

04/2010

## Las lesiones del DNA en el micronúcleo inducen una respuesta al daño localmente deficiente



Los micronúcleos son uno de los indicadores más empleados para estudiar la presencia de inestabilidad cromosómica en humanos. Los micronúcleos pueden contener cromosomas enteros o fragmentos cromosómicos derivados de una reparación anómala del daño en el DNA. Partiendo de la relación existente entre la reparación del DNA y la presencia de micronúcleos, se decidió estudiar la habilidad de las lesiones de DNA secuestradas en los micronúcleos para activar una respuesta efectiva al daño. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se pudo ver que sólo una pequeña parte de las lesiones del DNA micronuclear reclutaban correctamente proteínas de detección del daño. Por otro lado, también se demostró que el DNA micronuclear podía ser degradado y que esta degradación no afectaba la proliferación de la célula. Así, tanto la ausencia de reparación de las lesiones del DNA

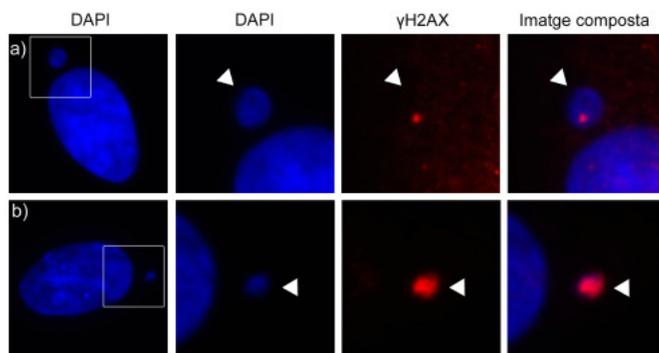
micronuclear, como la degradación del mismo, se traducen en una pérdida de material genético que podría favorecer todavía más el proceso de tumorigénesis.

La inestabilidad cromosómica es un estado transitorio o persistente caracterizado por una desmesurada formación de aberraciones cromosómicas de tipo numérico y/o estructural. Esta inestabilidad está muy relacionada con la tumorigénesis (Jallepalli y col., 2001; Nowak y col., 2002). Esta relación yace en los procesos de pérdida y/o amplificación génica que alteran la dosis de las principales proteínas oncogénicas. Una de las causas principales de la inestabilidad cromosómica son los ciclos BFB (*breakage-fusion-bridge*). Estos ciclos se inician cuando la maquinaria de reparación falla en el momento de reparar roturas de la cadena del DNA y/o ante la presencia de extremos cromosómicos (telómeros) acortados. Cuando esto pasa, se producen fusiones cromosómicas incorrectas que favorecen la aparición de unas estructuras denominadas puentes anafásicos en la división celular. Estos puentes se pueden romper y generar otras roturas que pueden desembocar en la formación de nuevos puentes. De esta manera la célula entra en un ciclo persistente de fusión-puente-rotura (ciclo BFB).

A menudo, los fragmentos cromosómicos generados por la rotura de los puentes anafásicos se acaban separando del resto de material genético y, al final de la mitosis, formando unas estructuras denominadas micronúcleos. Debido a su relación con los puentes anafásicos, los micronúcleos se consideran un buen indicador de inestabilidad cromosómica. Aun así, esta no es la única manera de generar micronúcleos. Cuando las células son expuestas a radiación ionizante, se producen roturas en las cadenas del DNA que, si no son reparadas, pueden generar fragmentos cromosómicos sin centrómero que darán lugar a micronúcleos.

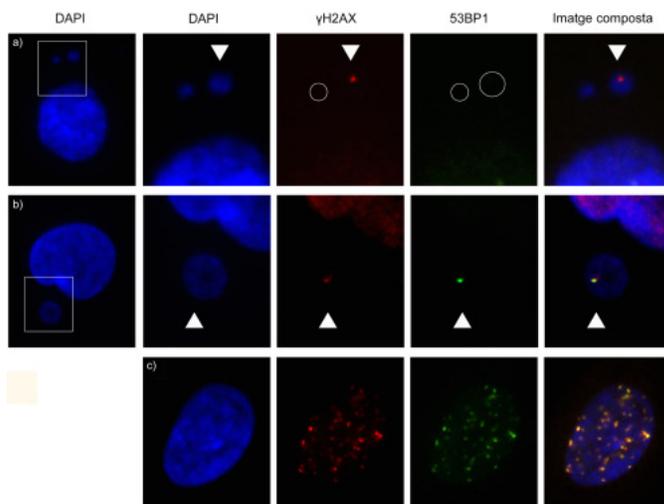
La habilidad de las lesiones de DNA secuestradas en los micronúcleos para activar una correcta respuesta de daño es un tema algo controvertido, puesto que algunos factores de reparación del DNA han sido detectados en los micronúcleos, pero de una manera poco consistente. Para entender mejor la respuesta al daño del DNA micronuclear analizamos la presencia de factores de respuesta al daño en el DNA en micronúcleos. El trabajo se realizó aplicando técnicas de inmunofluorescencia sobre micronúcleos inducidos por radiación ionizante en fibroblastos humanos normales.

La inducción de roturas de doble cadena de DNA mediante la radiación ionizante produce modificaciones en las proteínas estructurales de la cromatina, como es el caso de la histona H2AX que es fosforilada rápidamente en la zona próxima a la lesión. Sorprendentemente, en los micronúcleos distinguimos entre dos patrones de marcaje de la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ H2AX): un marcaje discreto de tipo puntual (Figura 1.a) que indicaba la presencia de roturas en el DNA (Rogakou y col., 1998), y un marcaje de tipo uniforme (Figura 1.b) que afectaba toda la superficie micronuclear y que apuntaba a la degradación del DNA micronuclear (Rogakou y col., 2000). Para estudiar el reclutamiento de factores de reparación en los micronúcleos con marcaje de  $\gamma$ H2AX de tipo puntual, realizamos estudios de co-localización de la H2AX con las proteínas 53BP1 y MRE11 (p53 binding protein 1 y Meiotic recombination 11).



**Figura 1.** Inmunofluorescencia de la proteína H2AX fosforilada ( $\gamma$ H2AX). a) Micronúcleo con marcaje  $\gamma$ H2AX de tipo puntual, indicando la presencia de una rotura en la cadena de la ADN. b) Micronúcleo marcado uniformemente con  $\gamma$ H2AX y, por lo tanto, degradándose. *Las flechas de color blanco señalan el micronúcleo.*

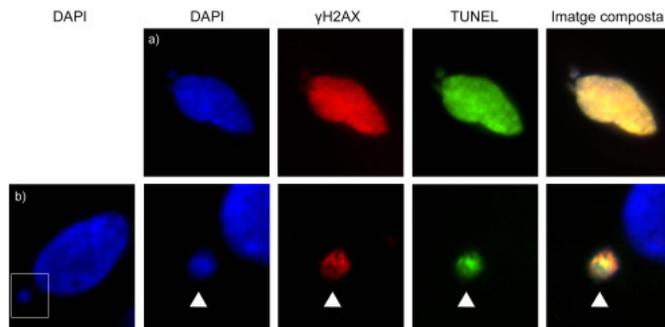
Estos experimentos nos permitieron ver que, a diferencia de las lesiones en el DNA nuclear, sólo una pequeña fracción de las lesiones del DNA micronuclear podían reclutar de manera correcta las proteínas 53BP1 y MRE11 (figura 2.a y 2.b). Una posible explicación a estos resultados podría ser un defecto en el tráfico de proteínas (Hoffelner y col., 2004) a través del envoltorio micronuclear que comprometería el reclutamiento de los factores de reparación en las lesiones del DNA que se encuentran secuestradas dentro los micronúcleos.



**Figura 2.** Inmunofluorescencia de la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ H2AX) y el factor de señalización de daño 53BP1. a) Micronúcleo con marcaje de  $\gamma$ H2AX de tipo puntual y sin 53BP1. b) Micronúcleo con marcaje puntual de  $\gamma$ H2AX co-localizando con marcaje de 53BP1 y, por lo tanto, señalizando la presencia de una rotura en la ADN micronuclear donde se ha podido reclutar el factor 53BP1. c) Núcleo de una célula irradiada donde el marcaje puntual de  $\gamma$ H2AX co-localiza con el de 53BP1, indicando que 53BP1 se ha reclutado en las roturas de manera correcta. *Las flechas de color blanco señalan los micronúcleos.*

Por otro lado, demostramos que el marcaje de la  $\gamma$ H2AX de tipo uniforme en los micronúcleos indicaba realmente la degradación del DNA. Esto lo hicimos combinando el ensayo de TUNEL con la inmunofluorescencia de la  $\gamma$ H2AX (Figura 3.b). Una vez demostrado que los micronúcleos

realmente se podían degradar, nos preguntamos si esto afectaba a la capacidad de la célula para continuar dividiéndose. En este sentido, mediante otros estudios de inmunofluorescencia, pudimos observar que la degradación de los micronúcleos sólo afecta ligeramente a la proliferación celular.



**Figura 3.** Combinación de la inmunofluorescencia de la histona fosforilada H2AX ( $\gamma$ H2AX) con la técnica de TUNEL. a) Núcleo con marcaje uniforme de  $\gamma$ H2AX que co-localiza con la señal de TUNEL, hecho que indica que el ADN nuclear se está degradando. b) Micronúcleo marcado uniformemente con  $\gamma$ H2AX y con TUNEL. Como el marcaje de ambas técnicas co-localiza, podemos concluir que la ADN micronuclear se está degradando. *Las flechas de color blanco señalan el micronúcleo.*

Finalmente, también pudimos observar que, mientras que a tiempos cortos post-irradiación la mayor parte de micronúcleos presentaban un marcaje de la  $\gamma$ H2AX de tipo puntual, a tiempo largos post-irradiación, la mayor parte de micronúcleos mostraban el marcaje de tipo uniforme. Esta tendencia, junto con los resultados anteriores, podrían indicar que los micronúcleos incapaces de reparar las lesiones del DNA se acabarían degradando, sin que esto afectara la capacidad de proliferación celular. La pérdida de material podría favorecer todavía más el proceso de tumorigénesis en términos de pérdida de dosis génica.

**Mariona Terradas**

[mariona.terradas@uab.cat](mailto:mariona.terradas@uab.cat)

## Referencias

"DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response". Terradas, Mariona; Martín, Marta; Tusell, Laura; Genesca, Anna. DNA REPAIR, 8 (10): 1225-1234 OCT 2 2009.

[View low-bandwidth version](#)