h. Se presenta en gráfico de caja-bigotes los percentiles 10-90,

*provenientes del análisis de 250-300 núcleos por tratamiento de 3-4 experimentos individuales.
* $p < 0.0001$.*

Con el objetivo de corroborar que existe una asociación preferencial de TDP1 con regiones de heterocromatina constitutiva en respuesta a ETO, y poder determinarlo mediante una metodología de mayor sensibilidad, realizamos experiencias de inmunoprecipitación de la cromatina, asociado al análisis de secuencias de ADN mediante qPCR (ChIP-qPCR).

Para ello, y luego de fragmentar la cromatina a tamaños entre 200-500pb mediante sonicación, se realizó la inmunoprecipitación de la cromatina asociada a TDP1 utilizando anticuerpos específicos (TDP1Ab).

Como se observa en la Figura 15A, la sonicación de las diferentes muestras produjo una fragmentación de la cromatina en forma homogénea. Los fragmentos de ADN fueron luego purificados, y se realizaron las qPCRs con primers dirigidos contra una secuencia consenso de ADN α -satélite, característica de heterocromatina centromérica y pericentromérica.

Como se observa en la Figura 15B, las células tratadas con ETO mostraron un incremento de ~6,5 veces su unión a regiones que presentan secuencias α -satélites en comparación al control no tratado.

Por lo tanto, estos resultados confirmaron una asociación aumentada de TDP1 a regiones de heterocromatina constitutiva, particularmente a secuencias α -satélites, en respuesta al tratamiento con el veneno de Top2 ETO.

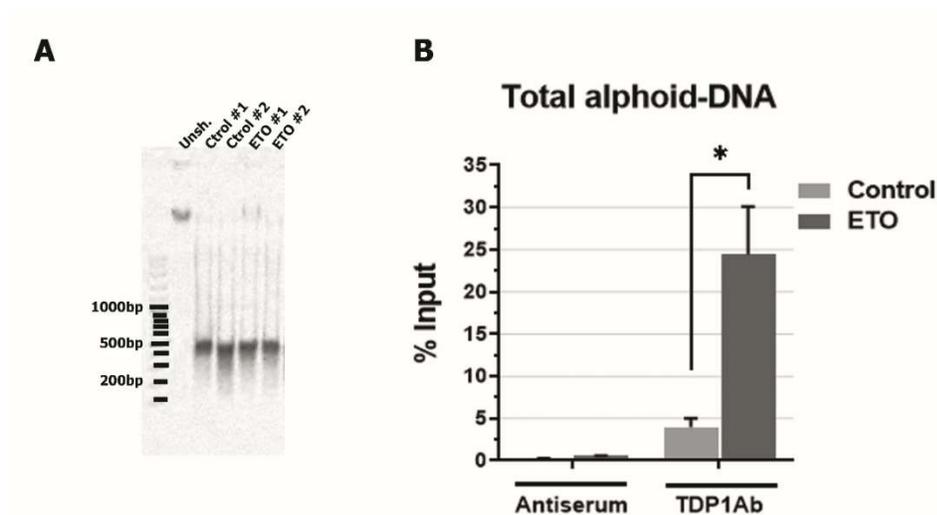


Figura 15. TDP1 incrementa su asociación a regiones α -satélites del ADN en respuesta al tratamiento con ETO. Las células HeLa tratadas o no con ETO 10 $\mu\text{g/ml}$ por 1h fueron fijadas, sonicadas para generar fragmentos entre 300 y 500 pb, luego inmunoprecipitadas y el ADN purificado. Las muestras fueron analizadas mediante qPCR con primers específicos dirigidos contra una secuencia consenso de ADN α -satélite. (A) Gel de agarosa mostrando la uniformidad relativa de fragmentación de las diferentes muestras. Unsh: ADN control sin sonicar; Ctrol#1 y Ctrol#2: ADN de controles sonicados; ETO#1 y ETO#2: ADN de células tratadas con ETO por 1h y que fueron luego sonicadas. (B) Resultado de la cuantificación por qPCR a partir del ADN inmunoprecipitado, expresado como % del input. El análisis ha sido realizado en 2 experiencias independientes. * $p < 0.02$.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados, podemos concluir que:

- La enzima TDP1 muestra una baja asociación a regiones del genoma que se corresponden tanto a promotores y *enhancers* activos, como así también a regiones transcripcionalmente activas, características de regiones eucromáticas en las células humanas.
- TDP1 muestra un mayor grado de asociación a regiones que presentan señales de la proteína HP1 α , lo cual caracteriza a las regiones de heterocromatina constitutiva del genoma de las células humanas.
- En respuesta al veneno de Top2 ETO, la enzima TDP1 muestra una redistribución e incrementa su asociación a regiones de heterocromatina constitutiva, y particularmente a secuencias α -satélites, a expensas de una disminución en su asociación a regiones eucromáticas del genoma humano.

DISCUSIÓN

La enzima Top2 está encargada de regular la topología del ADN a través de la inducción temporaria de DSB. Su actividad resulta fundamental para que se lleven a cabo de forma regular procesos metabólicos celulares normales tales como la transcripción y la replicación. Top2 presenta funciones diversas, incluidas tanto su actividad catalítica como su participación de soporte o esqueleto proteico sobre los cromosomas, lo cual le permite intervenir en una variedad de procesos celulares. Esta acción pleiotrópica de Top2 es una de las bases de su elección como blanco de acción para drogas que actúan como venenos de Top2, tales como el ETO.

Se ha reportado que Top2 tiene actividad catalítica tanto en la eucromatina como en la heterocromatina (*Agostinho et al., 2004; Blattes et al., 2006; Govoni et al., 1995*), lo cual es congruente con que puede inducir DSB en ambos compartimentos al verse interrumpida su actividad.

Las PTM de histonas afectan la estructura de la cromatina e influyen directamente en la función de un gen, ya sea activando o inhibiendo la transcripción según: el tipo de PTM, el residuo que se modifica, y la distribución de histonas modificadas a lo largo del gen (*Schneider & Grosschedl, 2007*). El estado de acetilación de los residuos de lisina, incluidos los de la cola N-terminal de las histonas, está controlado por las histonas desacetilasas (HDAC) y las histonas acetiltransferasas (HAT). Estas también modulan proteínas no histonas a través de la acetilación/desacetilación, incluyendo factores de transcripción y co-reguladores (*Glozak et al., 2005*). Diferentes líneas de evidencia experimental vinculan HDAC y HAT con Top2, y con la respuesta al tratamiento con ETO. Se ha encontrado HDAC1/2 en un complejo funcional con Top2 α/β in vivo (*Tsai et al., 2000*). Además, Top2 es un componente integral del complejo NuRD que también contiene HDAC1/2 y una actividad remodeladora de cromatina dependiente de ATP (*Tong et al., 1998*).

Estudios previos reportaron que la actividad de Top2 está restringida principalmente a los promotores de los genes activos, y que las DSB inducidas por Top2 β están enriquecidas en los sitios de comienzo de la transcripción, en forma proporcional a la longitud de los transcritos (*Baranello et al., 2014; Yang et al., 2015*). Sin embargo, un análisis reciente por ChIP-seq reveló

que la unión de Top2 β no está confinada a promotores, sino que se asocia, en general, a regiones abiertas de cromatina (*Uusküla-Reimand et al., 2016*).

Se reportó previamente que TDP1 tiene una localización tanto nuclear como mitocondrial (*Das et al., 2010; Zhou et al., 2005*), en ambos casos relacionado a actividades de reparación sobre el ADN. Sin embargo, existen pocos datos respecto a su actividad en diferentes compartimentos sub-nucleares. La utilización de un método de pre-extracción de proteínas libres en el nucleoplasma, nos permitió identificar, mediante los mapas de calor, regiones enriquecidas o acúmulos de TDP1 que se encontraban unidas a la cromatina en compartimentos tales como los nucléolos. El nucléolo es una sub-estructura nuclear altamente dinámica que se describió originalmente como el sitio de biogénesis de los ribosomas. Estudios proteómicos han permitido la identificación de más de 4500 proteínas relacionadas al nucléolo y solo el 30% de ellas están asociadas con la ribogénesis (*Boulton et al., 2010*). El gran número de proteínas no asociadas a funciones nucleolares tradicionales indica un papel del nucléolo en otros procesos celulares como la mitosis, la progresión del ciclo celular, la proliferación celular y muchas formas de respuesta al estrés, incluida la reparación del ADN (*Andersen et al., 2002*). Los nucléolos pueden detectar y responder al estrés celular secuestrando y liberando una variedad de proteínas. Las proteínas pueden asociarse transitoriamente con los nucléolos o acumularse bajo condiciones metabólicas específicas. Por lo tanto, la composición de proteínas del nucléolo puede alterarse significativamente en respuesta a diferentes estados metabólicos o estrés.

Las señales de TDP1 observadas en los nucléolos no mostraron variaciones detectables por el tratamiento con ETO. Resultados similares fueron reportados previamente luego de expresar una quimera GFP-TDP1 fluorescente y exponer a ETO (*Barthelmes et al., 2004*). Sin embargo, luego de la exposición al veneno de Top1 camptotecina, observaron una depleción de TDP1 de los nucléolos y una redistribución hacia el nucleoplasma.

Nuestros resultados indicaron además que en ausencia o presencia de ETO, TDP1 no presenta colocalización con regiones laxas de la cromatina que exhiben señales de acetil K9/14 de la histona H3. La disminución en la fracción de TDP1 que se mantiene asociada a acetil K9/14 H3 luego del tratamiento con ETO, puede deberse al menos en parte a la disminución observada en las

señales de acetil K9/14 H3 inducida por el tratamiento. Esta disminución en la intensidad de señales acetil K9/14 H3 resultó llamativa, aunque podría deberse a un desbalance de las actividades HAT y HDAC inducido por el estímulo. En este sentido, estudios recientes han reportado diferencias de expresión génica en HDACs luego del tratamiento con ETO (*Ali et al., 2020*).

Se ha determinado en células humanas que acetil K9/14 de la histona H3 se encuentra enriquecida sobre regiones 5' de genes transcripcionalmente activos, y disminuidos considerablemente río abajo de los sitios de comienzo de la transcripción (*Liang et al., 2004*). Esto implicaría que la función de TDP1 no está asociada con un rol reparador sobre regiones correspondientes a promotores o enhancers activos, o zonas relajadas de la cromatina donde Top2 β pueda mostrar actividad catalítica.

En los últimos años se han desarrollado nuevas metodologías para mapear de forma masiva la formación de Top2cc a lo largo del genoma: i) de modo indirecto, a través de las DSB que se generan luego del tratamiento con ETO (END-seq, (*Canela et al., 2017*); o ii) de forma directa, mediante la purificación de los Top2cc-ADN inducidos por ETO (CC-seq, (*Gittens et al., 2019*)). De modo interesante, este último encontró una relación cuantitativa entre la actividad de Top2 y la transcripción en las regiones intragénicas luego del sitio de comienzo de la transcripción. Sin embargo, el mapeo por END-seq no encontró relación alguna entre las DSB inducidas y la transcripción. Por lo tanto, la localización física en el genoma de los sitios de actividad de Top2 en relación con la posición y la actividad transcripcional permanece aún en debate.

Una vez iniciada la transcripción génica, la enzima RNPII junto a sus factores asociados, están encargados de llevar adelante el proceso de elongación de la transcripción de un modo discontinuo (*Svejstrup, 2007*). Esto ocurre debido a que a medida que la burbuja transcripcional avanza, RNPII encuentra lesiones que resultan en el bloqueo al paso de la misma. Entre las lesiones que generan bloqueos durante la elongación de la transcripción se encuentran los aductos producidos por radiación UV, las bases oxidadas, los aductos carcinógeno-ADN, y los aductos Top2-ADN inducidos por ETO o la doxorubicina (*Anindya et al., 2007; Ban et al., 2013; Ratner et al., 1998*).

Nuestros resultados muestran que las señales de TDP1 no colocalizan con la fracción de RNPII que se encuentra llevando a cabo la elongación de la transcripción, y que frente a bloqueos impuestos por la presencia de Top2cc inducidos por ETO, no se altera dicha asociación. Esto implicaría que las funciones de reparación de TDP1 no estarían asociadas a regiones de la eucromatina con una transcripción activa. Por otra parte, la disminución en la fracción de TDP1 asociada a RNPII puede responder a la baja de intensidad de señales de RNPII a consecuencia de los bloqueos mediados por Top2 e inducidos por ETO. Estos bloqueos despiertan una serie de respuestas que incluyen el arresto de la RNPII durante la elongación y la degradación de la subunidad grande (LS) de la misma. El arresto de RNPII generalmente se evidencia mediante la acumulación de una forma hiperfosforilada, principalmente en S2 y S5 de su dominio C-terminal. La acumulación de la forma hiperfosforilada de RNPII es seguida por la degradación dependiente de ubiquitina mediada por el proteosoma (*Kong et al., 2009*). Sin embargo, se han reportado además mecanismos de degradación de RNPII independiente de ubiquitina y mediada por proteosoma (*Ban et al., 2013*). En este último caso, cuando la RNPII que lleva a cabo la elongación se encuentra estancada por la presencia de un Top2cc β -ADN, la RNPII bloqueada sirve como señal de daño. Por lo tanto, las subunidades de 19S ATPasas asociadas a RNPII se activan luego del reconocimiento de una barrera proteica de Top2 β . Esto recluta al proteosoma 20S, que luego de la desnaturalización de Top2 β mediada por las 19S ATPasas, permitirán la degradación proteica tanto de Top2 como de RNPII por el complejo 20S. Esto explica la reducción de señales de RNPII observada luego del tratamiento con ETO.

Dado que nuestros resultados sugieren que la localización de TDP1 en respuesta a ETO no está asociada a regiones eucromáticas correspondientes a secuencias génicas regulatorias (promotores y enhancers activos), como así tampoco frente a regiones transcripcionalmente activas cuya elongación depende de RNPII, analizamos su asociación al compartimento heterocromático.

Dentro de la heterocromatina constitutiva, las histonas se encuentran hipoacetiladas e hipermetiladas en el residuo K9 de la histona H3 (me2/me3K9 H3). Este último tipo de PTM, representa un sitio de unión para las isoformas de HP1 (heterochromatin protein 1). Esto permite que HP1 auto-oligomerize y contribuya a la formación y mantenimiento de la heterocromatina.

Nuestros resultados revelan que las señales TDP1 presentan un mayor grado de colocalización con las señales de HP1 α , y que en respuesta al veneno de Top2 ETO, la colocalización entre ambas señales aumenta de forma significativa. Sin embargo, la intensidad de señales HP1 α se vio incrementada luego del tratamiento con ETO. Aumentos en la intensidad de señales de HP1 α han sido descriptos en la literatura luego de tratamientos combinados entre inhibidores de HDACs y radiaciones γ (*Legartová et al., 2019*). Por tanto, es factible que estas variaciones estén relacionadas con modificaciones en la cromatina por factores remodeladores de la misma, en respuesta a las DSB generadas. De manera interesante, los mapas de calor sugieren que la concentración de señales TDP1 y HP1 α en regiones discretas se encuentran favorecidas luego del tratamiento con ETO. Si bien el rol de los diferentes parálogos de HP1 sobre la reparación del ADN ha sido descripta en la literatura, se han observado diferentes respuestas relacionadas con el agente inductor de daño y el tipo de lesión generadas.

Teniendo en consideración que en respuesta a ETO la mayor fracción de TDP1 (M1) asociada a señales HP1 α podría explicarse por la mayor presencia de esta última, decidimos analizar la asociación de TDP1 a secuencias α -satélites sobre la heterocromatina constitutiva mediante ChIP-qPCR. Los resultados demostraron que la fracción de TDP1 asociado a estas secuencias repetitivas presentes en la heterocromatina constitutiva se vio incrementada de forma significativa. Esto nos permite inferir que en respuesta a ETO, TDP1 aumenta su asociación a dichas regiones.

La señalización al ADN dañado o la reparación de una lesión en un compartimento nuclear, puede diferir respecto a otro. Esto ha sido demostrado en estudios sobre ADNr (*Korsholm et al., 2019*), e incluso en secuencias difíciles de replicar como la heterocromatina pericentromérica (*Mendez-Bermudez et al., 2018*).

Nuestros resultados generan varios interrogantes respecto a la contribución relativa de TDP1 y TDP2 a la reparación de lesiones generadas por los venenos de Top2 sobre diferentes sub-compartimentos nucleares. Cabe destacar que estudios recientes relacionaron a la actividad de TDP2 con la reparación de DSB generadas por los venenos de Top2 sobre regiones transcripcionalmente activas (*Gómez-Herrero et al., 2017*). Esto podría representar una verdadera

división de tareas para las Tirosil-ADN-fosfodiesterasas, frente a un mismo tipo de lesión. Contrariamente, la concentración de señales TDP1 sobre regiones de heterocromatina en respuesta a ETO, podría representar una forma de restringir la actividad de TDP1 para evitar errores mientras TDP2 se encarga de la remoción de aductos de Top2 sobre regiones sensibles del ADN.

Posteriores estudios estarán dirigidos a responder estas preguntas y determinar si resultan relevantes con el objeto de obtener un mayor entendimiento sobre la reparación de DSB generadas por agentes que actúan como venenos de Top2, o si podría tener implicancia sobre el desarrollo de nuevas terapias o terapias combinadas que se traduzcan en una disminución del espectro de efectos adversos que suelen observarse con estos agentes.

ANEXO DE RESULTADOS

INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (CHIP)

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) es una técnica poderosa para mapear la distribución de proteínas asociadas al ADN cromosómico in vivo. Estas proteínas pueden ser histonas, y modificaciones postraduccionales de las mismas, u otras proteínas asociadas a la cromatina tales como factores de transcripción, reguladores de la cromatina, entre otros. Además, ChIP es una herramienta de gran utilidad para identificar regiones del genoma asociadas a proteínas específicas, o para identificar proteínas asociadas con una región particular del genoma. Como se muestra en la Figura 16, la metodología de X-ChIP, implica el cross-linking de proteína-ADN y proteína-proteína la fragmentación de dichos aductos y la posterior inmunoprecipitación de la cromatina con un anticuerpo específico para una proteína objetivo de estudio, en este caso la enzima TDP1-alfa. Los fragmentos de ADN aislados unidos a la proteína target blanco se puede identificar por una variedad de métodos, incluyendo PCR, microarrays de ADN y secuenciación de ADN. Las técnicas de PCR tradicional o la PCR cuantitativa en tiempo real se utilizan a menudo para verificar si una secuencia de ADN específica (un gen o región del genoma) están asociadas a una proteína en particular.

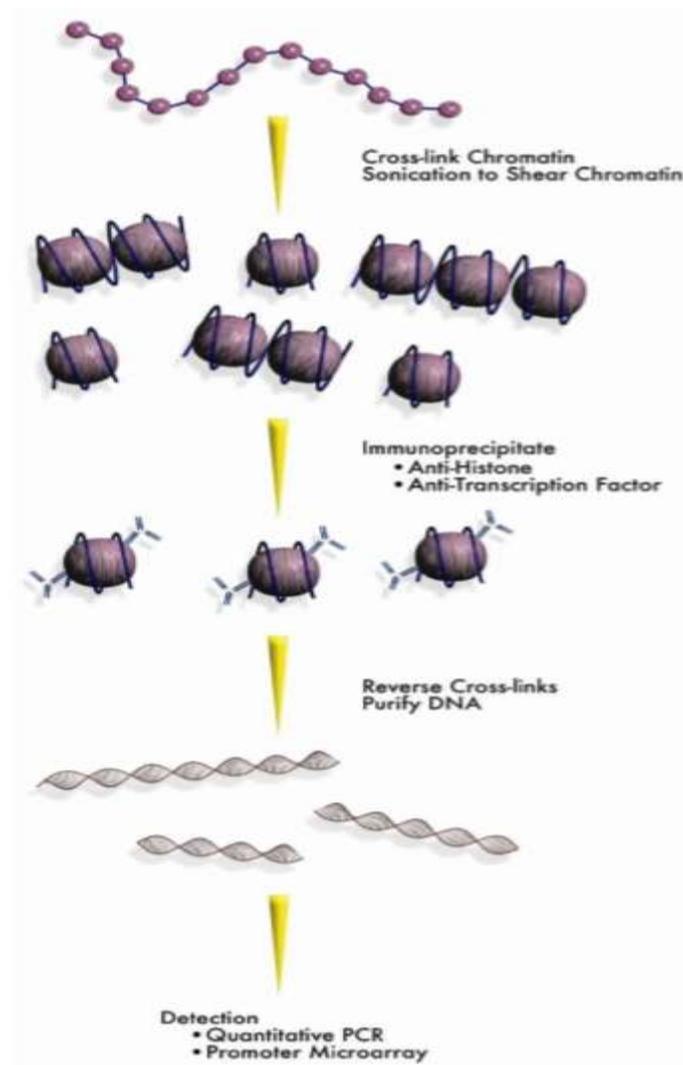


Figura 16: Flujo de trabajo con EZ-Magna Chip

PUESTA A PUNTO DE LA SONICACIÓN DE MUESTRAS:

PRUEBA DEL N° DE CICLOS PARA LA OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DEL TAMAÑO DESEADO:

Partiendo de un cultivo de aproximadamente 7×10^6 células, se realizó el cross-linking de las proteínas según el protocolo detallado de E-Chip y se las guardó a -80°C . Se contó la cantidad de células en una placa de crecimiento paralelo.

Se resuspendieron las células en buffer de lisis según protocolo, recordando utilizar los tubos especiales para el sonicador. Luego se realizó la sonicación de las muestras, se utilizaron solo 300 µl de los 500 debido a que es el máximo aconsejado para el Bioruptor Pico (Tabla 1). Lo cual corresponde aproximadamente a 3×10^7 células por cada tubo.

Los ciclos utilizados fueron de 15 seg On seguidos de 30 seg Off. Las muestras tomadas fueron de 0 Ciclos (Control), 2C, 4C, 6C, 8C y 10C. Por último, se incubaron las muestras con RNAsa a 37°C (o temperatura ambiente) por 30 min, 2 µl cada 300 µl. Luego se dejaron ON (o 2 hs 62°C) con Proteinasa K a 57°C. Dar un spin down antes de seguir, 2 ul (cantidad fija).

Se realizó la extracción de ADN según el protocolo de Extracción con Fenol : IAC (*tabla 1*) resuspendiendo el pellet en 40 µl final.

Extraccion de ADN						
	Muestra	SN1	SN2	CINa	Total	EtOH
0 ciclos	300	270	220	22	242	484
2 ciclos	300	250	220	22	242	484
4 ciclos	300	250	220	22	242	484
6 ciclos	300	250	220	22	242	484
8 ciclos	300	250	220	22	242	484
10 ciclos	300	250	220	22	242	484

Tabla 1. Extracción de ADN de muestras para probar tamaño de los fragmentos dependiendo del número de ciclos en posterior gel de agarosa.

Se sembró 8 µL + 2 µL LB del control de 0 ciclos y 12 µL + 3 µL para el resto de las muestras. Ladder 1000pb (5 µL). Los resultados se muestran en la figura 17.

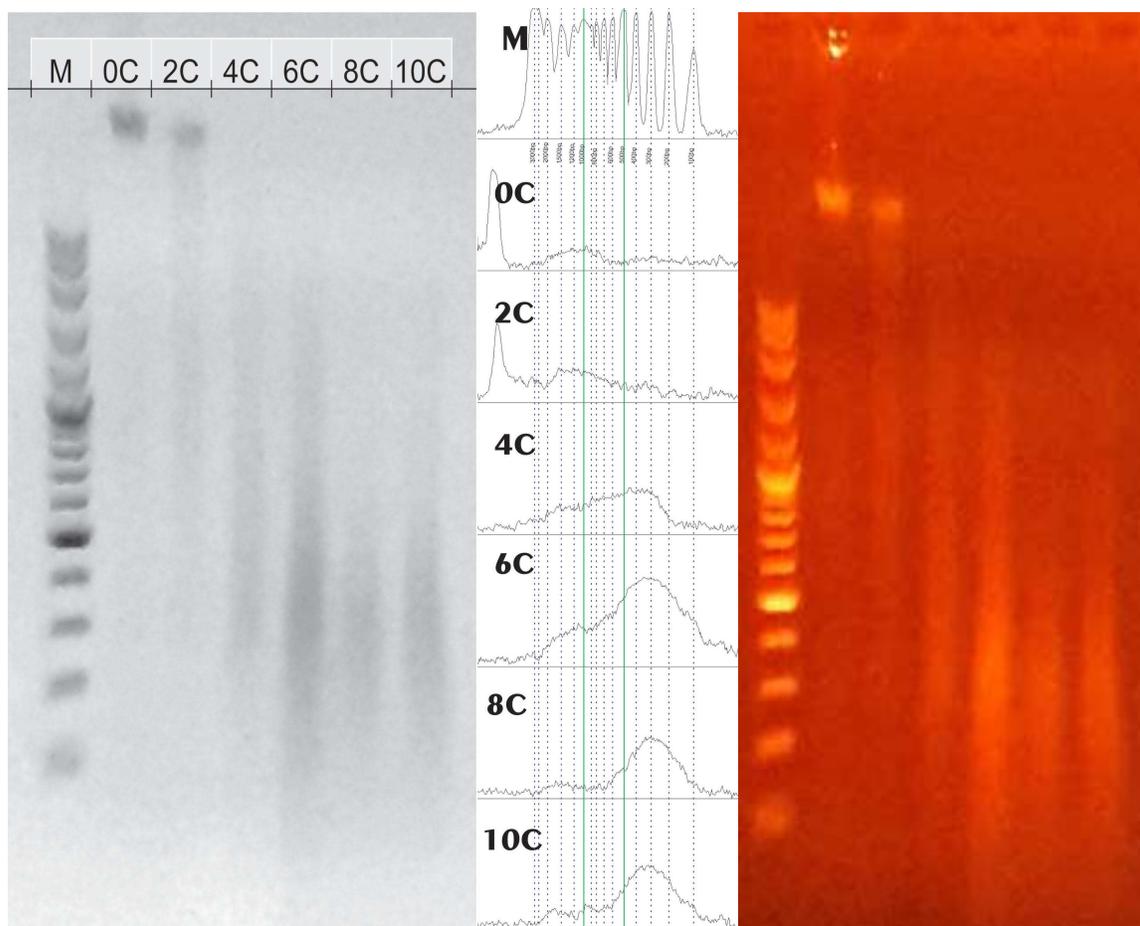


Figura 17. Gel de agarosa en el que se ven los distintos ciclos de sonicación.

Como se puede apreciar en la Figura 17, un número de 6 ciclos de sonicación a la densidad celular utilizada resulta suficiente para obtener fragmentos de ADN en el rango de tamaños necesarios para llevar a cabo luego la qPCR de las regiones genómicas de interés.

PRUEBA DE DIFERENCIAS EN EL SCRAPING Y CONFIRMACIÓN DE 6CICLOS COMO LA CANTIDAD DE CICLOS ÓPTIMO:

Se realizó el protocolo del kit EZMagna-ChIP de la misma forma que en el caso anterior. Se partió de un cultivo de aproximadamente 7 millones de células, se realizó el cross-linking de las proteínas según el protocolo y se las guardó a -80°C . Paralelamente se contó la cantidad de células

con una placa de crecimiento adicional. Se resuspendieron las células en buffer de lisis, quedando un volumen final de 300µl, lo que corresponde a 3 millones de células por cada tubo.

Los ciclos utilizados fueron de 15 seg On seguidos de 30 seg Off. Las muestras tomadas fueron de 0 Ciclos (Control) y tres muestras de 6 ciclos para analizar diferencias en el scraping. Por último, se incubaron las muestras con RNAsa a 37°C (o temperatura ambiente) por 30 min, 2 µl cada 300 µl. Luego se dejaron ON (o 2 hs 62°C) con Proteinasa K a 57°C. Se les dió un spin.

Se realizó la extracción de ADN según el protocolo de Extracción con Fenol:IAC (Tabla 2) resuspendiendo el pellet en 40 µl final.

Extracción de ADN						
	Muestra	SN1	SN2	CINa	Total	EtOH
0 ciclos	300ul	190ul	160ul	16	176	352
6 ciclos	300ul	290ul	250ul	25	275	550
6 ciclos	300ul	250ul	200ul	20	220	440
6 ciclos	300ul	250ul	200ul	20	220	440

Tabla 2. Extracción de ADN para corroborar tamaño de los fragmentos deseados con 6 ciclos y para observar diferencias en el scraping mediante un gel posterior.

Se sembraron 2 µL + 0,5 µL LB del control de 0 ciclos y 4 µL + 1 µL para el resto de las muestras. Ladder 1000pb (5 µL).

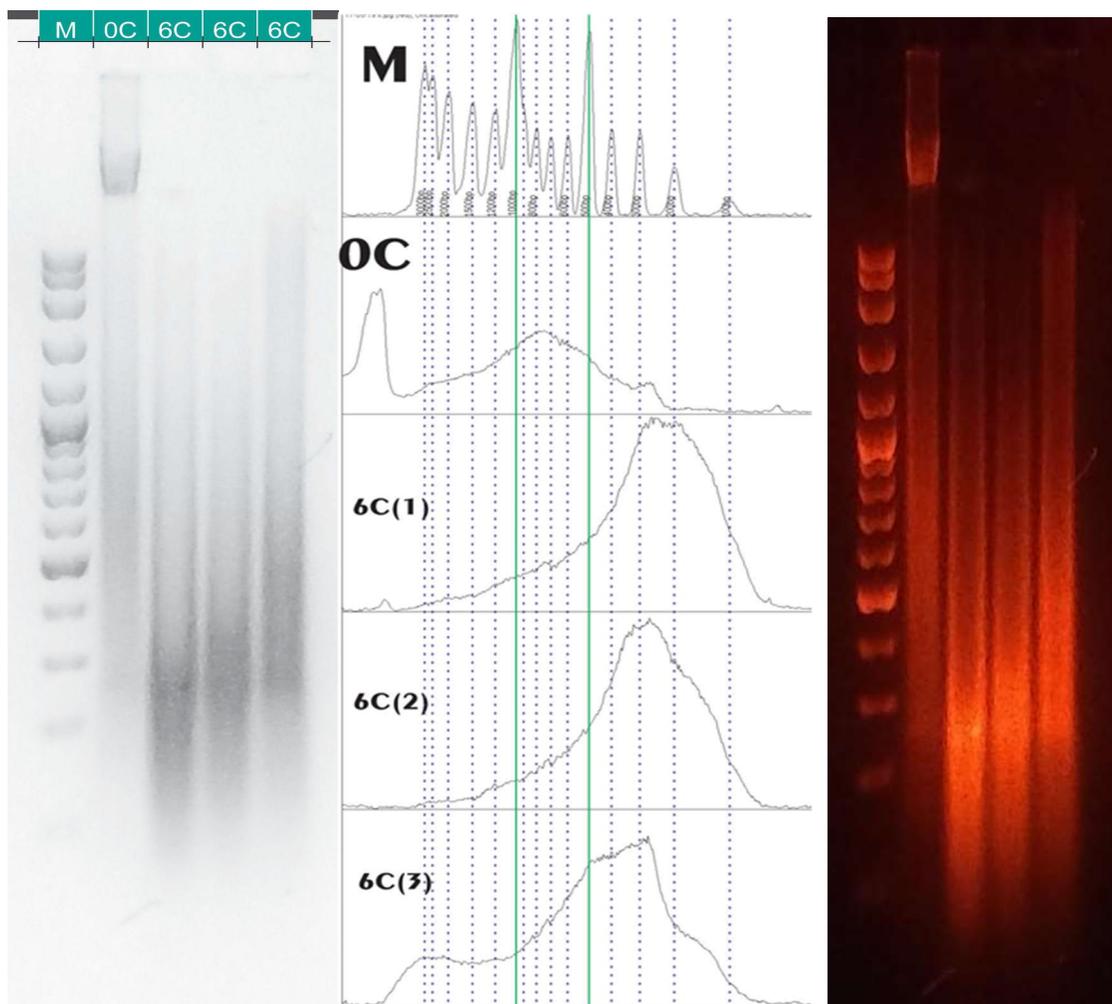


Figura 18. Gel de agarosa en el que se corrieron muestras con 6 ciclos de sonicación para ver diferencias en la distribución de fragmentos.

Como se observa en la Figura 18, la generación de fragmentos en el rango deseado se logró en las 3 muestras analizadas aunque con ligeras diferencias. Esto demuestra una eficiencia de fragmentación similar aunque con ligeras diferencias en las muestras analizadas.

REFERENCIAS

- Adhikari, S., Karmahapatra, S. K., Karve, T. M., Bandyopadhyay, S., Woodrick, J., Manthena, P. V., . . . Uren, A. (2012). Characterization of magnesium requirement of human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase mediated reaction. *BMC Res Notes*, 5, 134. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-134>
- Agostinho, M., Rino, J., Braga, J., Ferreira, F., Steffensen, S., & Ferreira, J. (2004). Human topoisomerase IIalpha: targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell*, 15(5), 2388-2400. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0558>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. <https://doi.org/10.3390/ijms161226074>
- Ali, A. S., Langer, S. W., Federspiel, B., Hjortland, G. O., Grønbaek, H., Ladekarl, M., . . . Tiensuu Janson, E. (2020). PD-L1 expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms grade 3. *PLoS One*, 15(12), e0243900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243900>
- Allshire, R. C., & Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(4), 229-244. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119>
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., . . . Lamond, A. I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 12(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00650-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00650-9)
- Anindya, R., Aygün, O., & Svejstrup, J. Q. (2007). Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell*, 28(3), 386-397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.008>
- Ashour, M. E., Atteya, R., & El-Khamisy, S. F. (2015). Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nat Rev Cancer*, 15(3), 137-151. <https://doi.org/10.1038/nrc3892>
- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., & Elledge, S. J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell*, 9(6), 1169-1182. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00543-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00543-9)
- Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5(4), 363-372. <https://doi.org/10.2174/1568011054222364>
- Ban, Y., Ho, C. W., Lin, R. K., Lyu, Y. L., & Liu, L. F. (2013). Activation of a novel ubiquitin-independent proteasome pathway when RNA polymerase II encounters a protein roadblock. *Mol Cell Biol*, 33(20), 4008-4016. <https://doi.org/10.1128/MCB.00403-13>
- Baranello, L., Kouzine, F., Wojtowicz, D., Cui, K., Przytycka, T. M., Zhao, K., & Levens, D. (2014). DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide. *Int J Mol Sci*, 15(7), 13111-13122. <https://doi.org/10.3390/ijms150713111>
- Baranello, L., Wojtowicz, D., Cui, K., Devaiah, B. N., Chung, H. J., Chan-Salis, K. Y., . . . Levens, D. (2016). RNA Polymerase II Regulates Topoisomerase 1 Activity to Favor Efficient Transcription. *Cell*, 165(2), 357-371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.036>
- Barthelmes, H. U., Habermeyer, M., Christensen, M. O., Mielke, C., Interthal, H., Pouliot, J. J., . . . Marko, D. (2004). TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *J Biol Chem*, 279(53), 55618-55625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405042200>
- Bates, A. D., & Maxwell, A. (2005). DNA Topology. *Molecular & Cell Biology*.

- Blattes, R., Monod, C., Susbielle, G., Cuvier, O., Wu, J. H., Hsieh, T. S., . . . Käs, E. (2006). Displacement of D1, HP1 and topoisomerase II from satellite heterochromatin by a specific polyamide. *EMBO J*, 25(11), 2397-2408. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601125>
- Borda, M. A., Palmitelli, M., Verón, G., González-Cid, M., & de Campos Nebel, M. (2015). Tyrosyl-DNA-phosphodiesterase I (TDP1) participates in the removal and repair of stabilized-Top2 α cleavage complexes in human cells. *Mutat Res*, 781, 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.09.003>
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell*, 40(2), 216-227. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>
- Canela, A., Maman, Y., Jung, S., Wong, N., Callen, E., Day, A., . . . Nussenzweig, A. (2017). Genome Organization Drives Chromosome Fragility. *Cell*, 170(3), 507-521.e518. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.034>
- Capranico, G., Jaxel, C., Roberge, M., Kohn, K. W., & Pommier, Y. (1990). Nucleosome positioning as a critical determinant for the DNA cleavage sites of mammalian DNA topoisomerase II in reconstituted simian virus 40 chromatin. *Nucleic Acids Res*, 18(15), 4553-4559. <https://doi.org/10.1093/nar/18.15.4553>
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, 70, 369-413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Chikamori, K., Grozav, A. G., Kozuki, T., Grabowski, D., Ganapathi, R., & Ganapathi, M. K. (2010). DNA topoisomerase II enzymes as molecular targets for cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 10(7), 758-771. <https://doi.org/10.2174/156800910793605785>
- Connelly, J. C., & Leach, D. R. (2004). Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol Cell*, 13(3), 307-316. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00056-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00056-5)
- Cortes Ledesma, F., El Khamisy, S. F., Zuma, M. C., Osborn, K., & Caldecott, K. W. (2009). A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*, 461(7264), 674-678. <https://doi.org/10.1038/nature08444>
- Cowell, I. G., & Austin, C. A. (2012). Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. *Int J Environ Res Public Health*, 9(6), 2075-2091. <https://doi.org/10.3390/ijerph9062075>
- Das, B. B., Antony, S., Gupta, S., Dexheimer, T. S., Redon, C. E., Garfield, S., . . . Pommier, Y. (2009). Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK. *EMBO J*, 28(23), 3667-3680. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.302>
- Das, B. B., Dexheimer, T. S., Maddali, K., & Pommier, Y. (2010). Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46), 19790-19795. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009814107>
- Das, B. B., Huang, S.-y. N., Murai, J., Rehman, I., Ame, J.-C., Sengupta, S., . . . Pommier, Y. (2014). PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4435-4449. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gku088>
- de Campos Nebel, M., Palmitelli, M., & González-Cid, M. (2017). Measurement of Drug-Stabilized Topoisomerase II Cleavage Complexes by Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom*, 81, 7.48.41-47.48.48. <https://doi.org/10.1002/cpcy.21>
- de Campos-Nebel, M., Palmitelli, M., & González-Cid, M. (2016). A flow cytometry-based method for a high-throughput analysis of drug-stabilized topoisomerase II cleavage complexes in human cells. *Cytometry A*, 89(9), 852-860. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22919>

- de Campos-Nebel, M. I., Palmitelli, M., Acevedo, S., & González-Cid, M. B. (2016). Persistent genetic damage induced by topoisomerase II poisons in normal human fibroblasts: generation of chromosome instability. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 27(2), 25-35.
- Debéthune, L., Kohlhagen, G., Grandas, A., & Pommier, Y. (2002). Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic Acids Research*, 30(5), 1198-1204. <https://doi.org/10.1093/nar/30.5.1198>
- Deweese, J. E., Osheroff, M. A., & Osheroff, N. (2008). DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "Knotty" Subject. *Biochem Mol Biol Educ*, 37(1), 2-10. <https://doi.org/10.1002/bmb.20244>
- Dykhuizen, E. C., Hargreaves, D. C., Miller, E. L., Cui, K., Korshunov, A., Kool, M., . . . Crabtree, G. R. (2013). BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase II α . *Nature*, 497(7451), 624-627. <https://doi.org/10.1038/nature12146>
- Gao, R., Huang, S. Y., Marchand, C., & Pommier, Y. (2012). Biochemical characterization of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2/TTRAP): a Mg(2+)/Mn(2+)-dependent phosphodiesterase specific for the repair of topoisomerase cleavage complexes. *J Biol Chem*, 287(36), 30842-30852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393983>
- Gittens, W. H., Johnson, D. J., Allison, R. M., Cooper, T. J., Thomas, H., & Neale, M. J. (2019). A nucleotide resolution map of Top2-linked DNA breaks in the yeast and human genome. *Nat Commun*, 10(1), 4846. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12802-5>
- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., & Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.010>
- Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., & Jeggo, P. A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell*, 31(2), 167-177. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.017>
- Govoni, M., Neri, S., Labella, T., Sylvester, J. E., Novello, F., & Pession, A. (1995). Topoisomerase-II-mediated DNA cleavage within the human ribosomal genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 213(1), 282-288. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2127>
- Gómez-Herreros, F., Zagnoli-Vieira, G., Ntai, I., Martínez-Macías, M. I., Anderson, R. M., Herrero-Ruiz, A., & Caldecott, K. W. (2017). TDP2 suppresses chromosomal translocations induced by DNA topoisomerase II during gene transcription. *Nat Commun*, 8(1), 233. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00307-y>
- Hirano, R., Interthal, H., Huang, C., Nakamura, T., Deguchi, K., Choi, K., . . . Boerkoel, C. F. (2007). Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? *EMBO J*, 26(22), 4732-4743. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601885>
- Husain, A., Begum, N. A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kobayashi, M., & Honjo, T. (2016). Chromatin remodeller SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription-associated genomic instability. *Nat Commun*, 7, 10549. <https://doi.org/10.1038/ncomms10549>
- Interthal, H., Chen, H. J., & Champoux, J. J. (2005). Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages. *J Biol Chem*, 280(43), 36518-36528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508898200>
- Interthal, H., Chen, H. J., Kehl-Fie, T. E., Zotzmann, J., Leppard, J. B., & Champoux, J. J. (2005). SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme-DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity. *EMBO J*, 24(12), 2224-2233. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600694>

- Karanika, S., Karantanos, T., Li, L., Corn, P. G., & Thompson, T. C. (2015). DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. *Oncogene*, 34(22), 2815-2822. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.238>
- Kong, X., Fang, M., Li, P., Fang, F., & Xu, Y. (2009). HDAC2 deacetylates class II transactivator and suppresses its activity in macrophages and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 46(3), 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.10.023>
- Korsholm, L. M., Gál, Z., Lin, L., Quevedo, O., Ahmad, D. A., Dulina, E., . . . Larsen, D. H. (2019). Double-strand breaks in ribosomal RNA genes activate a distinct signaling and chromatin response to facilitate nucleolar restructuring and repair. *Nucleic Acids Res*, 47(15), 8019-8035. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz518>
- Kouzine, F., Gupta, A., Baranello, L., Wojtowicz, D., Ben-Aissa, K., Liu, J., . . . Levens, D. (2013). Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 396-403. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2517>
- Legartová, S., Lochmanová, G., Zdráhal, Z., Kozubek, S., Šponer, J., Krepl, M., . . . Bártová, E. (2019). DNA Damage Changes Distribution Pattern and Levels of HP1 Protein Isoforms in the Nucleolus and Increases Phosphorylation of HP1 β -Ser88. *Cells*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/cells8091097>
- Liang, G., Lin, J. C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., . . . Jones, P. A. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7357-7362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401866101>
- Malik, M., Nitiss, K. C., Enriquez-Rios, V., & Nitiss, J. L. (2006). Roles of nonhomologous end-joining pathways in surviving topoisomerase II-mediated DNA damage. *Mol Cancer Ther*, 5(6), 1405-1414. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0263>
- Marchand, C., Pourquier, P., Laco, G. S., Jing, N., & Pommier, Y. (2002). Interaction of human nuclear topoisomerase I with guanosine quartet-forming and guanosine-rich single-stranded DNA and RNA oligonucleotides. *J Biol Chem*, 277(11), 8906-8911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106372200>
- McClendon, A. K., & Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res*, 623(1-2), 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009>
- Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Bauwens, S., Giraud-Panis, M. J., Croce, O., Jamet, K., . . . Ye, J. (2018). Genome-wide Control of Heterochromatin Replication by the Telomere Capping Protein TRF2. *Mol Cell*, 70(3), 449-461.e445. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.036>
- Menon, V., & Povirk, L. F. (2016). End-processing nucleases and phosphodiesterases: An elite supporting cast for the non-homologous end joining pathway of DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 43, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.011>
- Muntean, A. G., & Hess, J. L. (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol*, 7, 283-301. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132434>
- Nitiss, J. L. (2009a). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 327-337. <https://doi.org/10.1038/nrc2608>
- Nitiss, J. L. (2009b). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrc2607>
- Nitiss, J. L., & Nitiss, K. C. (2013). Tdp2: a means to fixing the ends. *PLoS Genet*, 9(3), e1003370. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003370>

- Nitiss, K. C., Malik, M., He, X., White, S. W., & Nitiss, J. L. (2006). Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 8953-8958. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603455103>
- P., B. R., & Neil, O. (2008). DNA Topoisomerases as Targets for the Chemotherapeutic Treatment of Cancer. *Checkpoint Responses in Cancer Therapy*, 57-91. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-274-8_3
- Patel, A. G., Flatten, K. S., Schneider, P. A., Dai, N. T., McDonald, J. S., Poirier, G. G., & Kaufmann, S. H. (2012). Enhanced killing of cancer cells by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and topoisomerase I inhibitors reflects poisoning of both enzymes. *J Biol Chem*, 287(6), 4198-4210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.296475>
- Pendleton, M., Lindsey, R. H., Felix, C. A., Grimwade, D., & Osheroff, N. (2014). Topoisomerase II and leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1310, 98-110. <https://doi.org/10.1111/nyas.12358>
- Plo, I., Liao, Z. Y., Barceló, J. M., Kohlhagen, G., Caldecott, K. W., Weinfeld, M., & Pommier, Y. (2003). Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst)*, 2(10), 1087-1100. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(03\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(03)00116-2)
- Pommier, Y., Huang, S. Y., Gao, R., Das, B. B., Murai, J., & Marchand, C. (2014). Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst)*, 19, 114-129. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.020>
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S. N., & Nitiss, J. L. (2016). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(11), 703-721. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.111>
- Pourquier, P., Pilon, A. A., Kohlhagen, G., Mazumder, A., Sharma, A., & Pommier, Y. (1997). Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J Biol Chem*, 272(42), 26441-26447. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26441>
- Ratner, J. N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S. L., & Bregman, D. B. (1998). Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*, 273(9), 5184-5189. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5184>
- Salceda, J., Fernández, X., & Roca, J. (2006). Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *EMBO J*, 25(11), 2575-2583. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601142>
- Schellenberg, M. J., Appel, C. D., Adhikari, S., Robertson, P. D., Ramsden, D. A., & Williams, R. S. (2012). Mechanism of repair of 5'-topoisomerase II-DNA adducts by mammalian tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2. *Nat Struct Mol Biol*, 19(12), 1363-1371. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2418>
- Schneider, R., & Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev*, 21(23), 3027-3043. <https://doi.org/10.1101/gad.1604607>
- Schoeffler, A. J., & Berger, J. M. (2005). Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochemical Society Transactions*, 1465-1470. <https://doi.org/10.1042/bst20051465>
- Seinsoth, S., Uhlmann-Schiffler, H., & Stahl, H. (2003). Bidirectional DNA unwinding by a ternary complex of T antigen, nucleolin and topoisomerase I. *EMBO Rep*, 4(3), 263-268. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor770>
- Shi, K., Kurahashi, K., Gao, R., Tsutakawa, S. E., Tainer, J. A., Pommier, Y., & Aihara, H. (2012). Structural basis for recognition of 5'-phosphotyrosine adducts by Tdp2. *Nat Struct Mol Biol*, 19(12), 1372-1377. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2423>

- Svejstrup, J. Q. (2007). Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci*, 32(4), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.02.005>
- Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., & Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature*, 395(6705), 917-921. <https://doi.org/10.1038/27699>
- Trotter, K. W., King, H. A., & Archer, T. K. (2015). Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation via the BRG1-Dependent Recruitment of TOP2 β and Ku70/86. *Mol Cell Biol*, 35(16), 2799-2817. <https://doi.org/10.1128/MCB.00230-15>
- Tsai, S. C., Valkov, N., Yang, W. M., Gump, J., Sullivan, D., & Seto, E. (2000). Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet*, 26(3), 349-353. <https://doi.org/10.1038/81671>
- Tsouroula, K., Furst, A., Rogier, M., Heyer, V., Maglott-Roth, A., Ferrand, A., . . . Soutoglou, E. (2016). Temporal and Spatial Uncoupling of DNA Double Strand Break Repair Pathways within Mammalian Heterochromatin. *Mol Cell*, 63(2), 293-305. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.002>
- Uusküla-Reimand, L., Hou, H., Samavarchi-Tehrani, P., Rudan, M. V., Liang, M., Medina-Rivera, A., . . . Wilson, M. D. (2016). Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders. *Genome Biol*, 17(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1043-8>
- van Steensel, B., & Furlong, E. E. M. (2019). The role of transcription in shaping the spatial organization of the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(6), 327-337. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0114-6>
- Vávrová, A., & Simunek, T. (2012). DNA topoisomerase IIbeta: A player in regulation of gene expression and cell differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(6), 834-837. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.005>
- Wang, Y., Lyu, Y. L., & Wang, J. C. (2002). Dual localization of human DNA topoisomerase IIIalpha to mitochondria and nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12114-12119. <https://doi.org/10.1073/pnas.192449499>
- WATSON, J. D., & CRICK, F. H. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171(4361), 964-967. <https://doi.org/10.1038/171964b0>
- Yang, F., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2015). Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters. *Mutat Res*, 773, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.007>
- Zeng, Z., Sharma, A., Ju, L., Murai, J., Umans, L., Vermeire, L., . . . El-Khamisy, S. F. (2012). TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1. *Nucleic Acids Res*, 40(17), 8371-8380. <https://doi.org/10.1093/nar/gks622>
- Zhang, H., Zhang, Y. W., Yasukawa, T., Dalla Rosa, I., Khiati, S., & Pommier, Y. (2014). Increased negative supercoiling of mtDNA in TOP1mt knockout mice and presence of topoisomerases II α and II β in vertebrate mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 42(11), 7259-7267. <https://doi.org/10.1093/nar/gku384>
- Zhou, T., Lee, J. W., Tatavarthi, H., Lupski, J. R., Valerie, K., & Povirk, L. F. (2005). Deficiency in 3'-phosphoglycolate processing in human cells with a hereditary mutation in tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1). *Nucleic Acids Res*, 33(1), 289-297. <https://doi.org/10.1093/nar/gki170>