

Identificación y validación de inductores de letalidad sintética en células tumorales deficientes en recombinación homóloga

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas

Por la Bioquímica Florencia Villafañez

Director de Tesis: Dr. Gastón Soria

Departamento de Bioquímica Clínica

CIBICI-CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba



Director de tesis:

Dr. Gastón Ramiro Soria

Comisión Evaluadora:

Dra. Mariel Agnese

Dr. Carlos Argaraña

Dr. José Luis Bocco

Dr. Manuel Javier Muñoz

AGRADECIMIENTOS

A Gastón, por la paciencia, el aliento, las enseñanzas, todo. Fue un camino y un trabajo lindísimo pero más allá de todo lo científico me llevo esta manera de hacer ciencia: en discusiones sin imponer, en el aprendizaje a través del ejemplo (desde cultivar una célula hasta un lindo western-blot), en tratar de avanzar y resolver sin quedarse estancada en algo que no da. Podría escribir muchísimo más, me quedo con esto: ¡Gracias! ¡Muchísimas gracias!

A la comisión de tesis, Mariel, Carlos y José, por el acompañamiento, los consejos y el apoyo desde el comienzo de esta tesis hasta hoy que escribo estos agradecimientos.

Al grupo letal sintético, a Sofi y Flor, las primeras compañeras de grupo. Creo que esto vale para casi todas las personas en estos agradecimientos: gracias por entender cómo soy y darme mi espacio. Sofi, gracias por las discusiones políticas hasta el hartazgo, por las risas y el ambiente divertido. A Flor, por el optimismo y la ansiedad previa de cada experimento. A el nuevo grupete: Ale, Cande y Lau que me siguen bancando en todos mis estados y que me han ayudado siempre, sea para un cambio de medio, una firma de papel o cualquier otra cosa. A Cin, por bancarme un tiempito más molestando en este laboratorio. A Vir, fundamental para la tesis y para nuestra convivencia grupal en épocas de trabajo súper intenso. ¡Te extrañamos!

Al laboratorio 120, por lo compartido en todos estos días tanto adentro como afuera del laboratorio. Por el compañerismo, por sabernos distintos en muchas cosas y sin embargo acá estamos tirando para el mismo lado. Les aprecio y les agradezco tanto.

A Vanesa Gottifredi, que respeto muchísimo. Gracias por estar siempre presente y siempre dispuesta a escuchar este trabajo de tesis. No recuerdo cuántas veces hemos charlado de mis resultados pero también de política, de las decisiones personales, de la vida que no es solamente la parte científica. Gracias a todo tu grupo, Sabri, Belén, Nico, Belén Federico, Nati por recibirme cuándo estuve ahí y por contenerme justo en ese momento difícil que me tocaba pasar.

A Nubieson, por enseñarme a hacer clonados pero más que nada por su ejemplo de fuerza interior. Contra viento y marea y siempre pa lante. Lo mejor para ti.

A Minilu, escribo esto y sonrío. Me alegra muchísimo haber compartido este tiempo de tesis con vos y este tiempo de docencia.

A Lu, Betha y Fran, amigos de la carrera que me acompañaron en todas, buenas y malas. Lu, gracias por ordenarme la casa y gracias por ser siempre un punto distinto de evaluar todo. A Betha, por ese lado friki y gamer que me encanta. A Fran, por todas las cosas ñoñas y por lo divertido de hacer ciencia. ¡Y por todas esas juntadas locas!

A Jime y Luqitas, por ser el soporte argentino en París. A Jime, por recibirme un domingo de noche con consejos y comida cuando estaba tan perdida en este primer viaje a Europa. A Luqitas por todas las salidas, los chipas y por la vuelta a la ciudad más linda del mundo. Gracias por permitirme conocerla a través de tus ojos, esos seres de luz que te rodean y son tan lindes. Merci pour tout et à bientôt!

To Charlotte and Francesca, funny women and smart scientists. We had so much fun in Paris! I look forward to see you both soon.

A Nico, gracias por la amistad y las locuras de ese tiempo en Córdoba. Gracias por las charlas y salidas en Buenos Aires. ¡Lo mejor para vos en esta nueva etapa!

Al grupo de Karate-UNC, Roque, Mau, Lucas, Isa y Pablo, Luisito y muchos más. Gracias por la amistad en estos años de idas y vueltas al dojo. Es tan lindo volver a verlos. Es parte de llegar a casa ir a al dojo a entrenar.

A Edu, por los 10 años de rollercoaster adventures. Gran parte de todo lo sabes pero sin la contención post-guardias capaz no terminaba la carrera. Sin el apoyo y la convicción de que todo iba a salir bien, capaz no insistía con este doctorado.

To the fancy ladies, Cintia, Irene, Alet, Liza and Ana. Amazing woman all of you. I thank you for the wonderful time in Basel and for all the great trips and talks. I wish you all the best and I am sure we will meet soon.

To Akiko und Uli, vielen dank für alles!

A Giu, non so cosa scrivere ma grazie, grazie, grazie mille. Ci sentiamo presto.

A las pibis, Paulis, Gabiot, Lilenchus, Flaa. Las quiero muchísimo, gracias por la contención, por escuchar, el abrazo, el aguante, la fuerza, la comunidad. Las abrazo. ¡Se va a caer!

A les ñoñes, Lu, Vale, Juli, Evita, Mariana. Tan lindo encontrarles en esta vida asamblearia y de rosca.

A la profe Gabriela Furque, en Catamarca me diste la posibilidad de entrar a ese mundo de Olimpíadas de Química que abrió a la vez mis ojos a otras opciones. En Córdoba, inesperadamente, volvimos a coincidir y me brindaste una nueva posibilidad, participar de un laboratorio de investigación. No hay dudas, no estaría acá sin esa experiencia.

A mi familia. A mi papá que desde chica estimuló mi curiosidad con libros, juegos y preguntas. A mi mamá que me llevó de un lado a otro, que me enseñó y que me defendió siempre. A ambos por todo el amor y por el aliento en cada cosa que emprendí. A mis hermanos, a Rocío por bancarme en los años de convivencia y por sin importar mis locuras, estar ahí. A Carlos, por cuidarme a las animalas y por las charlas filosóficas de la vida. A Milibombona, por todo ese amor que siempre me hace bien y por esas risas tiradas en la cama hablando de cualquier cosa. A mi prima María, gracias por compartir conmigo tu vida y enseñarme la vida universitaria al comienzo de la carrera y luego estar ahí cada vez que necesitaba. A mis tíos, Sergio y Ariel, por estar siempre pendientes y dispuestos a ayudarme con lo que necesitara. A toda mi familia, gracias.

“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos. La identidad no es una pieza de museo, quietecita en la vitrina, sino la siempre asombrosa síntesis de las contradicciones nuestras de cada día.”

Eduardo Galeano

El libro de los abrazos

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 9 |
| Summary | 11 |
| Abreviaturas | 13 |
| Introducción | 15 |
| 1. Mecanismos de reparación y tolerancia al daño en el ADN | 15 |
| 1.1 Síntesis por Translesión..... | 18 |
| 1.2 Intercambio de templados | 24 |
| 1.3 Recombinación Homóloga | 26 |
| 2. Letalidad Sintética | 29 |
| 3. AKT | 32 |
| 4. Docking molecular como herramienta para el cribado virtual de drogas..... | 34 |
| Objetivos | 36 |
| Resultados | 37 |
| Capítulo I | 37 |
| 1.1. Desarrollo de una plataforma de cribado para identificar inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA..... | 37 |
| I.1.1 In Cell Western-Blot (IC-WB) | 38 |
| I.1.2 Fluorescent Elisa (FLISA: Fluorophor-linked immunosorbent assay) | 39 |
| I.1.3 Dot-Blot | 41 |
| I.1.4 Western-Blot (WB) | 43 |
| I.1.5 Optimización del protocolo de cribado por WB y controles internos..... | 46 |
| 1.2 Desarrollo de una plataforma de cribado para detectar inhibidores en el reclutamiento de las polimerasas de TLS a sitios de daño UV..... | 51 |
| Capítulo II | 57 |
| Cribado de una librería de inhibidores de quinasas y la validación temprana de hits | 57 |
| Capítulo III | 65 |
| La inhibición de AKT bloquea la mono-ubiquitinación de PCNA y la eficiencia de la síntesis por translesión luego de irradiación UV..... | 65 |
| 3. I La inhibición de AKT mediante distintas estrategias bloquea la mono-ubiquitinación de PCNA..... | 65 |
| 3.2 La inhibición de AKT no modifica los valores basales de ubi-PCNA en células no perturbadas y está vinculada con la actividad quinasa de PI3K y DNA PKCs | 67 |
| 3.3 La inhibición de AKT bloquea la activación de marcadores de TLS y altera la procesividad de la horquilla de replicación..... | 69 |

| | |
|--|-----|
| Capítulo IV | 76 |
| La inhibición de AKT luego de irradiación UV es letal sintética en células deficientes en Recombinación Homóloga | 76 |
| Capítulo V | 85 |
| Estrategia de docking molecular y validación temprana para inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA..... | 85 |
| Discusión | 91 |
| Desarrollo de plataformas de cribado..... | 91 |
| El rol de AKT en la modulación de la ubiquitinación de PCNA..... | 94 |
| La inhibición de TLS en células HR-deficientes es una estrategia innovadora y selectiva posible de emplear contra tumores HR-deficientes | 99 |
| Materiales y Métodos | 102 |
| 1. Cultivo celular..... | 102 |
| 1.1 Líneas celulares utilizadas | 102 |
| 1.2 Irradiación de células con luz UV..... | 103 |
| 1.3 Transfecciones transitorias y transducciones virales | 104 |
| 1.4 Generación de línea celular estable U2OS iRFP-C1..... | 105 |
| 1.5 Generación de línea celular estable U2OS GFP-Rev1 por dilución clonal..... | 106 |
| 1.6 Generación de línea celular estable U2OS GFP-H-Pol η | 106 |
| 2. Constructos de ADN, shARN y siARN | 108 |
| 3. Anticuerpos | 108 |
| 4. Análisis de proteínas mediante WB | 109 |
| 4.1 Preparación de muestras | 109 |
| 4.2 Preparación de geles de poliacrilamida | 109 |
| 4.3 Electroforesis y transferencia de proteínas en sistema semi-seco | 110 |
| 4.4 Bloqueo de membranas e inmunodetección de proteínas..... | 111 |
| 5. Captura automática de imágenes de campo claro..... | 112 |
| 6. Inmunofluorescencia y análisis de imágenes | 112 |
| 7. Análisis de ciclo y muerte celular | 113 |
| 8. Preparación e inmunomarcación de fibras de ADN | 113 |
| 9. Ensayos clonogénicos..... | 114 |
| 10. Análisis de recombinación homóloga..... | 114 |
| 11. Análisis estadístico..... | 114 |
| Bibliografía | 115 |

RESUMEN

La Síntesis por Translesión (TLS) y la Recombinación Homóloga (HR) cooperan durante la fase S para garantizar la integridad de la horquilla de replicación. En consecuencia, la inhibición de TLS es una estrategia prometedora para la intervención terapéutica de tumores deficientes en HR dónde la inhibición de TLS promueva la inducción de letalidad sintética (LS). La principal limitación para evaluar esta hipótesis es la falta de inhibidores farmacológicos selectivos para TLS. En este trabajo de tesis se desarrolló una plataforma de cribado de Western-Blot miniaturizado para identificar inhibidores de la mono-ubiquitinación de la proteína PCNA (Antígeno nuclear de células en proliferación), una modificación pos-traducciona clave y necesaria para la activación eficiente de TLS. Luego del cribado de una biblioteca de 627 inhibidores de quinasas, se observó que la inhibición de la quinasa de supervivencia AKT dispara un profundo bloqueo de la ubiquitinación de PCNA. Mecánicamente, se comprobó que la regulación de AKT sobre la ubiquitinación de PCNA luego de irradiación UV requiere de la actividad río arriba de la PI3-quinasa (PI3K), sin afectar los niveles basales de la ubiquitinación de PCNA en células sin perturbar. Además, se confirmó que la persistencia de la inhibición de AKT bloquea el reclutamiento de las polimerasas de TLS a los sitios de daño de ADN y afecta la procesividad de las horquillas de replicación luego de la irradiación UV, resultando en un aumento del estrés replicativo y el posterior disparo del programa de muerte celular.

Notablemente, cuando se comparó la diferencia de supervivencia de células HR-proficientes versus HR-deficientes luego de irradiación UV en combinación con inhibidores de AKT, se observó inducción de LS de manera robusta en la población celular HR-deficiente. Este fenotipo se asocia a la habilidad de AKT de inhibir la

ubiquitinación de PCNA, pues la disminución dirigida de los niveles de RAD18, E3 ubiquitina ligasa de PCNA, recapitula la inducción de LS observada. Además, mediante un modelo no ubiquitinable de PCNA en el que la lisina 164 (sitio de la mono-ubiquitinación de PCNA) fue mutada por una arginina se observó inducción de LS.

Además, se desarrolló en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Marcos Villareal y el Dr. Rodrigo Quiroga del Departamento de Matemática de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, una nueva metodología de cribado basada en docking molecular donde se identificó un compuesto capaz de unirse al sitio de interacción de ubiquitina con PCNA y que fue validado en primera instancia en modelos celulares. Aunque todavía no se han realizado ensayos experimentales que garanticen que la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA por este compuesto no se debe a efectos de tipo indirecto u “off-target” del mismo, esta aproximación preliminar demuestra la capacidad del algoritmo desarrollado para identificar inhibidores de la ubiquitinación de PCNA.

Conjuntamente, este trabajo de tesis identifica a AKT como un nuevo regulador de la mono-ubiquitinación de PCNA y proporciona la prueba de concepto de que inhibir TLS es una estrategia terapéutica para eliminar selectivamente las células HR-deficientes sometidas a estrés replicativo. Adicionalmente, mediante la utilización de una estrategia de docking molecular se identificaron inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA, no descritos previamente, y que abren nuevas posibilidades al desarrollo de terapias basadas en la inhibición eficiente y selectiva de la ubiquitinación de PCNA.

SUMMARY

Translesion DNA Synthesis (TLS) and homologous recombination (HR) cooperate during S-phase to safeguard replication forks integrity. Thus, the inhibition of TLS becomes a promising point of therapeutic intervention for HR-deficient cancers, where TLS impairment might trigger synthetic lethality (SL). The main limitation to test this hypothesis is the current lack of selective pharmacological inhibitors of TLS. Herein, a miniaturized screening assay was developed to identify inhibitors of PCNA mono-ubiquitylation, a key post-translational modification required for efficient TLS activation. After screening a library of 627 kinase inhibitors, one of the most robust hits was the pro-survival kinase AKT. The inhibition of this kinase leads to strong impairment of PCNA ubiquitylation. Mechanistically, AKT-mediated modulation of PCNA ubiquitylation after UV requires the upstream activity PI3K, without affecting PCNA-ubiquitylation levels in unperturbed cells. Moreover, persistent AKT inhibition blocks the recruitment of TLS polymerases to sites of DNA damage and impairs DNA replication forks processivity after UV irradiation, leading to increased DNA replication stress and cell death.

Remarkably, after UV irradiation in combination with AKT inhibitors, HR-deficient cells showed a major decrease in cell survival compared to HR-proficient cells, leading to a robust SL phenotype. This phenotype is linked to the ability of AKT to inhibit PCNA ubiquitylation, since the targeted knockdown of PCNA E3-ligase (RAD18) and a non-ubiquitylable (PCNA K164R) knock-in model recapitulate the observed SL-induction.

Moreover, in collaboration with Dr. Marcos Villareal and Dr. Rodrigo Quiroga we developed and tested a novel methodology using molecular docking to screen for

PCNA mono-ubiquitylation inhibitors. Early results from this screening identify one hit that has been validated in cellular models. Even though there still remains more validation assays to perform, this preliminary work proves the capacity of the screening algorithm to identify inhibitors of PCNA.

Collectively, this thesis identifies AKT as a novel regulator of PCNA ubiquitylation and provides the proof-of-concept of TLS inhibition as a therapeutic approach to selectively kill HR-deficient cells submitted to replication stress. Additionally, results from a virtual screening allowed the identification of novel inhibitors of PCNA ubiquitylation presenting new opportunities to develop therapeutic approaches based in the direct and efficient inhibition of PCNA ubiquitylation.

ABREVIATURAS

| | | | |
|----------|---|----------------|--|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico | LS | Letalidad Sintética |
| ATM | Ataxia telangiectasia mutada | MEF | Fibroblastos de embrión de ratón |
| ATR | Proteína relacionada a Rad 3 | MMR | Reparación de desapareamiento de bases |
| APC | Adenomatous polyposis coli | MMS | Metanosulfonato de metilo |
| CldU | 5-Cloro-2'-deoxiuridina | MPT | Modificación pos-traduccional |
| CPD | Dímero de pirimidinas por ciclobutano | NHEJ | Unión Final No-Homóloga |
| CRISPR | Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas | PARP | Poli ADP-ribosa polimerasa |
| DDR | Respuesta al daño en el ADN | p-AKT | AKT fosforilada |
| DDT | Mecanismos de tolerancia al daño en el ADN | p-GSK3 β | GSK3 β fosforilada |
| DMSO | Dimetilsulfóxido | PI3K | Fosfatidil inositol 3 quinasa |
| DNA-PKcs | Proteína quinasa dependiente de ADN | PIP | Interacción de proteínas a PCNA |
| DSB | Corte de doble cadena | PCNA | Antígeno nuclear de células en proliferación |
| DTT | Ditiotreitol | PFA | Paraformaldehído |
| ELISA | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas | POL D | Polimerasa replicativa |
| EOR | Especies de oxígeno reactivo | POL H | Polimerasa eta |
| FLISA | Ensayo inmunoabsorbente unido a fluoróforo | PVDF | Fluoruro de polivinilideno |
| HR | Recombinación Homóloga | RPA | Proteína de replicación A |
| IC-WB | In Cell Western-Blot | SCJ | Unión de cromátidas hermanas |
| IdU | 5-Iodo-2'-deoxiuridina | SDS | Dodecilsulfato sódico |
| IR | Radiación ionizante | SFB | Suero fetal bovino |
| iRFP | Proteína fluorescente en el infrarrojo | siRNA | ARN pequeño de interferencia |

| | |
|-------|-------------------------------|
| shRNA | ARN de horquilla corta |
| SPRTN | Proteína SPARTAN |
| TBS | Buffer TRIS salino |
| TLS | Síntesis por Translesión |
| TS | Intercambio de templados |
| Ub | Ubiquitina |
| UV | Irradiación UV |
| U2OS | Línea celular de osteosarcoma |
| V-C8 | Línea celular de hámster |
| WB | Western-Blot |

INTRODUCCION

I. MECANISMOS DE REPARACIÓN Y TOLERANCIA AL DAÑO EN EL ADN

La preservación de la integridad del genoma es un proceso fundamental para la homeostasis celular. La conservación de la información genética y su correcta transferencia a células hijas resulta crucial para garantizar el desarrollo y supervivencia de cualquier organismo vivo. Consecuencias de la alteración en la integridad del genoma pueden derivar en proliferación celular descontrolada, desarrollo de cáncer o muerte celular [1], dependiendo de cómo las células son capaces de balancear los procesos que controlan la estabilidad genómica. Dada la importancia de preservar la información genética, diversos mecanismos han evolucionado tanto en células procariotas como eucariotas para resguardar la integridad del ADN [2]. Cabe destacar que estos mecanismos son redundantes y complementarios, en muchos casos, indicando nuevamente la necesidad fundamental de encomendar la supervisión y reparación del genoma a más de un mecanismo (Fig. 1).

Los mecanismos encargados de advertir y señalar lesiones en el ADN se conocen en conjunto como la vía de respuesta al daño en el ADN (DNA Damage Response: DDR) [3], mientras que aquellos encargados de reparar el daño identificado se denominan como Mecanismos de reparación del daño al ADN (DNA Repair) [4]. Además, existen mecanismos complementarios a la reparación que se encargan de tolerar el daño durante circunstancias específicas, como por ejemplo durante la replicación del ADN, incrementando así la supervivencia y asegurando la finalización de la fase S del ciclo celular. Dado que este tipo de mecanismos no reparan la lesión en cuestión, se conocen como mecanismos de Tolerancia al Daño al ADN (DNA

Damage Tolerance) [5]. Dentro de este tipo de mecanismos se encuentran la Síntesis por Translesión (TLS) y el Intercambio de Templados (Template Switch: TS)

El daño al ADN puede provenir de fuentes exógenas y/o endógenas tales como irradiación UV, productos metabólicos de especies de oxígeno reactivo (EOR), entre otros [6, 7]. De acuerdo al tipo de lesión que se genera en la hebra de ADN y la fase del ciclo celular, la célula activa distintos mecanismos que se encargarán de reparar/tolerar estas lesiones (Fig. 1). Los cortes de doble cadena en el ADN (DSBs) son las lesiones más graves que pueden ocurrir en la estructura del ADN y pueden generarse directamente por radiación ionizante, drogas quimioterapéuticas, y otros agentes; pero también pueden generarse indirectamente cuando una horquilla de replicación encuentra una lesión de simple hebra [8]. Dos mecanismos son centrales para reparar este tipo de lesiones complejas: Recombinación Homóloga (HR) y Unión Terminales No-Homólogos (Non Homologous End Joining: NHEJ) [9], [10]. En organismos como *E. coli* y levaduras la mayoría de los DSBs son reparados mediante el mecanismo de recombinación homóloga mientras que en humanos y mamíferos esta reparación es llevada a cabo principalmente por NHEJ [11]. El balance y la decisión de utilizar HR o NHEJ dependiendo el contexto celular, es una de las preguntas donde actualmente se están enfocando una gran parte de las investigaciones del campo.

Otra lesión importante del ADN, que está relacionada al contenido de esta tesis doctoral, es la generada por irradiación UV: dímeros de pirimidina por ciclobutano (CPDs). Estas pueden ser toleradas mediante uno de los mecanismos de tolerancia, previamente mencionado, de Síntesis por Translesión (TLS) (Fig1) [12]. Los CPDs están compuestos por dos nucleótidos de pirimidina adyacentes, en los que los residuos de pirimidina están unidos covalentemente por un anillo de ciclobutano. Estos dímeros bloquean la replicación del ADN pues la polimerasa replicativa no puede leer

este tipo de templados, generando así un bloqueo de la horquilla de replicación. Dado que la replicación del ADN es un proceso celular clave, que debe ser finalizado una vez iniciado, un bloqueo prolongado de la horquilla de replicación debido a la presencia de daño en el ADN puede llevar a el colapso de la misma generando nuevas lesiones y potencialmente inestabilidad genómica [13]. Tres mecanismos celulares son centrales para proteger la integridad de las horquillas de replicación durante la fase S: la Síntesis de ADN por Translesión, el Intercambio de Templados (TS) y la Recombinación Homóloga.

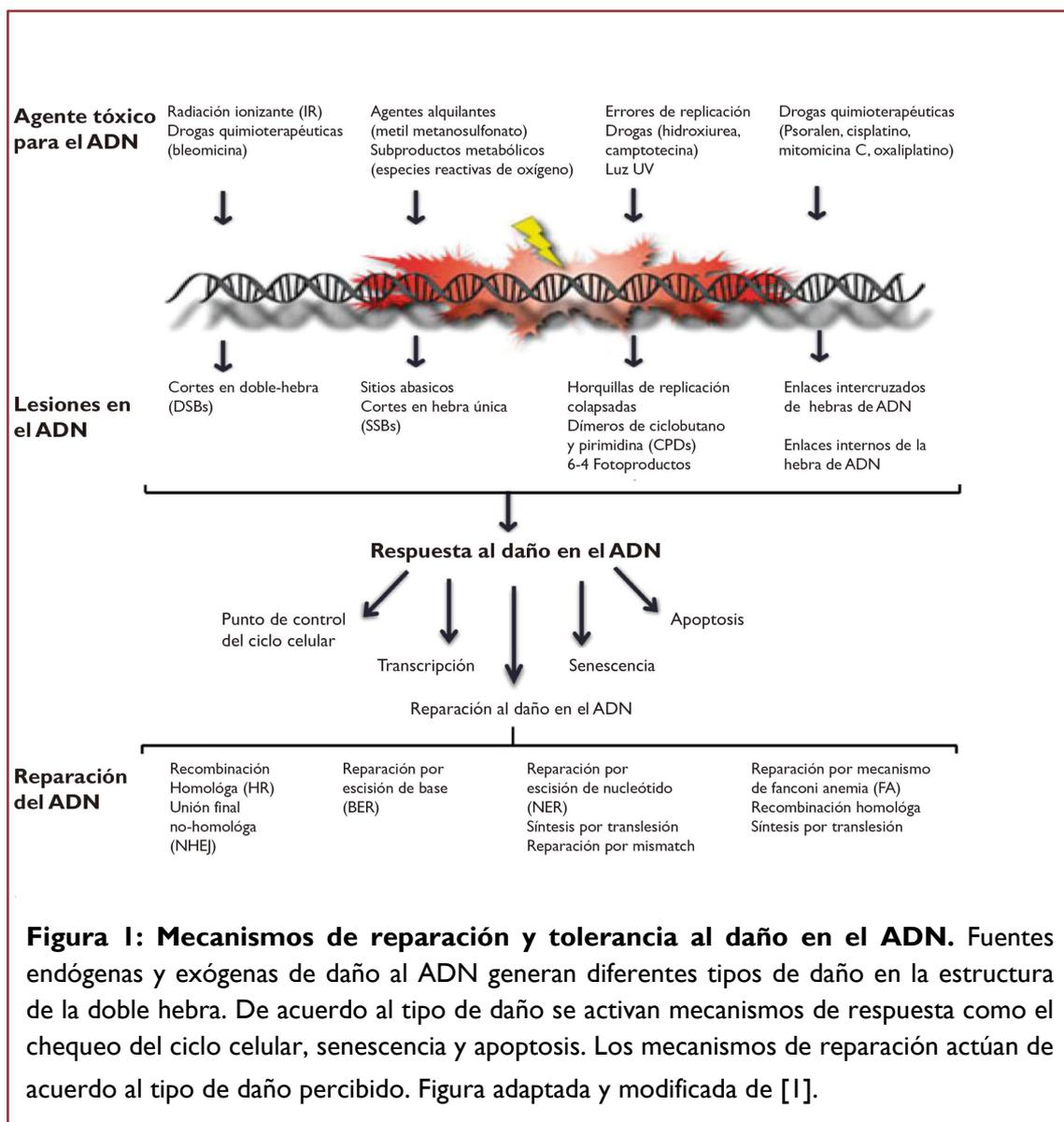


Figura 1: Mecanismos de reparación y tolerancia al daño en el ADN. Fuentes endógenas y exógenas de daño al ADN generan diferentes tipos de daño en la estructura de la doble hebra. De acuerdo al tipo de daño se activan mecanismos de respuesta como el chequeo del ciclo celular, senescencia y apoptosis. Los mecanismos de reparación actúan de acuerdo al tipo de daño percibido. Figura adaptada y modificada de [1].

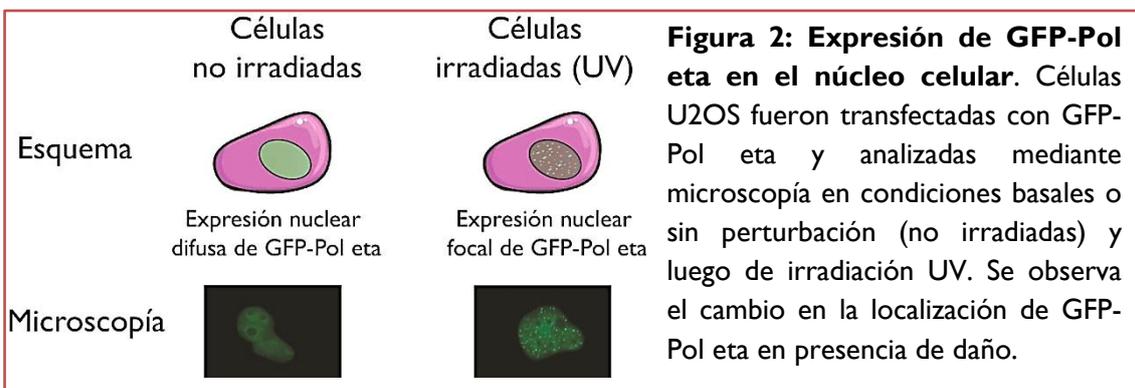
1.1 SÍNTESIS POR TRANSLESIÓN

La Síntesis por Translesión (TLS) es un mecanismo auxiliar de la replicación del ADN que valiéndose de polimerasas especializadas, comúnmente denominadas polimerasas de TLS, permite replicar el ADN que presenta moldes lesionados [10]. Las polimerasas replicativas δ (POLD) y ϵ (POLE) son las encargadas de la mayor parte de la síntesis de ADN y se encuentran altamente especializadas para garantizar la fidelidad de la duplicación del ADN con actividad “proofreading” para evitar la incorporación errónea de nucleótidos [14]. Debido a esto, cuando una polimerasa replicativa encuentra un molde lesionado (por ejemplo CPDs) no le resulta posible acomodarlo dentro de su sitio catalítico, generando de esta manera un bloqueo de la horquilla de replicación. Las polimerasas especializadas de translesión poseen generalmente, sitios activos más laxos que les permite reconocer los nucleótidos modificados y todas carecen de actividad “proofreading” [15]. Por ello son capaces de insertar nucleótidos opuestos al molde dañado y evitar así el colapso de la horquilla a costa de un potencial incremento en la mutagénesis.

Se han identificado numerosas polimerasas de translesión: RevI, Pol η (POLH), Pol i, Pol k, POLQ y PrimPol (Fig 2) [16]. Cada una de estas polimerasas reconoce con mayor eficiencia y selectividad uno o varios tipos de molde lesionados; siendo por ejemplo POLH la principal polimerasa en tolerar el daño por CPDs mientras que los aductos exocíclicos de guanina son identificados por RevI. Cabe destacar que varios estudios han demostrado redundancia en los roles entre las distintas polimerasas de TLS. Por ejemplo en ausencia de POLH, Pol k puede replicar a través de CPDs mientras que, en ausencia de ambas (POLH y Pol k) Pol i puede reconocer CPDs [10].

Esto también evidencia que existe una elección, y potencialmente un orden en que las polimerasas de TLS atienden cada tipo de daño.

Numerosas polimerasas de translesión (RevI, Pol η , Pol k entre otras) son reclutadas luego de irradiación UV a los sitios de daño en el núcleo formando estructuras microscópicas denominadas “foci” [17] (Fig. 2). Estas estructuras co-localizan con PCNA y presentan resistencia a su extracción por soluciones conteniendo detergentes luego de la irradiación UV [18]. El estudio de estos “foci” se ha utilizado ampliamente en el campo de DDT y DDR para investigar proteínas involucradas en los diversos mecanismos de reparación y tolerancia del ADN [19].



Mecánicamente, luego de que la polimerasa replicativa encuentra un molde lesionado, se genera un bloqueo de la horquilla de replicación y se produce un desacoplamiento de las helicasas y las polimerasas replicativas. Esto provoca la exposición de hebras únicas de ADN que son recubiertas por la proteína de replicación A (RPA) (Fig. 3). Posteriormente se produce el intercambio de polimerasas entre la replicativa y la de translesión para realizar la síntesis del templado. Luego que se ha realizado la síntesis sigue un paso de extensión realizado por el complejo Rev3-Rev7- Pol ζ (esta última polimerasa compuesta por las dos subunidades POLD2 y POLD3)[20]. Este complejo posee una fuerte interacción con PCNA a través del motivo PIP presente en POLD3 que puede ser incrementado a través de la interacción

de RevI con este complejo a través de los dominios de unión presentes en RevI. En conjunto, ha sido postulado que estas interacciones entre RevI y el complejo facilitarían la transición desde la síntesis del templado al paso de extensión, desplazando las polimerasas de TLS encargadas de la inserción [21]. Finalmente un nuevo intercambio entre polimerasas debe tener lugar para continuar con la replicación. [22].

Uno de los eventos claves para promover el proceso de TLS es la mono-ubiquitinación de la proteína PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). PCNA es un anillo homo-trimérico que actúa como una plataforma donde se desliza la polimerasa replicativa y es, además, un actor central para numerosos procesos durante la replicación de ADN, como así también para los mecanismos de tolerancia y reparación del daño presente en el ADN. La regulación del proceso de TLS ocurre de manera sitio-específica a través de la mono-ubiquitinación de PCNA en la lisina 164 (K164). PCNA es mono-ubiquitinado por el complejo E2/E3 de las ubiquitina ligasa RAD6/RAD18. PCNA mono-ubiquitinado (ubi-PCNA) favorece el reclutamiento de polimerasas de TLS pues las mismas poseen dominios de unión a ubiquitina [23, 24]. El factor de asociación a PCNA 15 (PAF15) es doblemente ubiquitinado y regula el intercambio entre POLD y el resto de las polimerasas de TLS a través de su interacción con PCNA [25].

La mono-ubiquitinación de PCNA aumenta marcadamente luego del tratamiento con agentes inductores de daño en el ADN como hidroxurea, metanosulfonato de metilo (MMS), cisplatino, afidicolina e irradiación UV [26]. Esta modificación pos-traducciona l y su participación en el mecanismo de TLS fue inicialmente descrita en mutantes de levaduras para la lisina 164 de PCNA en presencia de irradiación UV o en presencia de MMS, demostrando que la mono-

ubiquitinación de PCNA en este residuo resulta fundamental para la sobrevivencia al daño al ADN asociado a estrés replicativo [27]. Posteriormente otro grupo utilizó células de mamíferos y desarrolló fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) mutantes para PCNA en la lisina 164 (PCNA^{K164R/K164R}) observando una alta sensibilidad luego de irradiación con dosis bajas de UV (5 J/m²) en MEFs^{K164R} comparada con MEFs^{wt} [28].

Varios trabajos científicos han demostrado que también existe un mecanismo independiente de la mono-ubiquitinación de PCNA para el reclutamiento de las polimerasas de TLS. El mismo se vale de otra polimerasa de TLS, REVI, que es capaz de reclutar las polimerasas de TLS a través de su dominio C-terminal (Fig. 3) [29].

Numerosos factores reguladores de ubi-PCNA y TLS han sido identificados y caracterizados, como por ejemplo: p21, USPI y Spartan (SPRTN) [30]. Sin embargo, a pesar del conocimiento alcanzado respecto a los mecanismos inhibitorios de TLS en células, los esfuerzos para identificar inhibidores farmacológicos selectivos para TLS que puedan ser utilizados para explorar el potencial terapéutico de la inhibición de TLS han sido limitados [31]. Esto puede atribuirse a varios factores, pero fundamentalmente se debe a la dificultad histórica para evaluar la eficiencia de estos procesos en manera aislada, y por lo tanto de tener parámetros confiables para evaluar su inhibición.

En los últimos años algunos grupos de investigación se embarcaron en la identificación de inhibidores selectivos de las polimerasas de TLS con el fin de evaluar su potencial uso en tratamientos contra tumores [32, 33]. Dos trabajos recientes fundamentan el interés por esta estrategia: la sobreexpresión de POLH en células madre del cáncer de ovario otorga resistencia al tratamiento con cisplatino [34] y la supresión de REVI incrementa la sensibilidad a cisplatino y a ciclofosfamida en modelos de xenoinjertos [35]. No obstante, todavía resta evaluar la potencial ventaja de inhibir

selectivamente a una determinada polimerasa de TLS teniendo en cuenta la abundancia de TLS y su redundancia en atender diferentes tipos de daños.

Por otro lado, el proyecto de investigación al cual me incorporé y otros grupos también han postulado que la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA podría utilizarse como una estrategia de interferencia global río arriba de TLS la cual podría tener un efecto biológico aún más robusto que la interferencia individual de cada polimerasa de TLS. Algunos trabajos por ejemplo, se han enfocado en la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA mediante la inhibición de la ligasa RAD6 del complejo RAD6/RAD18 [36, 37].

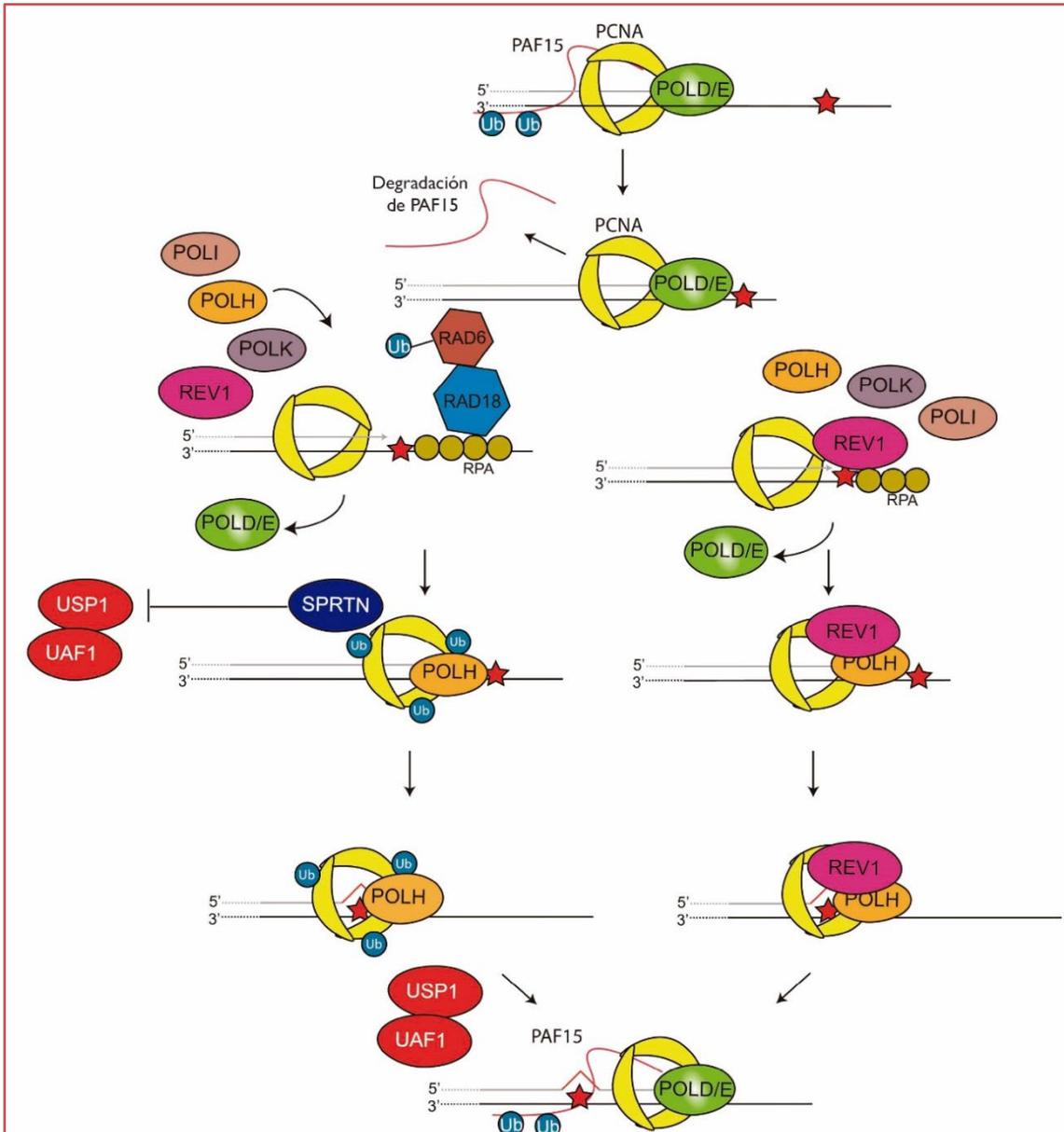


Figura 3: Síntesis por Translesión. Los mecanismos de TLS están regulados por la mono-ubiquitinación de PCNA o por REV1. Al encontrarse un templado dañado se produce un bloqueo de la horquilla de replicación. La degradación de PAF15 posterior a este bloqueo permite la interacción de PCNA con las polimerasas de translesión. RPA recluta las ligasas RA6/RAD18 que ubiquitinan PCNA. SPRTN se une a ubi-PCNA para prevenir su deubiquitinación. Una vez finalizada la TLS, la polimerasa de translesión es reemplazada por la polimerasa replicativa. En el mecanismo dependiente de REV1, REV1 recluta directamente otras polimerasas de TLS. Figura adaptada y modificada de [5]

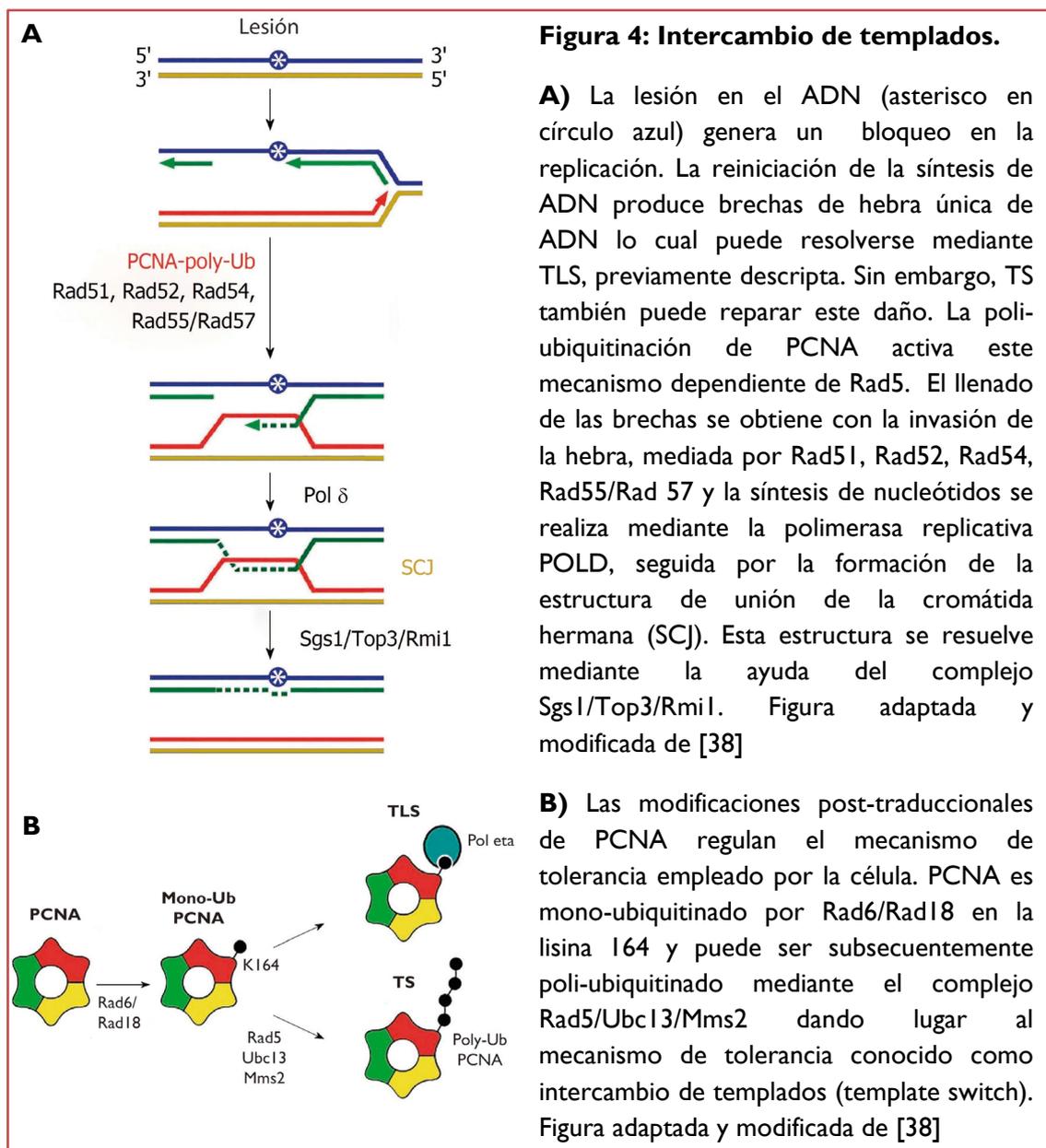
1.2 INTERCAMBIO DE TEMPLADOS

El intercambio de templados (TS) pertenece a los mecanismos de tolerancia al daño en el ADN mencionados previamente pero, a diferencia de TLS, no es mutagénico, ya que utiliza la hebra recién sintetizada como molde para la replicación [38]. Durante el proceso de TS la hebra naciente bloqueada debido al daño en el ADN cambia el molde temporalmente a la hebra hermana no dañada, recientemente sintetizada. El apareamiento entre las dos hebras recién sintetizadas en TS es promovida por la invasión de la hebra. La estructura resultante luego de la síntesis de templado es llamada unión de cromátidas hermanas (Sister chromatid junction, SCJ) y es luego resuelta mediante el complejo Sgs1/Top3/Rmi1, finalizando así este mecanismo de tolerancia del daño [39] (Fig. 4A).

El anillo homo-trimérico PCNA tiene un rol central en la regulación de los mecanismos de DDT a través de sus modificaciones pos-traduccionales. Además de su participación en TLS mediante la mono-ubiquitinación en la lisina 164 (K164) por el complejo Rad6/Rad18. PCNA puede ser secuencialmente poli-ubiquitinado, formando cadenas de ubiquitina unidas en posición no canónica (K63) por un segundo complejo E2/E3 ligasa denominado Rad5/Ubc13/Mms2 [27] (Fig. 4B). La poli-ubiquitinación de PCNA activa el intercambio de templados por un mecanismo que aún no se comprende en su totalidad [40].

Varios estudios han demostrado que un grupo de factores asociados al mecanismo de recombinación homóloga (HR) también participan en el proceso de TS. Por ejemplo: Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 y Rad57 podrían participar en la búsqueda de secuencias similares, invasión de la hebra y el apareamiento de las hebras recién sintetizadas de las dos cromátidas hermanas. Rad51, cuya función ha sido ampliamente estudiada en HR, se une a la hebra naciente de ADN para formar un filamento que

luego permitiría la invasión de la hebra. Los parálogos de Rad51, Rad55 y Rad57 forman un complejo que facilita la formación del filamento de Rad51 [41]. A su vez Rad52 y Rad54 contribuyen a la tarea de la búsqueda de secuencias similares realizada por el filamento de Rad51 [42]. Resulta importante mencionar que, a diferencia del mecanismo de TLS, la polimerasa replicativa POLD es la encargada de la síntesis de ADN, siendo por lo tanto TS un mecanismo esencialmente libre de errores.



I.3 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

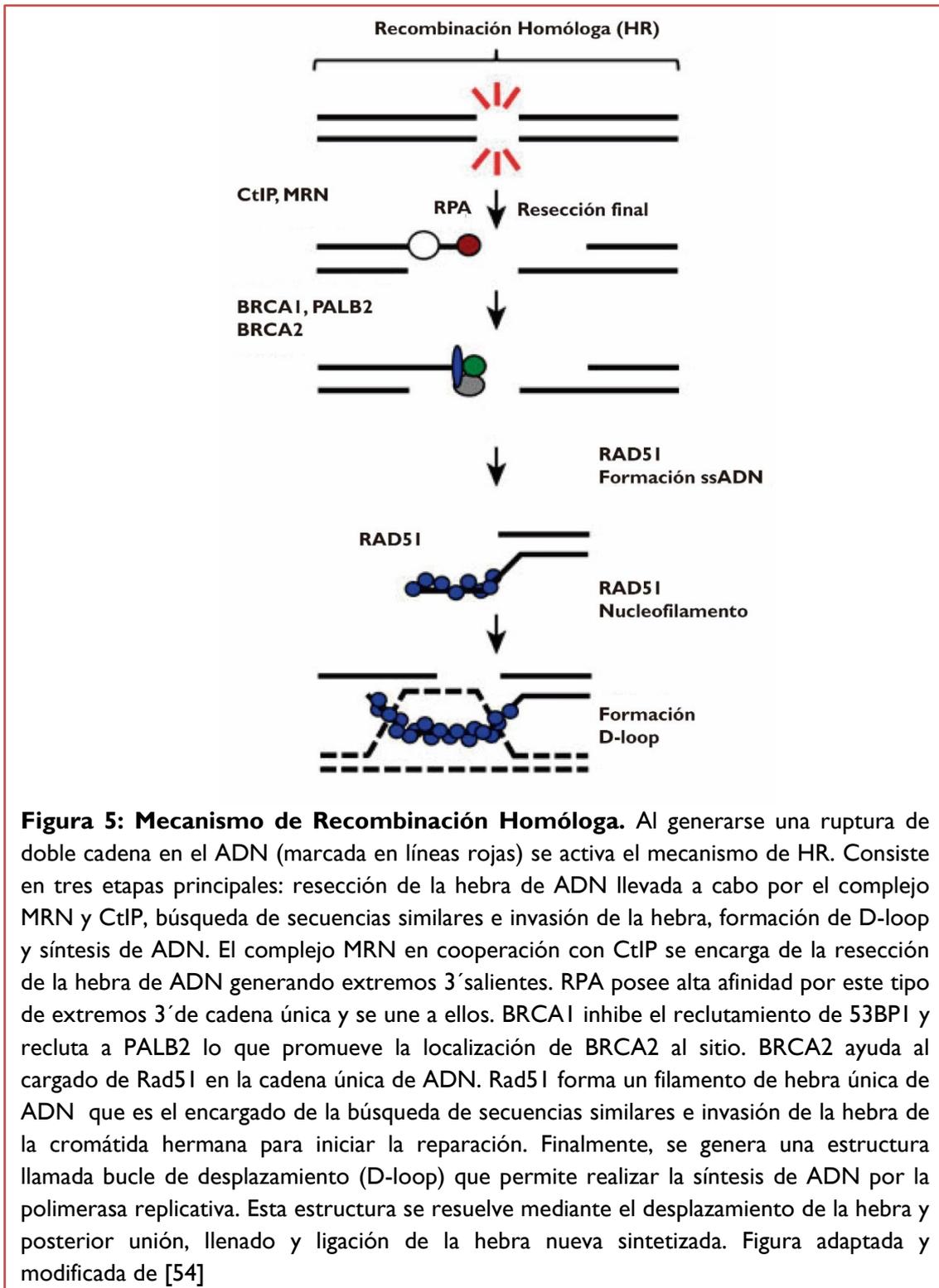
Los cortes de doble cadena de ADN (DSBs) mencionados brevemente en las secciones anteriores son lesiones citotóxicas que pueden afectar la estabilidad genómica en caso de no ser reparadas. Dos mecanismos son centrales para la reparación de DSBs: Recombinación homóloga (HR) y Unión Terminales No-Homólogos (NHEJ) [43]. La reparación por NHEJ de un DSB se da por la ligación de extremos independiente de homología de secuencia y, aunque puede realizarse durante todo el ciclo celular, es dominante en G₀/G₁, mientras que HR predomina durante la fase S, cuando la replicación de ADN tiene lugar y el molde de la cromátida hermana se encuentra disponible [44].

El complejo MRN formado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 inician HR al reconocer este tipo de daño al unirse al DSB [45]. MRE11 es una proteína, altamente conservada, que posee una actividad endo y exo-nucleasa para sustratos de doble cadena de ADN y contiene dominios de unión a RAD50 y a NBS1 [46]. RAD50 posee un “hook” de zinc y dos “coiled-coil” lo que permite la estabilización de largo alcance de dos moléculas de ADN como el cromosoma dañado y la cromátida hermana [47]. NBS1 posee dominios de unión a MRE11 y a ATM [48]. Posteriormente, este complejo recluta las proteínas ATM y TIP60 al ADN. Esta última proteína activa ATM que a su vez fosforila a la variante de histona H2AX, lo cual sirve de anclaje para la proteína MDC1. Seguidamente, MDC1 es fosforilada por ATM y ello le permite funcionar como una plataforma “scaffold” para las E3 ubiquitina ligasas RNF8 y RNF168 [49]. Ambas E3 ubiquitina ligasas, ubiquitinan a H2AX, permitiendo que BRCA1 pueda unirse e iniciar la reacción de ubiquitinación de CtIP (Fig. 5).

El paso siguiente del mecanismo de HR es la resección de la hebra de ADN la cual consiste en la degradación nucleolítica de los extremos dañados en la dirección 5' a 3'.

Es un paso fundamental pues es la generación de estos extremos 3' salientes lo que compromete a las células a reparar este tipo de daño por el mecanismo de HR [50]. Este paso se puede dividir en dos partes, la primera llamada "end clipping" llevada a cabo por el complejo MRN y CtIP (Fig 5) [51]. En esta parte, un bajo número de pares de bases (alrededor de 20 pb en células de mamíferos) son resectadas. En la segunda parte llamada resección extensiva, EXOI y BLM en cooperación con DNA2 generan largas cadenas de ssADN [52]. Finalmente, RPA recubre los extremos 3' salientes y es luego desplazada por RAD51 generando un filamento nucleoproteico. BRCA2 y PALB2 ayudan en la formación de este filamento nucleoproteico que invade la hebra de ADN generando una estructura denominada D-loop [53, 54] (Fig 5).

Dado el compromiso inherente de las células a terminar la replicación del ADN una vez que esta se inicia, es fundamental poseer mecanismos complementarios y/o redundantes que garanticen la viabilidad celular en contextos de daño al ADN. Durante la fase S, si TLS no es eficiente para tolerar el daño del molde lesionado, se pueden generar rupturas de doble cadena (DSB) debido al colapso de las horquillas, que sólo pueden ser reparadas por el mecanismo de HR. Por este motivo resulta interesante estudiar la problemática asociada a la inhibición de TLS. En particular en contextos de deficiencia en HR, ya que podrían presentar un potencial terapéutico para el tratamiento de aquellos tumores que presenten deficiencias y/o mutaciones en el mecanismos de HR.



2. LETALIDAD SINTÉTICA

La letalidad sintética se definió inicialmente como la condición donde la mutación simultánea en dos genes pero no por separado de cada uno, conduce a la muerte celular. Calvin Bridges fue quién primero describió este fenómeno en 1922 al observar que diversas combinaciones de mutaciones en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) resultaban en letalidad (Fig. 6). En 1946, 20 años después, Theodore Dobzhansky empleó el término letalidad sintética al observar el mismo fenómeno en *Drosophila pseudoobscura* (Fig. 6). En la década de 1980, la búsqueda de interacciones de tipo letal-sintéticas a nivel genético se expandió a otros modelos, además de la mosca de la fruta, como levaduras, nematodos y *Caenorhabditis elegans* [55] (Fig. 6).

A partir del año 2000 el concepto de letalidad sintética comenzó a estudiarse dentro del campo de la oncología y en el año 2001 se llevó a cabo el primer cribado de compuestos químicos en líneas celulares humanas [56] (Fig. 6). El rápido desarrollo de la tecnología de silenciamiento de RNA (RNAi) permitió realizar cribados de alto rendimiento de tipo genético que podían ser realizados en células humanas guiadas por mutaciones oncogénicas específicas [57].

Si bien la letalidad sintética puede afectar a un organismo en su conjunto, se planteó que la investigación de mecanismos de letalidad sintética dirigidos específicamente a células cancerígenas podría dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas más eficaces y selectivas en el tratamiento de tumores [58, 59]. La prueba de concepto de que este tipo de enfoques puede ser efectivo surgió con la aprobación de los inhibidores de la enzima poli ADP-ribosa polimerasa (PARPs) para su uso clínico en tumores de ovario y mama con mutaciones en el gen BRCA1 [60].

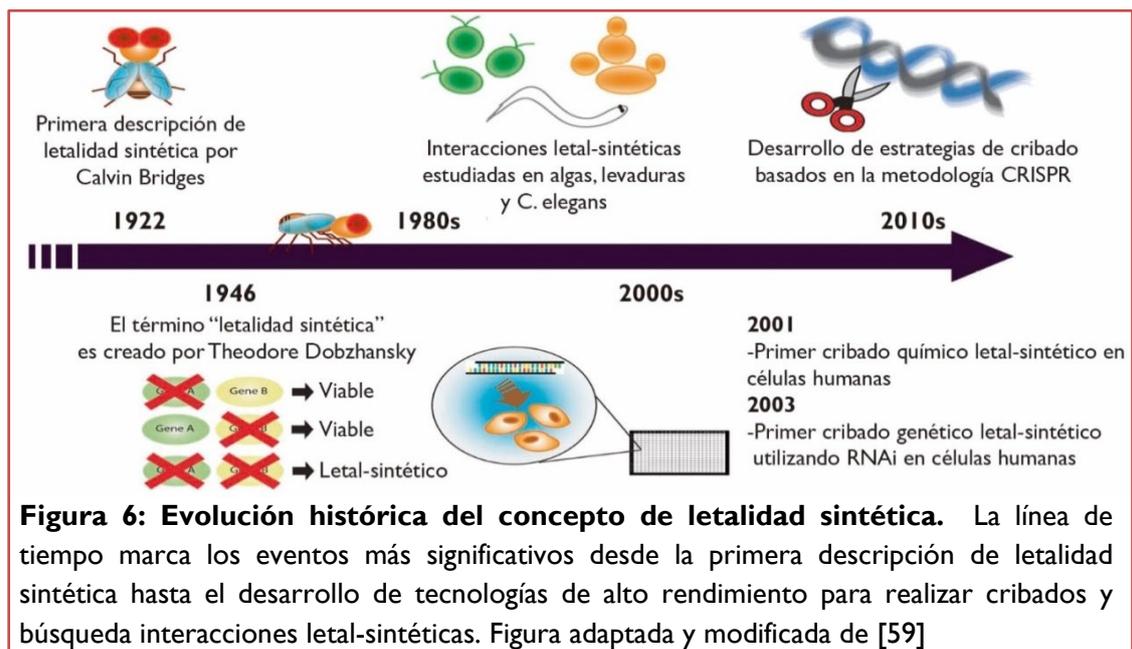
Para el año 2010 el descubrimiento de la herramienta Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) permitió explorar aún más las posibilidades de interacciones de tipo letal-sintéticas que en la actualidad son combinadas con cribados de tipo bioinformáticos y computacionales [61].

Uno de los principios sobre los cuales se asienta el concepto de letalidad sintética es la redundancia funcional (o mecanismos de “back-up” celular). En organismos diploides, la redundancia puede ser interpretada de diferentes maneras. Un conocido ejemplo es la presencia de dos alelos en el genoma. Otro claro ejemplo son los parálogos: genes que poseen un ancestro común y pueden realizar, parcialmente, la misma tarea (por ejemplo: AKT1, AKT2 y AKT3). La robustez genética es otro de los principios de la letalidad sintética y hace referencia a la presencia de procesos similares en la misma célula para llevar a cabo una misma función o de mecanismos alternativos y/o complementarios, los cuales pueden tener un origen común o convergente [62].

En la actualidad, específicamente dentro del campo de la oncología se han descrito diferentes estrategias para alcanzar la letalidad sintética en células cancerígenas basadas en: vías paralelas, inhibición de componentes múltiples dentro de un mecanismo, interacciones de tipo parálogas, letalidad sintética colateral por pérdida de material genético o colapso de complejos [63]. La letalidad sintética basada en vías paralelas se refiere a inhibir mecanismos paralelos y esenciales a las células cancerígenas que ya han perdido por mutaciones el mecanismo principal. Un ejemplo es la inhibición de la polimerasa POLQ en tumores con mutaciones en BRCA1. BRCA1 es fundamental para el mecanismo de HR. En células cancerígenas que han perdido la expresión de esta proteína es necesario recurrir a un mecanismo complementario como el NHEJ alternativo llevado a cabo por POLQ. La inhibición de la actividad de

POLQ resulta en letalidad sintética debido a la anulación del mecanismo complementario [64]. La inhibición de la proteína Adenomatous polyposis coli (APC) en simultáneo con β -catenina puede disparar un evento de letalidad sintética por la inhibición de componentes múltiples dentro de un mecanismo [65], ya que ambas proteínas son moduladoras de la vía de señalización oncogénica WNT.

Un análisis matemático computacional publicado en 2013 investiga las posibilidades de alcanzar la letalidad sintética mediante la estrategia de inhibir componentes dentro de un mismo mecanismo. De los primeros 15 procesos con mayor índice de probabilidad, 4 de ellos son mecanismos de las vías de reparación y tolerancia al ADN. Notablemente, el proceso de recombinación homóloga es el que obtuvo el mayor índice de probabilidad con respecto a todos los otros mecanismos estudiados y presenta 27 interacciones de tipo negativas dentro de la misma vía [66]. Por lo tanto, no resulta sorprendente que el campo de letalidad sintética se haya enfocado hasta el momento, principalmente, en el estudio de interacciones letal-sintéticas en los mecanismos de reparación del ADN.



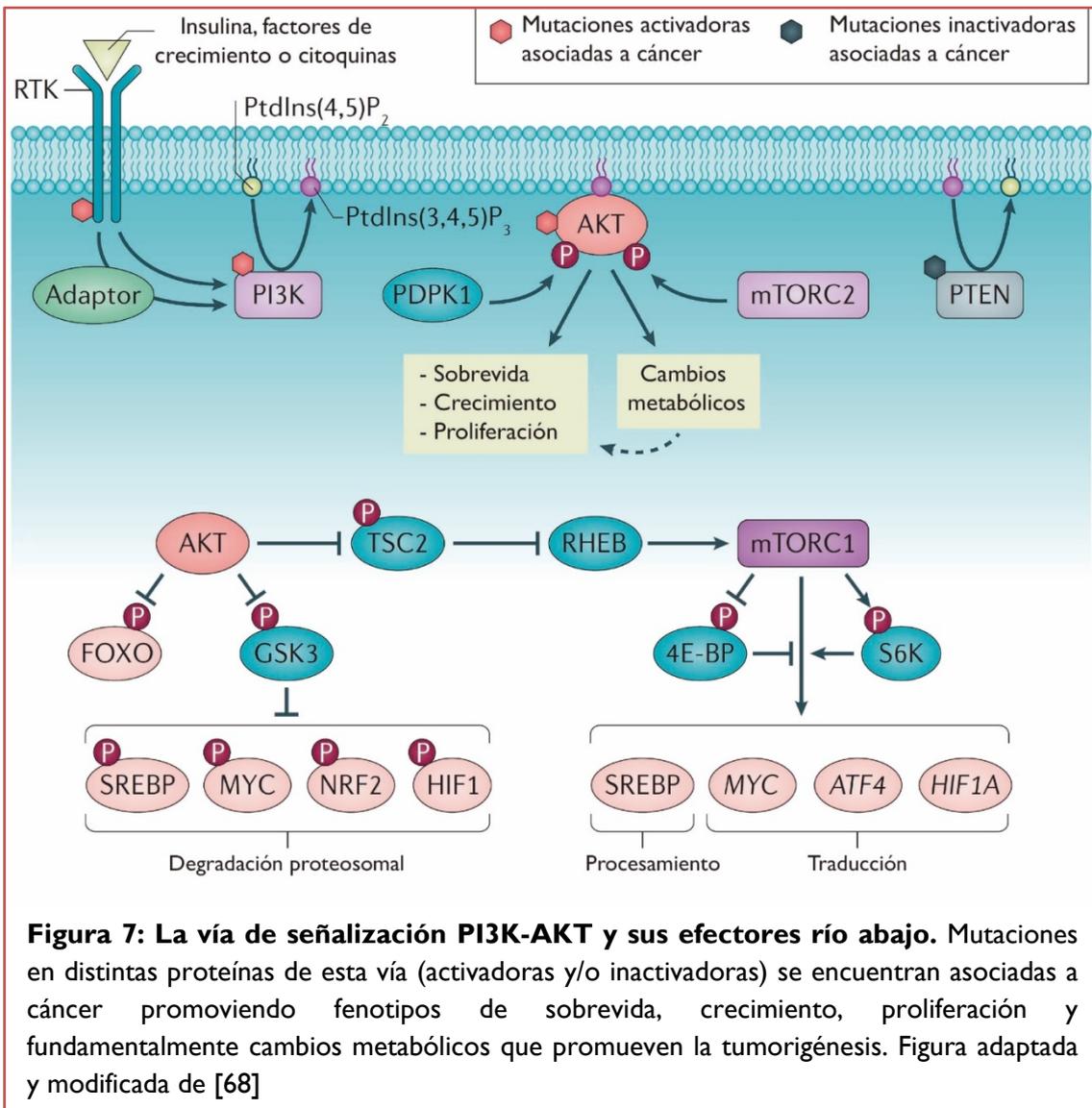
3. AKT

AKT es una quinasa icónica en la promoción de la supervivencia celular, que trabaja controlando funciones celulares esenciales como crecimiento, proliferación, apoptosis y metabolismo. Esta quinasa, también conocida como proteína quinasa B (PKB), posee 3 parálogos en humanos, AKT1, AKT2 y AKT3, los cuales se activan de manera similar. AKT1 y AKT2 se encuentran ampliamente expresadas, siendo AKT2 particularmente importante en tejidos respondedores a insulina mientras que AKT3 se encuentra restringida en su distribución entre tejidos, presente mayormente en el cerebro [67].

Varios grupos han demostrado de manera independiente la participación central de esta quinasa en la promoción de la supervivencia celular. AKT tiene un rol anti-apoptótico bien establecido que opera tanto directamente, a través de la fosforilación de blancos relevantes como BAD y caspasas, como indirectamente, a través de la modulación transcripcional de genes pro-supervivencia o pro-apoptóticos como IKK/NF- κ B y MDM2/p53 [68-70]. A su vez, una de las vías de las que forma parte esta quinasa, la vía de señalización fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), ha sido reportada como uno de los mecanismos principalmente alterados en el metabolismo celular de contextos tumorales. Las mutaciones en los genes que codifican para la subunidad PI3K son una de las más frecuentes en oncología, con una mutación puntual somática en el dominio de activación de la quinasa en PIK3CA (que codifica para una subunidad catalítica) (Fig. 7). De hecho, esta mutación es la segunda mutación más frecuente dentro de todos los tipos de tumores incluidos en el set “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) [71]. Además, son frecuentes las mutaciones que involucran una pérdida de función en el gen PTEN (fosfatasa antagonista del eje PI3K/AKT), como así también el silenciamiento

del mismo mediante metilación (Fig. 7). Las mutaciones de la línea germinal en PTEN son responsables del síndrome de Cowden, una enfermedad familiar hereditaria [72].

Al momento de escribir esta tesis doctoral, aún no se han reportado interacciones entre la quinasa AKT y el mecanismo de Síntesis por Translesión bajo un contexto tumoral. Sin embargo, un estudio reciente realizado en células de carcinoma de colon reportó una función para AKT1 y AKT2 en la reparación de DSB a través del mecanismo de HR [73].



4. DOCKING MOLECULAR COMO HERRAMIENTA PARA EL CRIBADO VIRTUAL DE DROGAS

El docking molecular es una técnica bioinformática que se enfoca en predecir y estimar los modos de unión y afinidades de moléculas pequeñas al sitio de unión de receptores blancos. Esta técnica se ha usado fundamentalmente en el diseño y optimización de fármacos con blancos moleculares conocidos. El docking molecular consiste, en general, en cuatro procedimientos: 1) la preparación y selección de la estructura proteica, 2) preparación del ligando, 3) docking y 4) análisis de los resultados (Fig. 8). Dado que los resultados obtenidos en este tipo de aproximación experimental son predicciones netamente teóricas, los mismos deben ser siempre validados experimentalmente.

La energía libre de unión de un ligando con una proteína puede ser estimada de diferentes maneras, lo cual determina la clasificación de los distintos programas empleados para el análisis de docking molecular: basada en el campo de fuerza, con funciones de puntuación empíricas o potenciales basados en el conocimiento. Todos estos tipos de programas han sido usados con éxito en proyectos de descubrimiento de drogas previamente [74]. Autodock Vina es un programa de docking molecular altamente empleado que utiliza una función de puntuación y un algoritmo global de optimización. Este programa es de acceso público, más rápido que otros programas similares y con una exactitud similar o mayor inclusive [75]. El grupo del Dr. Quiroga y el Dr. Marcos Villareal del Departamento de Química Teórica y Computacional de la Facultad de Ciencias Químicas desarrolló una nueva función de puntuación llamada Vinardo (Vina RaDii Optimized) basada en Vina y que supera el rendimiento de este programa en todas las variables analizadas [76] .

La parte final de este trabajo de tesis se realizó en colaboración con este grupo de investigación, donde se utilizó Vinardo para realizar un cribado de inhibidores de TLS.

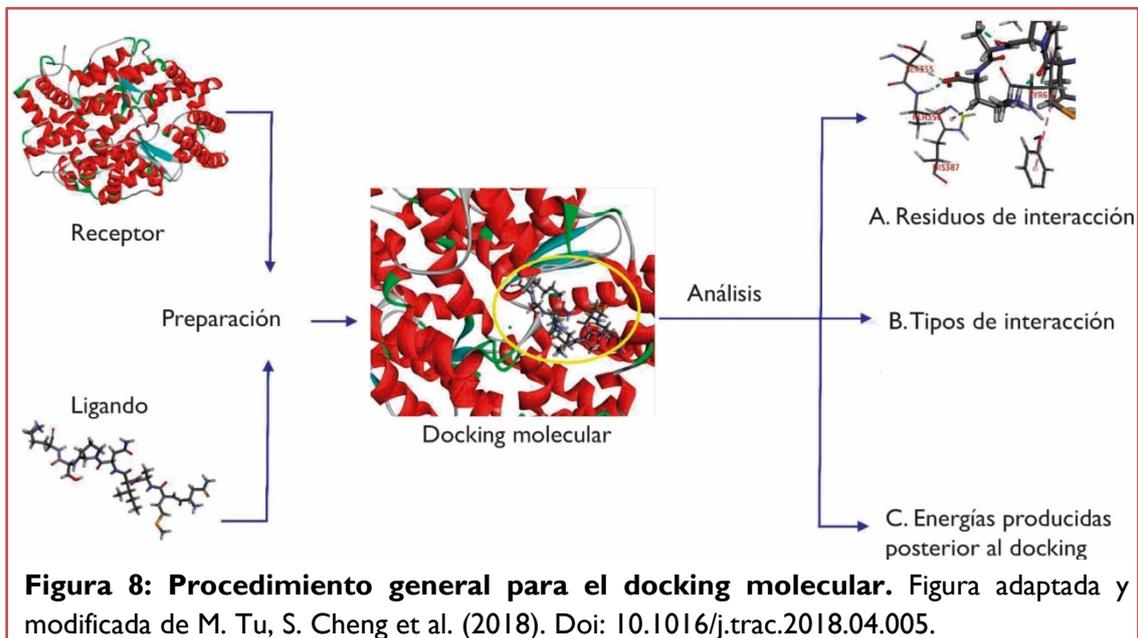


Figura 8: Procedimiento general para el docking molecular. Figura adaptada y modificada de M. Tu, S. Cheng et al. (2018). Doi: 10.1016/j.trac.2018.04.005.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral se centra en el diseño y desarrollo de plataformas tecnológicas y métodos para el cribado, identificación y validación de inhibidores farmacológicos de TLS. Una vez identificados estos inhibidores se plantea realizar experimentos de prueba de concepto que permitan validar la hipótesis de inducción de letalidad sintética en células deficientes en recombinación homóloga.

Los **objetivos específicos** propuestos durante el desarrollo de esta tesis doctoral están orientados a:

1. Elaborar una plataforma de cribado robusta basada en células para detectar inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA como una estrategia para la inhibición selectiva de TLS.
2. Elaborar una plataforma de cribado para detectar inhibidores del reclutamiento de las polimerasas de TLS a sitios de daño UV.
3. Evaluar diferentes bibliotecas de compuestos utilizando las distintas plataformas desarrolladas, validando los hits identificados con técnicas específicas para la detección de daño al ADN y alteraciones en el mecanismo de Síntesis por Translesión.
4. Validar los potenciales inhibidores directos de la mono-ubiquitinación de PCNA identificados mediante herramientas de cribado por docking molecular.
5. Analizar y caracterizar el potencial de letalidad sintética de los compuestos validados en ensayos con diferentes modelos celulares deficientes en recombinación homóloga.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

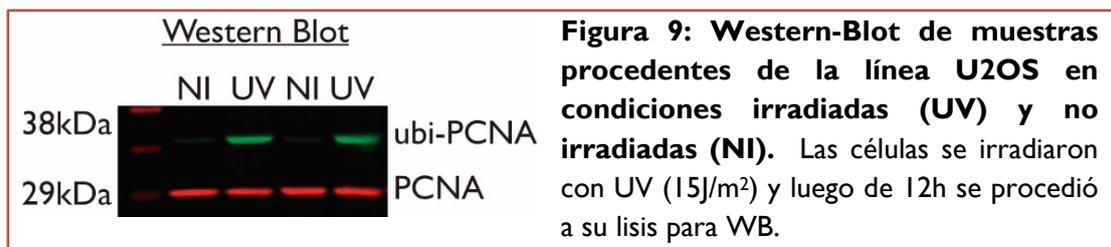
1.1. Desarrollo de una plataforma de cribado para identificar inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA

A fines de cumplir con el primer objetivo específico de esta tesis, se evaluaron una serie de técnicas experimentales para la generación de una plataforma de cribado de rendimiento moderado que sea capaz de detectar inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA. Dado que la mono-ubiquitinación de PCNA es una modificación pos-traducciona, su detección mediante métodos bioquímicos clásicos como el Western Blot (WB) puede lograrse mediante anticuerpos que reconozcan tanto la forma no-modificada como la modificada, separando ambas formas de la proteína por diferencias en su peso molecular. De hecho, fue así como se estudió por más de una década esta modificación post-traducciona [77, 78].

Alternativamente, se podrían utilizar anticuerpos que reconozcan específicamente la forma ubiquitinada de PCNA (ubi-PCNA) y un anticuerpo que reconozca tanto la proteína modificada como la no modificada (PCNA total). Para ello se adquirió un anticuerpo monoclonal que reconoce la forma ubiquitinada en la lisina 164 de PCNA (Cell Signaling Technology: CST #13439S). PCNA total proviene de ratón y ubi-PCNA de conejo, por lo que el empleo de este set de anticuerpos presenta como principal ventaja la posibilidad de realizar incubaciones en simultáneo tanto de los anticuerpos primarios como de los anticuerpos secundarios (α -ratón IRDye 680RD para PCNA total y α -conejo IRDye 800CW para ubi-PCNA de LI-COR Biosciences). Inclusive la lectura en el equipo Odyssey se realiza en simultáneo de ambos

anticuerpos pues presentan diferentes longitudes de onda (680nm y 800nm) y el equipo presenta dos canales a 700nm y 800nm de longitud de onda respectivamente.

Mediante irradiación UV es posible activar el mecanismo de síntesis por translesión en el cual PCNA es mono-ubiquitinado por la enzima RAD18 en la lisina 164. Se procedió entonces a irradiar células U2OS para confirmar la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos mediante WB. Se observó un incremento de la banda correspondiente a ubi-PCNA en aquellas muestras irradiadas y un corrimiento en el peso molecular acorde a lo esperado (10kDa), lo que confirmó la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos (Fig. 9).



Con el objetivo de alcanzar la mayor capacidad de análisis posible (high throughput) manteniendo buenos rangos de sensibilidad de ambos anticuerpos se evaluaron en manera complementaria las siguientes metodologías: In-Cell Western-Blot (IC-WB), FLISA (Fluorophore-Linked Immunoabsorbant Assay) y Dot-Blot. Estas técnicas presentan la posibilidad de ser escaladas a placas de 48 y/o 96 pocillos y adaptadas fácilmente a un sistema de manejo de líquidos automático, ambas características fundamentales para una plataforma de cribado de mediano rendimiento.

1.1.1 In Cell Western-Blot (IC-WB)

El ensayo de In Cell Western-Blot es una técnica cuantitativa de inmunofluorescencia realizada en microplacas (de 96 ó 384 pocillos) que combina la

especificidad del Western-Blot con el rendimiento de ELISA (comentada brevemente en la próxima sección). Esta técnica detecta las proteínas fijadas en su estado nativo *in situ*, en cultivos celulares permeabilizados utilizando anticuerpos primarios y secundarios específicos.

La técnica IC-WB consiste, brevemente, en la siembra de células en una placa de 96 pocillos, tratamiento de células con drogas, fijación con paraformaldehído al 4% (PFA), permeabilización con metanol, bloqueo, incubación con anticuerpos primarios y secundarios y detección con un scanner infrarrojo (Fig. 10).

Al emplear esta metodología observamos que el incremento esperado en la forma mono-ubiquitinada de PCNA en muestras irradiadas comparada con muestras no-irradiadas era muchísimo menor a lo detectado por WB (Fig. 10). Además se evaluó, sin resultados positivos, la utilización de ácido clorhídrico (HCl) y de hidróxido de sodio (NaOH) con la intención de mejorar la exposición del epítipo de ubi-PCNA en las células fijadas. Se concluyó que en condiciones donde no hay separación por tamaño y/o desnaturalización de proteínas, el anticuerpo contra la forma mono-ubiquitinada de PCNA interacciona de forma no específica con otros epítipes incrementando así la señal de fondo de la inmunotinción e imposibilitando la detección de ubi-PCNA (Fig. 10).

1.1.2 Fluorescent Elisa (FLISA: Fluorophor-linked immunosorbent assay)

La técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado en una placa de 96 pocillos es detectado mediante un anticuerpo conjugado a una enzima que da lugar a un producto que genera un cambio de color en

el pocillo. Este cambio de color es luego cuantificado mediante espectrofotometría. Se distinguen cuatro tipos de ELISA: directo, indirecto, sándwich o de captura y competitivo. La diferencia entre los dos primeros tipos de ELISA radica en si se añade el anticuerpo primario marcado (conjugado a una enzima) o si utiliza un set de anticuerpos donde se emplea un primario sin marcar y luego un anticuerpo secundario marcado (ELISA indirecto). El ELISA de captura, precisamente captura el antígeno entre un anticuerpo llamado de captura (agregado en primer lugar a la placa) y el anticuerpo llamado de detección que se encuentra marcado. El ELISA de tipo competitivo se utiliza cuando el antígeno que se desea cuantificar se encuentra en baja concentración. Esta técnica utiliza un antígeno de referencia que compite con el antígeno de la muestra por la unión al anticuerpo. Los diversos tipos de ELISA permiten trabajar en placas de 96 pocillos (o incluso 384 pocillos) pero poseen una gran limitante que es la sensibilidad, la cual está directamente relacionada al tipo de enzima con la cual se conjuga el anticuerpo.

FLISA (Fluorescence-linked immunosorbent assay) es una técnica basada en el ELISA de captura que utiliza reporteros fluorescentes en vez de enzimáticos lo cual incrementa considerablemente la sensibilidad de esta técnica. El protocolo de la misma es el siguiente: siembra de células en una placa de 96 pocillos, tratamiento de células con drogas y lisado celular. Paralelamente se prepara la placa de lectura de 96 pocillos donde se inmoviliza el anticuerpo primario contra la proteína total y se lava el anticuerpo no unido, se adiciona el lisado celular e incuba por un tiempo breve; luego se agrega el segundo anticuerpo primario contra la forma mono-ubiquitinada y se procede a un nuevo lavado para eliminar el anticuerpo no unido. Por último se adiciona el anticuerpo secundario contra ubi-PCNA, se incuba por un breve tiempo y

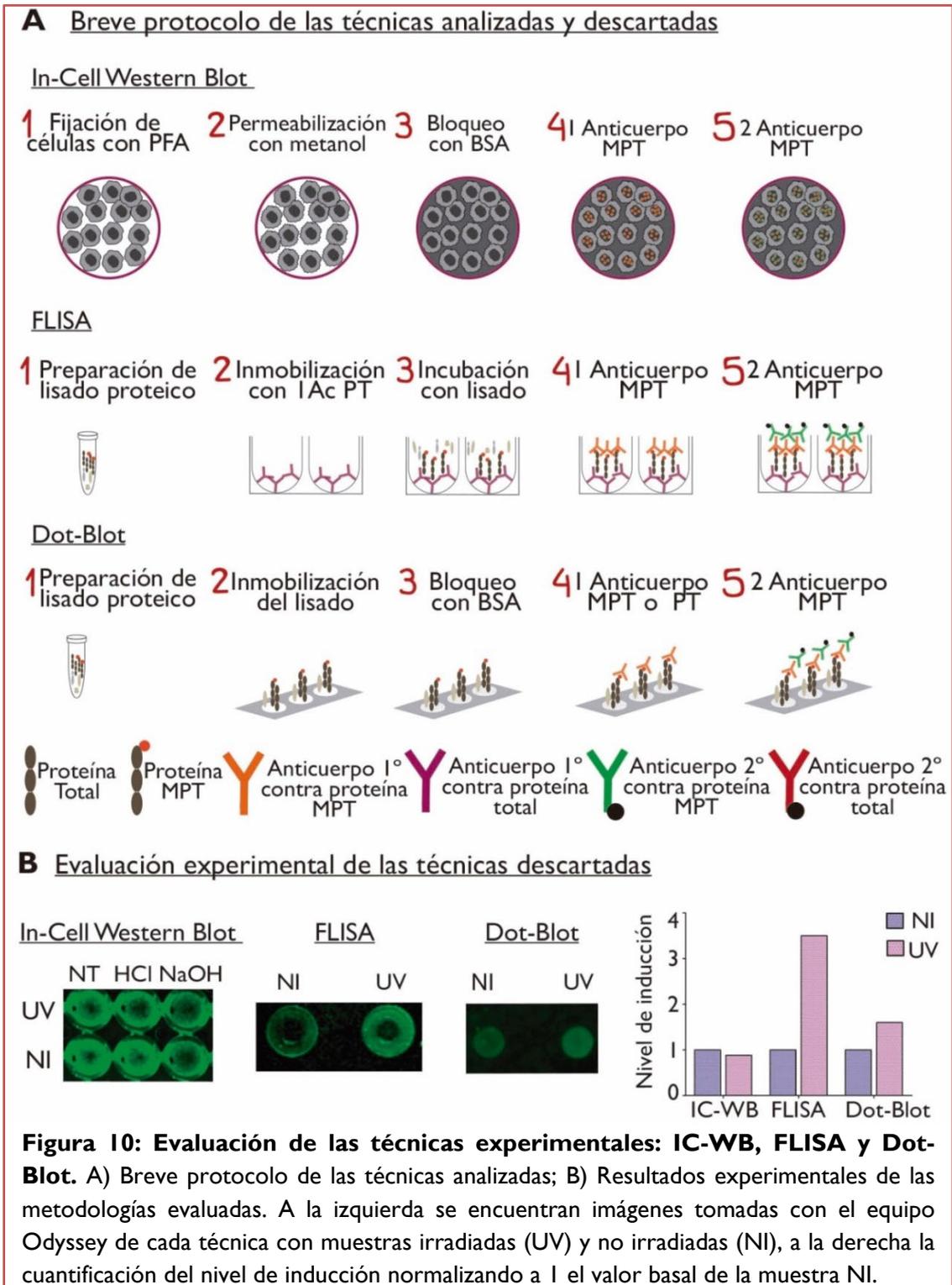
se lava el anticuerpo no unido. Al evaluar esta técnica, concluimos que los lisados celulares debían poseer altas concentraciones de proteínas, provenientes como mínimo de una placa de 12 pocillos para que la mono-ubiquitinación de PCNA pueda ser detectada de manera robusta luego de la irradiación UV (Fig. 10). Por este motivo, a pesar de lograr detectar en manera eficiente la inducción de la ubiquitinación de PCNA luego de irradiación UV (Fig. 10), esta metodología fue descartada, pues trabajar con lisados celulares de placas de 12 pocillos dificulta la automatización y el rendimiento que se busca en una plataforma de cribado.

1.1.3 Dot-Blot

El Dot-Blot es una técnica basada en la deposición de una solución conteniendo la molécula de interés (proteínas en un lisado celular, ADN o ARN) en una membrana directamente, para su posterior incubación con anticuerpos. Es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para detectar ADN y ARN. Se considera una técnica rápida pues no se realiza electroforesis ni una transferencia de un soporte a otro. Sin embargo, al no realizar una separación por peso molecular se ha usado en general, para la detección de presencia o ausencia de una biomolécula de interés.

Como se mencionó previamente, el Dot-Blot posee una metodología rápida y puede ser utilizada para detectar proteínas en un lisado celular. Brevemente, consiste en la siembra de células en una placa de 48 y/o 96 pocillos, tratamiento de las células con drogas, inmovilización del lisado celular en una membrana de PVDF, bloqueo con albúmina sérica bovina, incubación con anticuerpos primarios y, posteriormente, secundarios. Esta técnica tiene como desventaja principal la falta de separación de proteínas por su tamaño y la concentración de proteínas en un área muy limitada (dot) lo cual aumenta considerablemente la señal de fondo. Con esta técnica se advirtió una

ligera inducción de la forma mono-ubiquitinada de PCNA luego de irradiación UV pero no lo suficientemente robusta y reproducible para una plataforma de cribado, por lo cual también fue descartada (Fig. 10).



I.1.4 Western-Blot (WB)

La imposibilidad de utilizar los métodos inicialmente considerados, nos llevó a reconsiderar el Western Blot clásico, o una adaptación del mismo, como método de cribado. El Western-Blot es una técnica de rutina en laboratorios de biología molecular utilizada para el análisis cuantitativo de proteínas. Consiste en tres etapas generales: electroforesis del gel, transferencia de membrana, incubación con anticuerpos. Sin embargo esta técnica consta de dos grandes desventajas ampliamente conocidas, que complican su adaptación a una plataforma de cribado:

1. El rendimiento de los ensayos de WB es pobre, dado que la cantidad de muestra necesaria para detectar cuantitativamente una proteína de interés suele ser equivalente al menos a una placa de 24 pocillos (Fig. 11).
2. La preparación de la muestra requiere de múltiples pasos, difíciles de automatizar y que incrementan el error humano cuando aumenta el número de muestras a procesar. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, esta metodología es la que ofrecía mayor sensibilidad debido a la separación de proteínas por tamaño molecular y, además, permite examinar más de una proteína simultáneamente (Fig. 11), lo cual no es posible en las técnicas de Dot-Blot y FLISA.

Dado que las especies en las cuales se generaron los anticuerpos ubi-PCNA y PCNA total son diferentes (PCNA total proviene de ratón y ubi-PCNA de conejo) fue posible incubar ambos anticuerpos primarios en simultáneo, como así también los respectivos secundarios. Esto posibilitó además que se pueda utilizar el anticuerpo contra PCNA total como control de carga del experimento. Por estas razones

experimentales se decidió enfocar los esfuerzos en adaptar y modificar la metodología de WB para que pueda ser utilizada como plataforma de cribado, simplificando la preparación de la muestra a su mínima expresión y maximizando el rendimiento de la metodología. Para ello se buscaron alternativas para reducir el número de pasos desde la obtención del lisado proteico hasta el cargado del mismo en el gel.

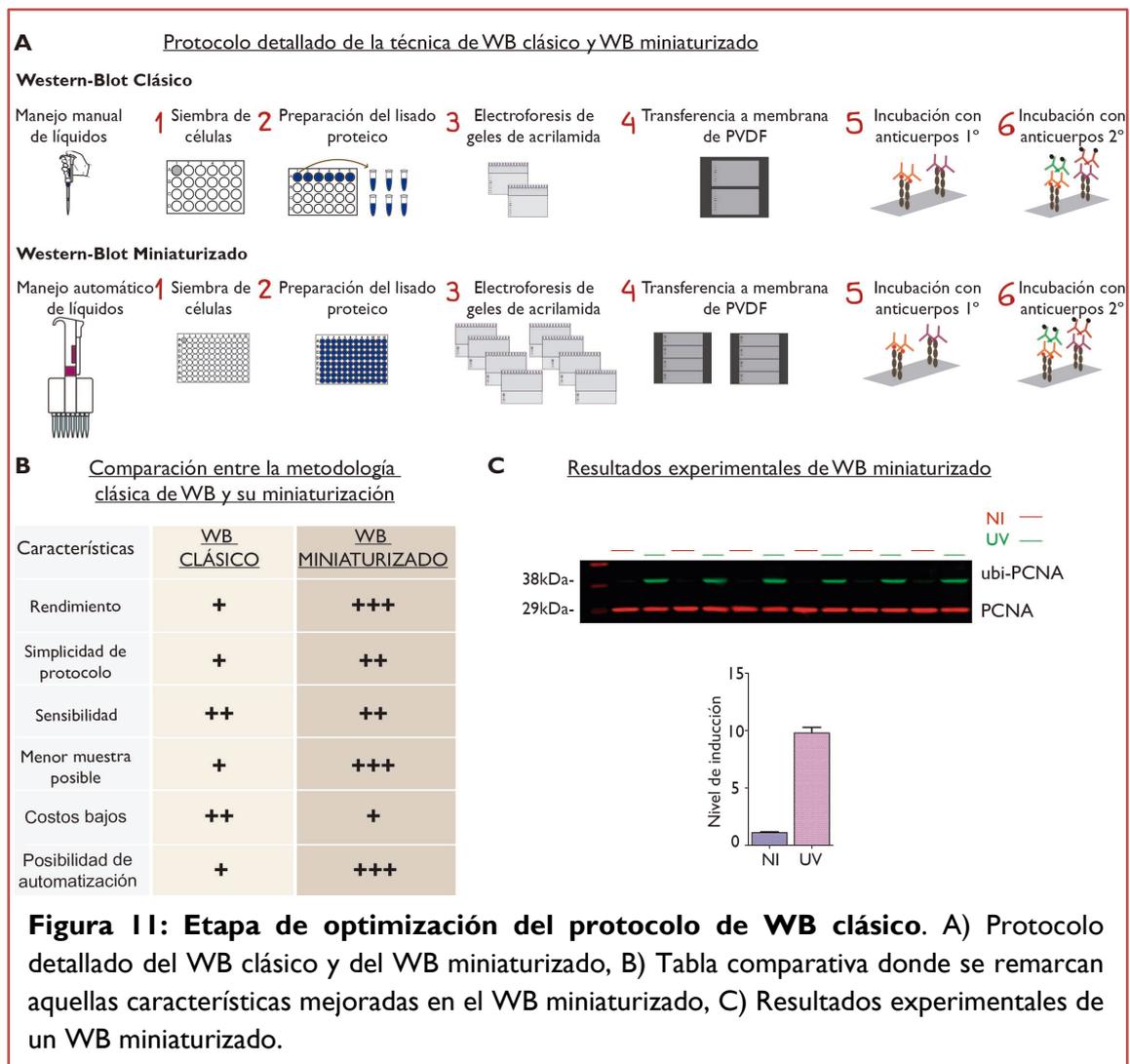
Un paso engorroso y laborioso típico de un WB clásico es la desnaturalización de las proteínas previo al cargado del gel, la cual comúnmente se logra mediante la ebullición de la muestra por aproximadamente 10 minutos en un buffer de carga conteniendo SDS y agentes como DTT o β -mercaptoetanol. Esta desnaturalización permite la separación de las proteínas por tamaño molecular en un gel de poli-acrilamida y el reconocimiento de los epítopes por parte de los anticuerpos (Fig. 11). Para evitar el movimiento de muestras entre diferentes soportes para su desnaturalización desde una placa de 96 pocillos a tubos tipo eppendorf, se realizó un tratamiento de las mismas directamente sobre la placa de 96 pocillos donde se realiza el cultivo de las células y la evaluación de las drogas. Para ellos se utilizó benzonasa, una enzima nucleasa proveniente de *Serratia marcescens* que degrada todas las formas de ADN y ARN [79]. Esta enzima es efectiva en varias condiciones desde un amplio rango de concentraciones de pH y detergentes [80]. La benzonasa también ha sido utilizada en varios trabajos de investigación para mejorar la resolución de proteínas en la electroforesis mediante la eliminación de los ácidos nucleicos. Se evaluó esta enzima a diferentes concentraciones y se observó que la concentración de 1/1000 con una incubación de 30 minutos a 37°C directamente en el buffer de carga ofrecía la mejor resolución de las proteínas de interés: PCNA y ubi-PCNA. De esta forma se evitó el paso de ebullición y las muestras podían ser lisadas en el buffer de carga con SDS y

benzonasa en la misma placa de cribado de 96 pocillos, permitiendo el cargado directo de las muestras al gel de acrilamida (Fig. 11).

Otra de las limitaciones de la técnica clásica de WB para un proyecto de cribado está asociada al rendimiento de la misma, debido al reducido número de geles que pueden ser preparados en simultáneo, y, que de esta forma, resulten comparables entre sí. Para reducir esta variabilidad, se adquirió un dispositivo “multi-casting” que permite preparar hasta 12 geles simultáneamente. Además se modificaron las concentraciones del reactivo catalizador TEMED, para prevenir la polimerización de la acrilamida en el tiempo que lleva agregar la solución para los 8 geles en la cámara (Fig. 11).

De los resultados iniciales de puesta a punto de este WB también se observó que la longitud del gel de separación podía ser reducida mediante la extensión de la longitud del gel de “stacking”, sin perder la separación óptima entre PCNA y ubi-PCNA, 29 y 38kDa, respectivamente. Dado que la longitud estándar de los geles de separación (aproximadamente 5cm para un mini-gel) impide la transferencia simultánea de varios geles debido al espacio en el equipo de transferencia, la reducción del largo del gel de separación permitió la transferencia de hasta 4 geles de cribado en cada equipo de transferencia semi-seco de manera simultánea y 8 geles en dos transferencias (total de geles necesarios para evaluar una placa completa de 96 pocillos) (Fig. 11).

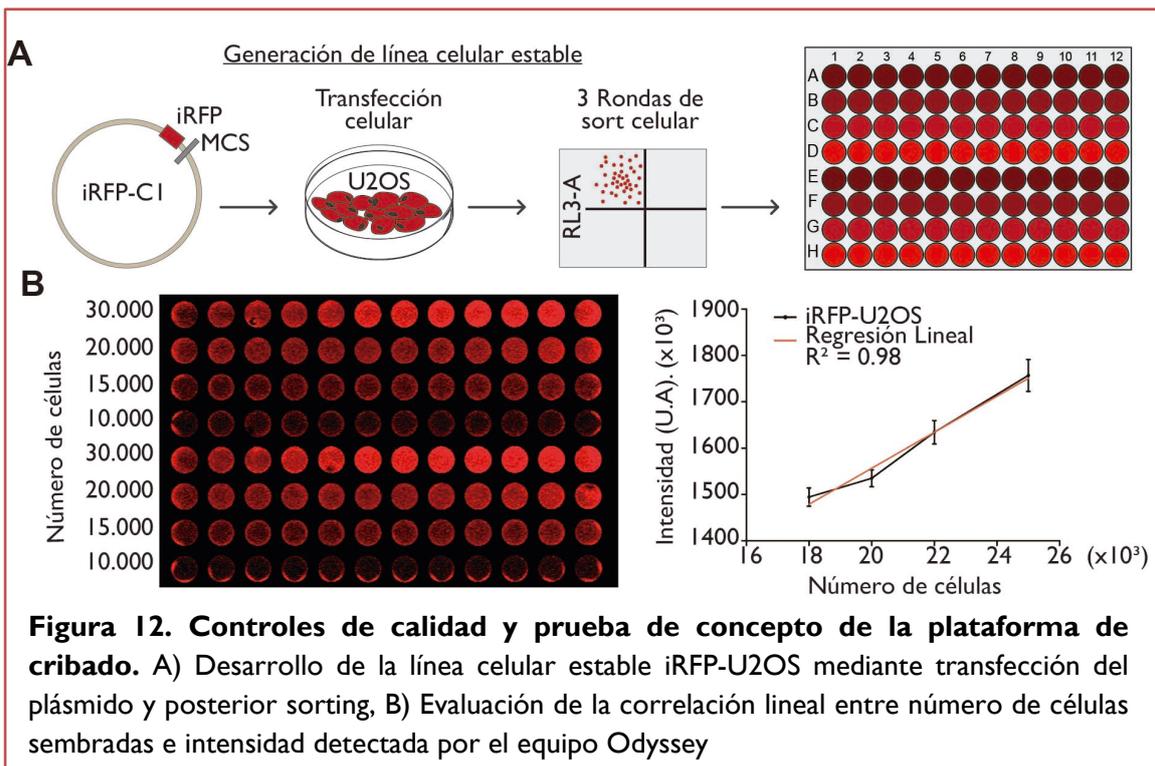
Como una consideración final de esta adaptación de la técnica de WB a una plataforma de cribado, en cada paso posible, tal como la siembra de células, remoción de medio de cultivo y adición del buffer de lisado, se empleó un sistema de manejo de líquidos automático y pipetas electrónicas (Fig. 11).



I.1.5 Optimización del protocolo de cribado por WB y controles internos

Luego de la puesta a punto inicial de las variables de la metodología de WB se desarrollaron controles de calidad que permitieran monitorear varios parámetros críticos previo a realizar un experimento de cribado tales como: número de células, distribución intra-pocillo de las mismas y monitoreo de efecto borde. Para cumplir con estos objetivos, inicialmente se desarrolló una línea celular derivada de la línea U2OS, la cual expresa de forma estable una proteína fluorescente iRFP (Fig. 12A). Esta línea celular se obtuvo mediante la transfección del plásmido iRFP-C1, seguida por tres

rondas secuenciales de *separación* celular por citometría de flujo “Sorting”. Esta cantidad de rondas de sorting fue necesaria para lograr una *población estable* y de *expresión homogénea* del plásmido. Dado el amplio rango de fluorescencia provisto por el escáner de infrarrojo LICOR CLx, fue posible determinar un rango reproducible de correlación entre el número de células y las unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia (Fig. 12B). De esta manera, esta línea celular posibilitó estimar el número de células antes de iniciar un tratamiento con diversos compuestos de cribado, de modo de garantizar que no existieran errores o alta variabilidad en la siembra de células, así como posibles efectos borde pronunciados que afectarían la reproducibilidad de los experimentos. Esto fue posible dado que el pico de emisión de esta proteína fluorescente es de 713nm y el detector del equipo es de 700nm. De hecho, comparando con resultados con conteo manual de células, fue factible estimar el número total de células en un rango de 10.000 a 30.000 células por pocillo mediante el escaneo de la emisión de iRFP-C1. Incluso se demostró una correlación lineal entre el número de células sembradas (conteo manual) y la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias U.A.) (Fig. 12B). Con valores superiores a 30.000 células por pocillo la correlación entre número de células contadas manualmente y la intensidad de fluorescencia se pierde.



Como ya se ha mencionado previamente, otra fuente importante de variabilidad en el número final de células por pocillo y su distribución intra-pocillo se asocia al método utilizado para sembrar células. Cuando un sistema manual fue usado, el número final de células mediante la determinación de U.A. era notablemente disperso. Por el contrario, cuando un sistema de manejo de líquidos electrónico tal como el Integra Viaflow Assist era utilizado, la dispersión se reducía drásticamente (Fig. 13A). Por este motivo, para la fase de cribado de esta tesis se utilizó de manera exclusiva el brazo robótico Viaflow Assist para el sembrado de células o para el manejo de líquidos durante el procesamiento de muestras, siempre que los protocolos asociados del brazo robótico lo permitieran.

Un control final desarrollado en esta tesis está asociado al monitoreo de toxicidad general de los compuestos a nivel de efectos citopáticos. Esto se debe a que si bien aquellos tratamientos que afectan dramáticamente el número de células son

evidenciados por WB mediante una caída en la señal del control de carga, aquellos compuestos con gran toxicidad general pero que no afectan marcadamente el número final de células pasarían desapercibidos en la plataforma de cribado. Esto se debe a que las células son tratadas directamente con buffer de carga, donde toda posible alteración fenotípica celular puede quedar enmascarada. Dado que no resulta posible analizar uno por uno los tratamientos de un experimento de cribado antes de identificar posibles hits para la variable de interés, se incorporó a la plataforma de cribado un paso extra que permitió explorar la toxicidad utilizando microscopía automatizada. Para realizarlo se desarrolló un programa de captura automática para imagen de campo claro en el microscopio Leica DMI8 que se encuentra equipado con una platina motorizada. Este programa toma una foto de baja magnificación de cada pocillo de la placa de 96, realizando primero un escaneo general en distintas posiciones del eje z y eligiendo, automáticamente, la posición que ofrece la mejor diferencia de contraste. Este paso se implementó previo a la lisis de la muestra y posterior al tratamiento de las células con los compuestos, lo que permitió la identificación rápida de compuestos que presentaban una alta toxicidad general a la concentración de uso o que afectaban de alguna manera la integridad celular (Fig. 13B). De esta manera, una vez identificados los compuestos activos (hits) para la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA, era posible hacer un análisis retrospectivo de las mismas muestras previo a la lisis celular, obteniendo así información adicional valiosa para los posibles compuestos activos, sobre todo a nivel de posibles falsos positivos.

La prueba de concepto del funcionamiento y robustez de esta plataforma se realizó con réplicas de muestras no irradiadas y UV irradiadas en el mismo gel y en diferentes geles paralelos. Al analizarse los parámetros estadísticos tales como CV% y

desviación estándar se observó que los mismos son incluso menores que los reportados para un WB de rutina (Fig. 13C). A su vez, se definió que el rango de inducción de la mono-ubiquitinación de PCNA en respuesta a UV es de al menos tres veces, dada la diferencia entre las muestras irradiadas (1.1 ± 0.2) y las no irradiadas (0.3 ± 0.1) (Fig. 13C).

De esta forma se obtuvo una plataforma de cribado con un rendimiento de 80 compuestos con 8 controles no irradiados y 8 controles irradiados por cada placa de 96 pocillos.

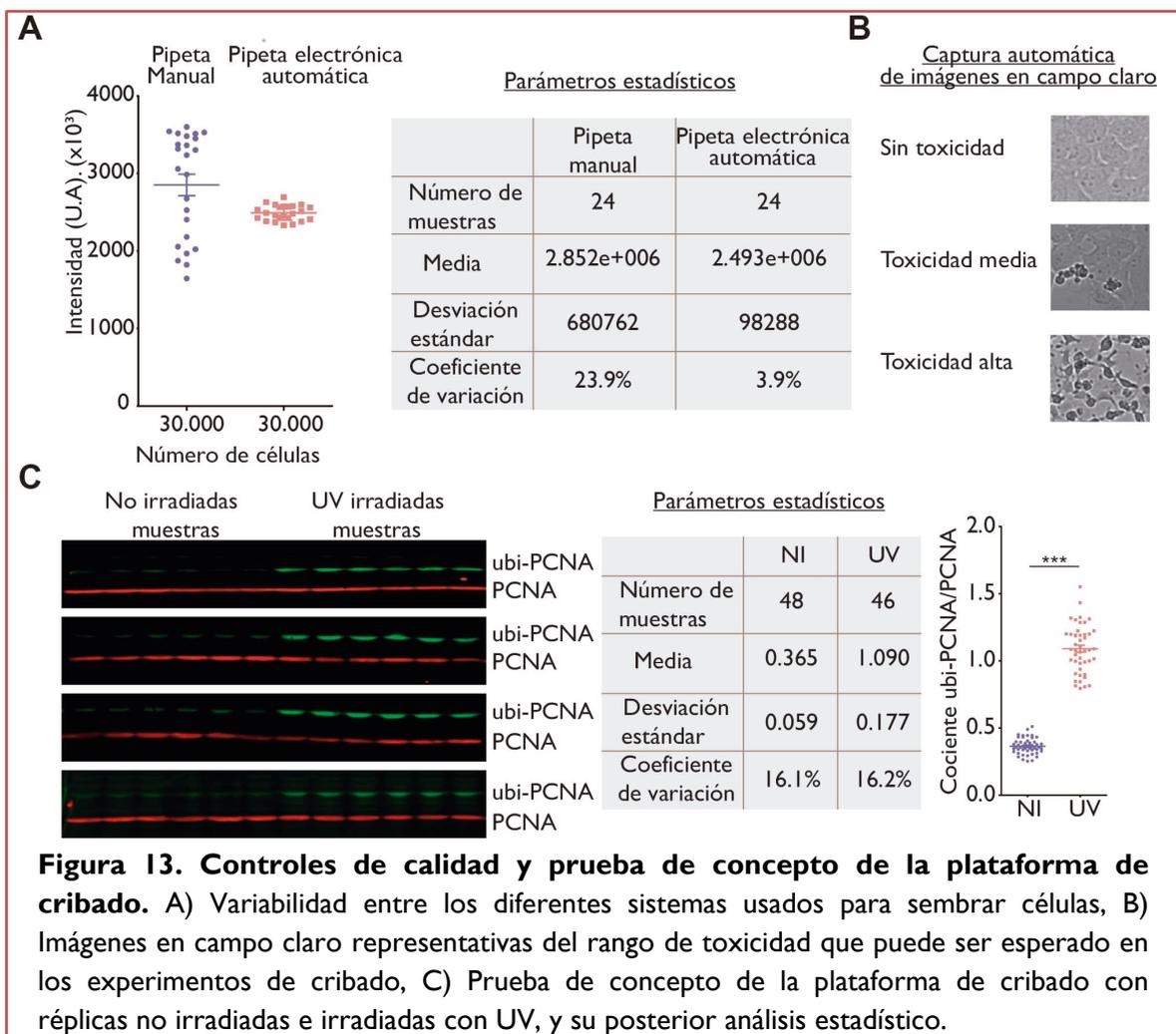


Figura 13. Controles de calidad y prueba de concepto de la plataforma de cribado. A) Variabilidad entre los diferentes sistemas usados para sembrar células, B) Imágenes en campo claro representativas del rango de toxicidad que puede ser esperado en los experimentos de cribado, C) Prueba de concepto de la plataforma de cribado con réplicas no irradiadas e irradiadas con UV, y su posterior análisis estadístico.

1.2 Desarrollo de una plataforma de cribado para detectar inhibidores en el reclutamiento de las polimerasas de TLS a sitios de daño UV

A manera de explorar opciones complementarias como estrategias de cribado se procedió a evaluar la factibilidad del desarrollo de una plataforma de microscopía basada en el reclutamiento de las polimerasas de translesión luego de irradiación UV. Para esta plataforma el objetivo principal era poder indagar en la funcionalidad de TLS, basada en la premisa del reclutamiento de polimerasas de TLS a sitios de daño de manera global, automatizada y robusta. Dado que la formación de focos de polimerasas de TLS es un marcador indirecto de la eficiencia de TLS [81] el objetivo de esta plataforma era obtener mediciones asociadas a este reclutamiento que permitan identificar inhibidores funcionales de TLS.

Nuestro laboratorio cuenta con cuatro plásmidos para la expresión de polimerasas de TLS fusionadas a GFP: Pol eta, Pol i, Pol k y REVI, los cuales se evaluaron en primera instancia mediante transfección transitoria. Las polimerasas GFP-Pol k, GFP- Pol eta y GFP-REVI efectivamente expresaron las proteínas en localización nuclear como era esperable pero la polimerasa k presentó una baja formación de foci luego de irradiación UV, que también había sido previamente reportado en la literatura [77] (Fig. 14). Una vez determinadas las mejores condiciones de transfección para las polimerasas GFP-Pol eta y GFP-REVI, y después de tres rondas de selección celular por “sorting” se obtuvieron dos líneas celulares con expresión estable de GFP-Pol eta y GFP-REVI.

Para el caso de GFP-REVI, luego de la observación inicial por microscopía se decidió proseguir con generación de líneas celulares mediante dilución clonal para GFP-REVI, dado que la línea estable obtenida presentaba localización variable de la

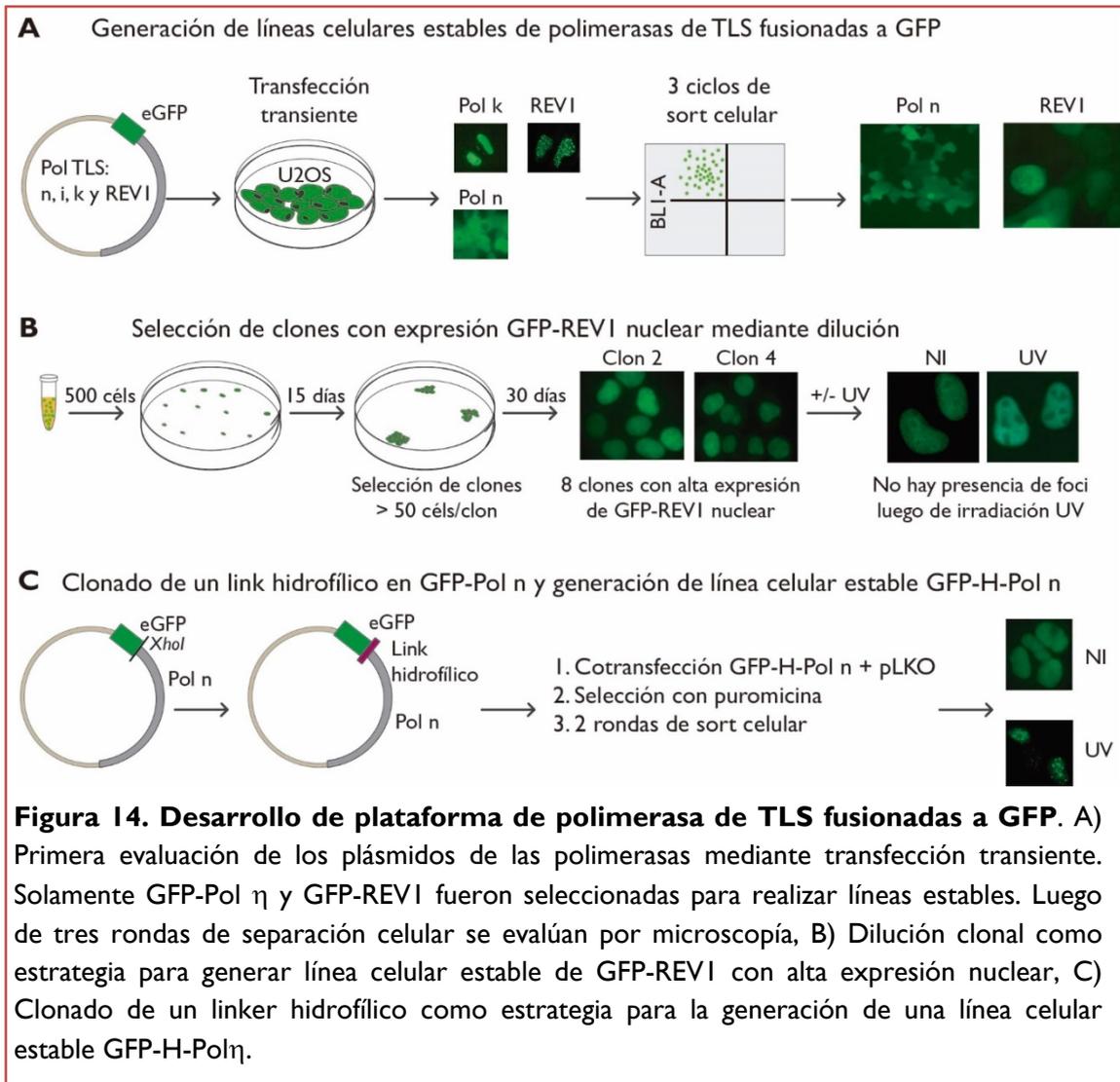
polimerasa (tanto nuclear como citoplasmática) (Fig. 14). Se obtuvieron en total 8 clones y un pool de clones agrupados denominado Bulk7 (7 clones). Bajo observación microscópica se constató que esta líneas estables tenían alta expresión nuclear de GFP-REVI. Sin embargo, luego de irradiación UV, en ninguno de los clones pudo observarse de manera clara la presencia de foci de GFP-REVI luego de irradiación UV, incluso a altas dosis (Fig. 14). Por lo tanto concluimos que no es posible detectar de manera estable foci de GFP-RevI luego de irradiación UV, por lo que esta herramienta no pudo utilizarse para los cribados planteados anteriormente.

En el caso de la línea celular estable GFP-Pol η , se observó que una baja proporción de células expresaban GFP-Pol η de manera nuclear como era esperado, mientras el resto lo hacía con localización citoplasmática. Dado que esto no se observaba en la transfección transitoria, se postuló que la expresión nuclear de esta polimerasa fusionada a GFP podría resultar tóxica para la célula y que esta toxicidad derivaba de la fusión de GFP a Pol η .

Se planteó generar un clonado insertando un linker hidrofílico flexible entre GFP y Pol η (GFP-H-Pol η) previamente reportado en la literatura como estrategia para mCherryPCNA para separar la secuencia de la proteína fluorescente de la secuencia de PCNA [82]. Este linker hidrofílico consiste en una cadena de 18 aminoácidos compuesta fundamentalmente por residuos glicina y glutamina que permite una separación física entre la proteína GFP y la proteína Pol η y brinda una mayor flexibilidad a la polimerasa de translesión para realizar su función en el núcleo. Posteriormente se co-transfectó con un plásmido que expresa un gen de resistencia a puromicina (pLKO). Luego de la co-transfección se realizó una selección con puromicina por 7 días y posteriormente se realizaron dos rondas de selección celular

por separación celular. La línea celular estable obtenida presenta alta expresión nuclear de GFP-Pol η , mostrando además alta eficiencia en formación de foci luego de irradiación UV (Fig. 14C).

La línea celular estable GFP-H-Pol η obtenida se utilizó posteriormente para evaluar la factibilidad de realizar cribados de inhibidores de la formación de foci por microscopía utilizando el microscopio Leica DMI8 con platina motorizada, el cual permite la captura de imágenes de manera automática en placa de 96 pocillos. Se desarrolló un MACRO de captura de imágenes utilizando el objetivo de 63X, con los mínimos requisitos que permitan cuatro capturas de diferentes campos por cada pocillo en dos canales (DAPI y GFP). Si bien se logró automatizar exitosamente este proceso, el equipo no fue capaz de adquirir más de 100 campos por placa, llevando irremediablemente al colapso del software de adquisición. Luego de reiteradas consultas con equipo técnico de Leica e investigación propia llevada a cabo por nuestro grupo, se llegó a la conclusión de que el software del microscopio no era capaz de manejar de manera eficiente tanta memoria RAM, lo cual causaba su detención luego de procesar aproximadamente un 25% de la placa de 96 pocillos. La imposibilidad de superar esta limitación en el equipamiento bloqueó el desarrollo de esta plataforma de cribado tal como había sido planteada. No obstante, la línea celular de expresión estable GFP-H-Pol η resultó de utilidad en etapas posteriores de validación de inhibidores que se identificaron con la plataforma de WB miniaturizado (Capítulo IV).



CONCLUSIONES: CAPÍTULO I

- 1- Luego de analizar diversas metodologías para cribar potenciales inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA, se seleccionó y optimizó la técnica de Western-Blot clásico para desarrollar un Western-Blot miniaturizado que permita generar una plataforma de cribado de mediano rendimiento.
- 2- Se desarrollaron controles de calidad y de toxicidad a esta plataforma para disminuir errores de tipo humano y falsos positivos en el cribado: destacándose la generación de una línea celular de expresión estable de iRFP para monitorear el sembrado y conteo celular en las placas de 96 pocillos y el desarrollo de un protocolo de captura automatizada de imágenes de cada tratamiento. La prueba de concepto de la plataforma final obtuvo un CV% aceptable entre réplicas técnicas y biológicas, presentando alta reproducibilidad.
- 3- Se logró un rendimiento final de la plataforma de cribado de 80 compuestos evaluados por cada experimento realizado en una placa de 96 pocillos, los cuales podían ser evaluados simultáneamente mediante 8 WB paralelos.
- 4- Se evaluaron diversas polimerasas de translesión fusionadas a GFP para llevar adelante una plataforma basada en el reclutamiento de las mismas luego de irradiación UV. Se obtuvieron varias líneas celulares estables con alta expresión nuclear para GFP- RevI pero con baja formación de foci luego de irradiación UV y una línea celular estable para GFP-H-Pol η con alta expresión nuclear y alta eficiencia en formación de foci luego de irradiación UV.

- 5- Se desarrolló un MACRO para la captura de imágenes utilizando el objetivo 63X con 4 campos por pocillo y dos canales (DAPI y GFP). A pesar de lograr automatizar este proceso, se descartó esta plataforma dado las limitaciones técnicas del microscopio Leica DMI8.

- 6- La línea celular estable GFP-H-Pol η fue utilizada para los experimentos descritos en el capítulo IV.

- 7- Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista High-Throughput. Link Open Access: <https://doi.org/10.3390/ht8020015>

RESULTADOS

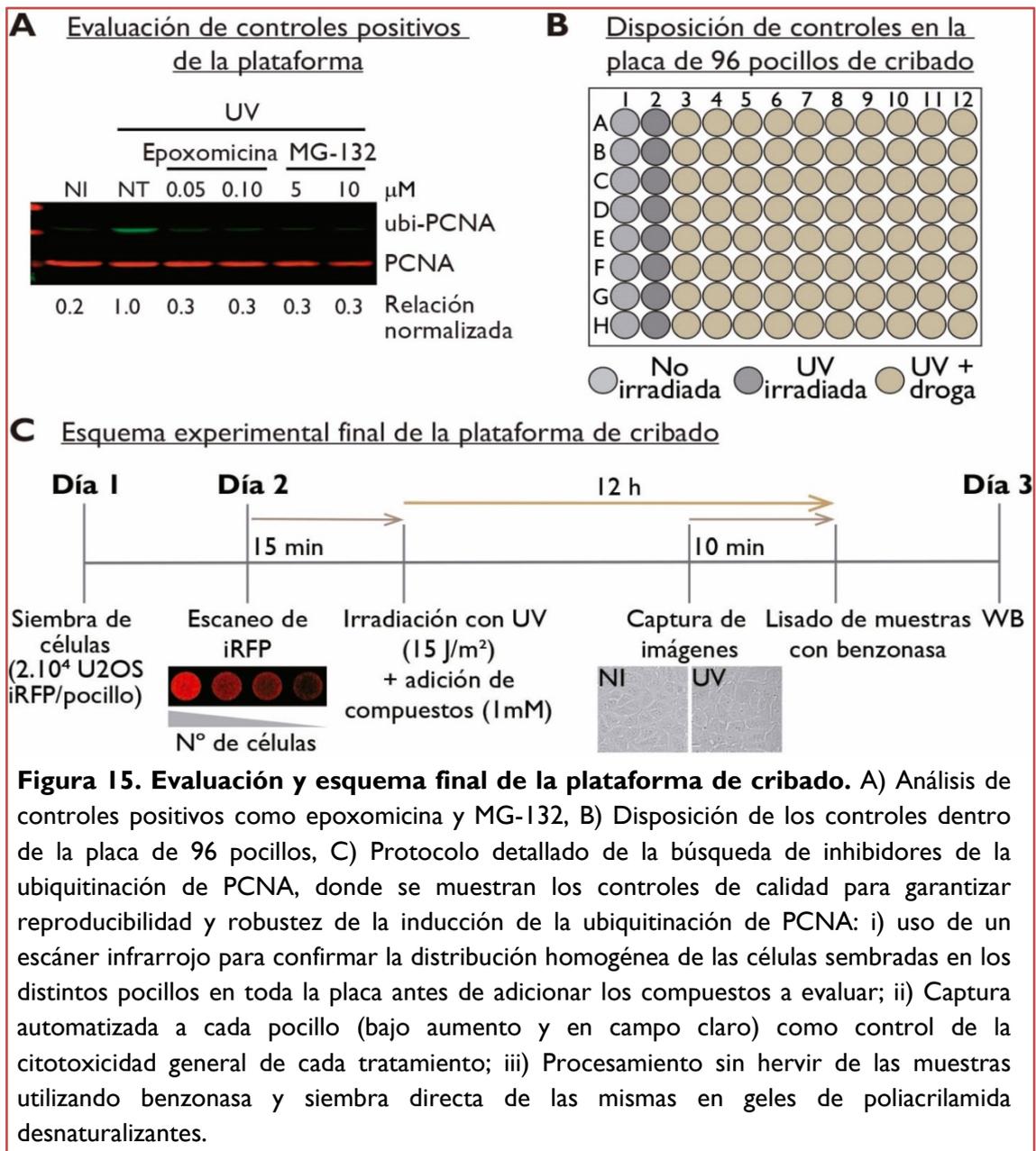
CAPÍTULO II

Cribado de una biblioteca de inhibidores de quinasas y validación temprana de hits

Para avanzar con el segundo objetivo específico planteado se procedió a definir y evaluar los posibles controles positivos a utilizar con la plataforma de Western-Blot miniaturizado, es decir compuestos que inhiban farmacológicamente la ubiquitinación de PCNA. Dado que al momento no existen inhibidores directos y selectivos de la ubiquitinación de PCNA que puedan ser utilizados como control positivo en el cribado, se evaluaron estrategias farmacológicas indirectas que pudieran bloquear la ubiquitinación a nivel global. Un trabajo previo del grupo de Alan Lehmann de la Universidad de Sussex indicaba que la inhibición del proteosoma, tenía como efecto secundario la inhibición de la ubiquitinación de PCNA [83]. Este efecto indirecto tiene lugar ya que los inhibidores del proteosoma depletan ubiquitina libre como consecuencia de la acumulación de proteínas ubiquitinadas no degradadas dentro de la célula, con lo cual se bloquea de manera global la ubiquitinación. Se evaluó entonces la respuesta de la inducción de la ubiquitinación de PCNA frente a dos inhibidores de proteosoma: epoxomicina y MG-132. Se concluyó que ambos compuestos inhiben farmacológicamente la ubiquitinación de PCNA, obteniendo valores de ubi-PCNA cercanos a la condición basal no irradiada (Fig. 15A).

Se determinó la mejor disposición de los controles dentro de una placa de 96 pocillos donde la primera columna corresponde a muestras no irradiadas, la segunda, a muestras UV irradiadas (controles basales e inducidos) y luego muestras irradiadas con el agregado de compuestos de cribado (Fig. 15).

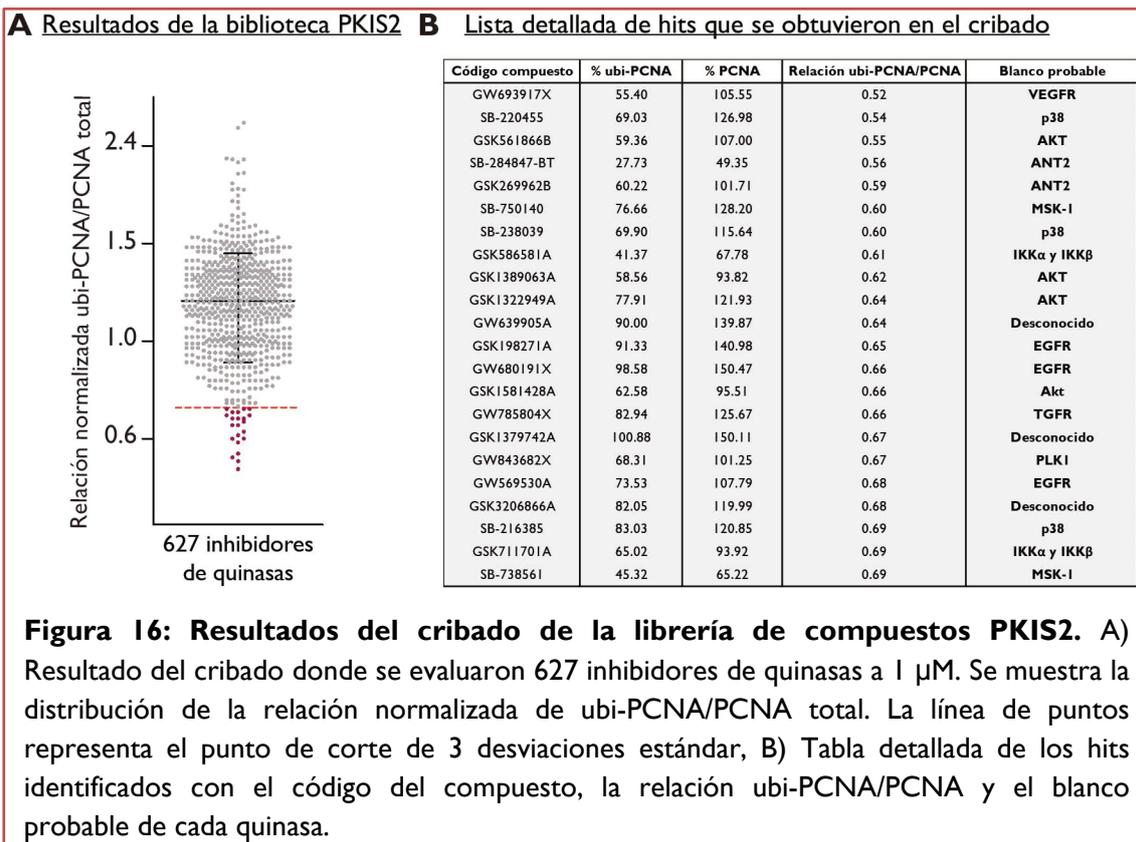
Para la realización del primer cribado con la plataforma operativa se decidió utilizar una biblioteca de inhibidores de quinasas. Se hipotetizó que dentro del kinoma humano [84] deben existir quinasas que regulen la ubiquitinación de PCNA en algún nivel, sea directa o indirectamente, y que por lo tanto puedan servir de prueba de concepto para este trabajo de tesis.



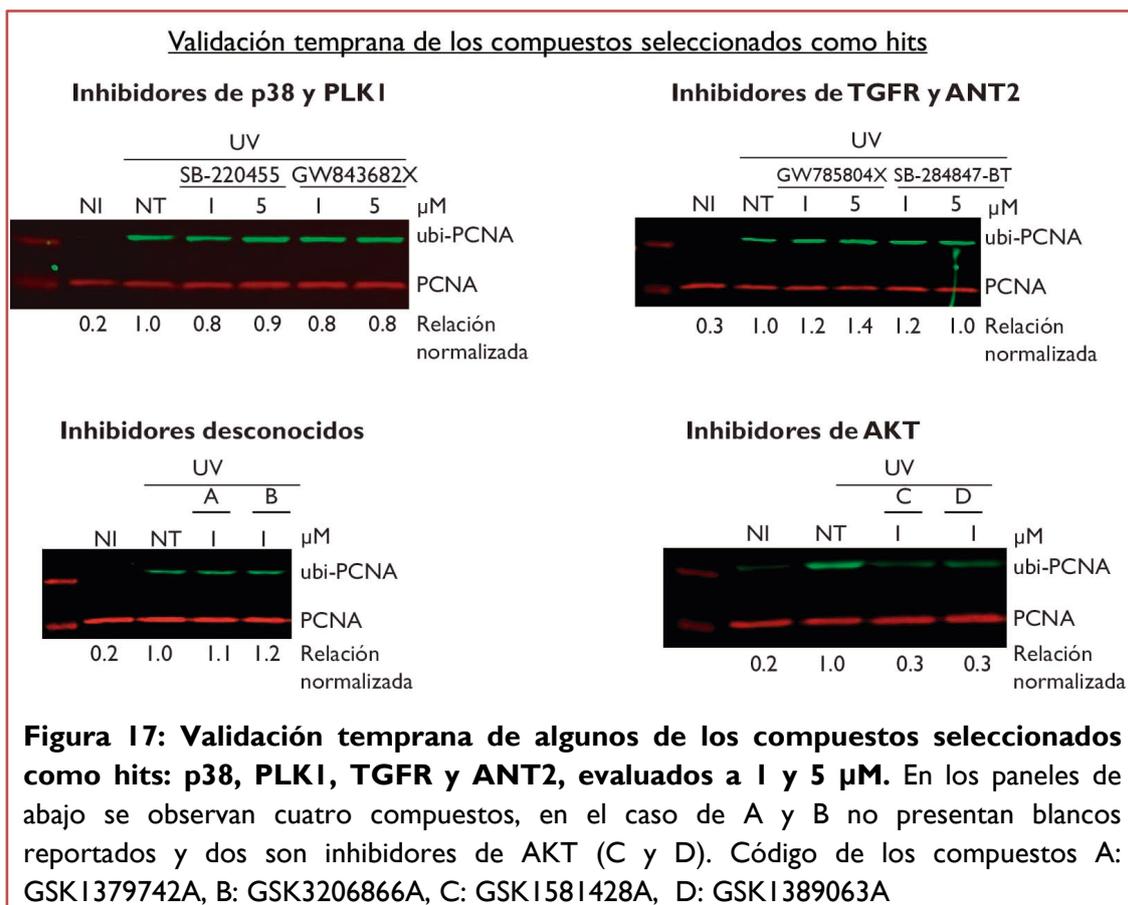
El cribado se realizó con una biblioteca de 627 inhibidores de quinasas de tipo ATP competitivos cedida en un esquema de colaboración por la farmacéutica

GlaxoSmithKline (PKIS2: Published Kinase Inhibitor Set 2). Esta biblioteca fue diseñada en un esfuerzo conjunto de las farmacéuticas AstraZeneca, Boehringer, Novartis, Bayer, AbbVie, Pfizer, Takeda California, Discover X y GlaxoSmithKline con el objetivo de fomentar la investigación básica y el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos. La biblioteca PKIS2 comprende 86 quimiotipos diversos y posee un porcentaje de falsos positivos menor a 0.5% para una concentración de cribado de 1 μM . Adicionalmente, dentro de los estudios realizados del desempeño de esta biblioteca, 357 compuestos presentaron un índice de selectividad 65 (SI 65) menor a 0.04. El índice de selectividad es una medida de la fracción de quinasas inhibidas (en un porcentaje mayor a 65% de inhibición) a una concentración de 1 μM , lo cual indica un alto rango de selectividad de los compuestos incluidos en la biblioteca [85, 86]

El cribado fue realizado combinando cada inhibidor a una concentración de 1 μM con una dosis de irradiación UV de 15J/m², evaluando los niveles finales de ubi-PCNA 12h post-UV. Como criterio para la identificación de hits se estableció que serían aquellos compuestos que presenten niveles de ubi-PCNA menores a 3 desviaciones estándar de la media de las 8 muestras controles irradiadas con UV de cada placa de cribado (Fig 15B). Se identificaron 22 hits con este punto de corte. El análisis inicial de bases de datos como PubChem y ChEMBL, así como de publicaciones recientes que utilizan la misma colección de inhibidores, nos permitieron determinar las principales quinasas blanco de los hits identificados (Fig. 16A y Fig. 16B).



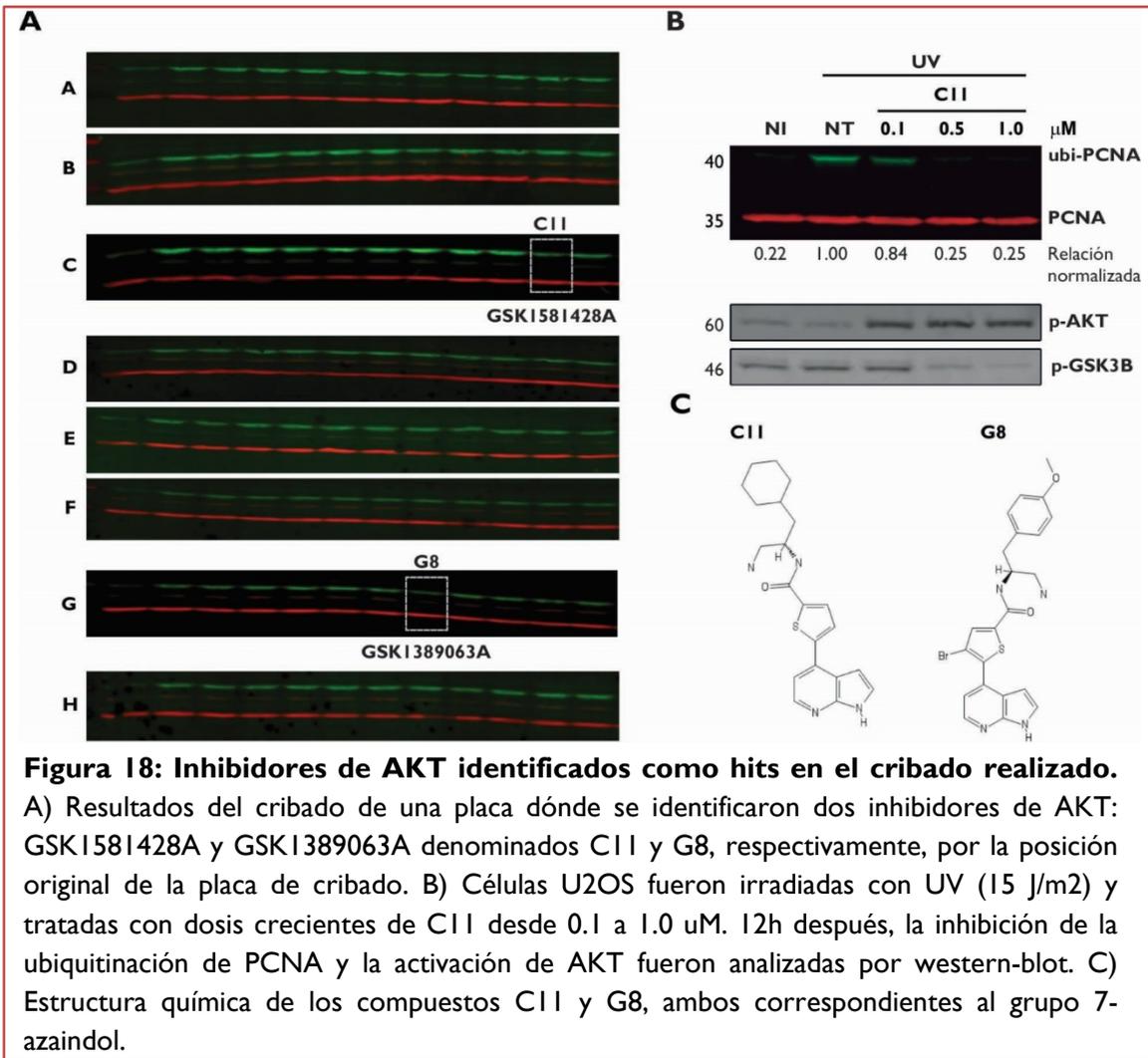
Se identificaron varias quinasas interesantes, para las cuales no se había reportado función y/o relación con el proceso de ubiquitinación de PCNA. En una etapa de validación temprana de estos hits se realizó la repetición del ensayo de western-blot por la metodología clásica a la misma concentración utilizada durante el cribado, e inclusive a concentraciones mayores con aquellos compuestos en los que no se observó toxicidad celular a nivel general (Fig. 17).



Este minucioso trabajo se realizó para cada uno de los 22 hits y algunos inhibidores relacionados. En la Figura 16C se muestran algunos ejemplos de compuestos que pasaron y no pasaron la etapa de validación.

Los compuestos más activos confirmados durante la validación temprana fueron dos inhibidores de AKT relacionados estructuralmente (GSK1581428A y GSK1389063A), los cuales mostraron una potente actividad como inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA. Por simplicidad se denominaron C11 y G8, respectivamente, dada su posición inicial en la placa de cribado donde fueron identificados (Fig. 18). Estos inhibidores pertenecen al conjunto de compuestos desarrollados para inhibir el *pocket* de ATP en la proteína AKT y poseen un anillo heterocíclico característico: 7-azaindol [87] (Fig 18C).

Durante esta etapa de validación temprana también se evaluó la activación de AKT (p-AKT) y los niveles de defosforilación de uno de sus blancos río abajo (p-GSK3 β) para confirmar que efectivamente tanto C11 como G8 tenían como blanco a AKT. Como se esperaba, la inhibición de p-GSK3 β fue marcada en ambos hits y llegando a valores cercanos a un 80% de inhibición (comparada con controles no irradiados e irradiados) para una concentración de 0.5 μ M de C11 y G8. Sorpresivamente, la forma fosforilada de AKT (p-Akt) aumentaba a esas concentraciones, lo cual ha sido reportado en literatura previamente para otro inhibidor de AKT: A-443654 [6]. Una de las posibilidades estudiadas para explicar este comportamiento en estos inhibidores es que se unen de una forma que impide la defosforilación de AKT y la misma se acumula en su forma fosforilada permaneciendo inactiva, como así lo demuestra el análisis de sus blancos río abajo. [88, 89] (Fig. 18B).



CONCLUSIONES: CAPÍTULO II

- 1- Se realizó un cribado de una biblioteca de 627 inhibidores de quinasas, identificando 22 hits.

- 2- Solamente dos inhibidores cuyo blanco principal es la quinasa de AKT pasaron exitosamente la etapa temprana de la validación: C11 y G8. La regulación de la mono-ubiquitinación de PCNA por medio de la actividad quinasa de AKT no fue reportada previamente.

- 3- La validación temprana confirmó la actividad de los compuestos C11 y G8 como inhibidores potentes (ATP-competitivos) de AKT.

RESULTADOS

CAPÍTULO III

La inhibición de AKT bloquea la mono-ubiquitinación de PCNA y la eficiencia de la síntesis por translesión luego de irradiación UV

3.1 La inhibición de AKT mediante distintas estrategias bloquea la mono-ubiquitinación de PCNA

Luego de la validación temprana de los inhibidores de la ubiquitinación de PCNA se realizó una batería de ensayos específicos con el propósito de evaluar si el fenotipo observado se debe a un efecto directo y/o indirecto de la inhibición de AKT o si podría tratarse de un efecto “*off-target*” de los inhibidores C11 y G8. Además se estudió si esta inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA mediante inhibidores de AKT generaba una alteración en el mecanismo global de TLS.

Para eliminar potenciales efectos *off-target* se evaluaron tres inhibidores comerciales con diferentes estructuras químicas: MK-2206, AZD5363 y GSK690693. En todos los casos, los inhibidores de AKT afectaron significativamente la mono-ubiquitinación de PCNA (Fig. 19). Entre estos inhibidores, MK-2206 es particularmente relevante dado que tiene un mecanismo de acción de tipo alostérico. En contraste con los inhibidores de tipo ATP competitivos que llevan a la acumulación de la forma inactiva de pAKT, MK-2206 bloquea la fosforilación de AKT (Fig. 19C). Además se confirmó que la actividad de AKT se encontraba sustancialmente afectada con todos los inhibidores dado que blancos de esta quinasa, tales como pGSK3b y pPRAS40, disminuyeron abruptamente luego del tratamiento con estos compuestos (Fig. 19).

Para complementar con evidencia genética que soporte la participación de AKT en la modulación de la ubiquitinación de PCNA se eligió una estrategia de

regulación negativa de la expresión de AKT mediante siRNAs. Consistentemente, el silenciamiento génico de AKT inhibió la inducción de la ubiquitinación de PCNA en respuesta UV, recapitulando los efectos de la inhibición farmacológica de AKT y confirmando su participación en la ubiquitinación de PCNA (Fig. 19D). Conjuntamente, los experimentos de inhibición farmacológica de AKT y de la modulación negativa de su expresión mediante siRNA conducen a la conclusión de que AKT promueve la ubiquitinación de PCNA luego de la irradiación UV.

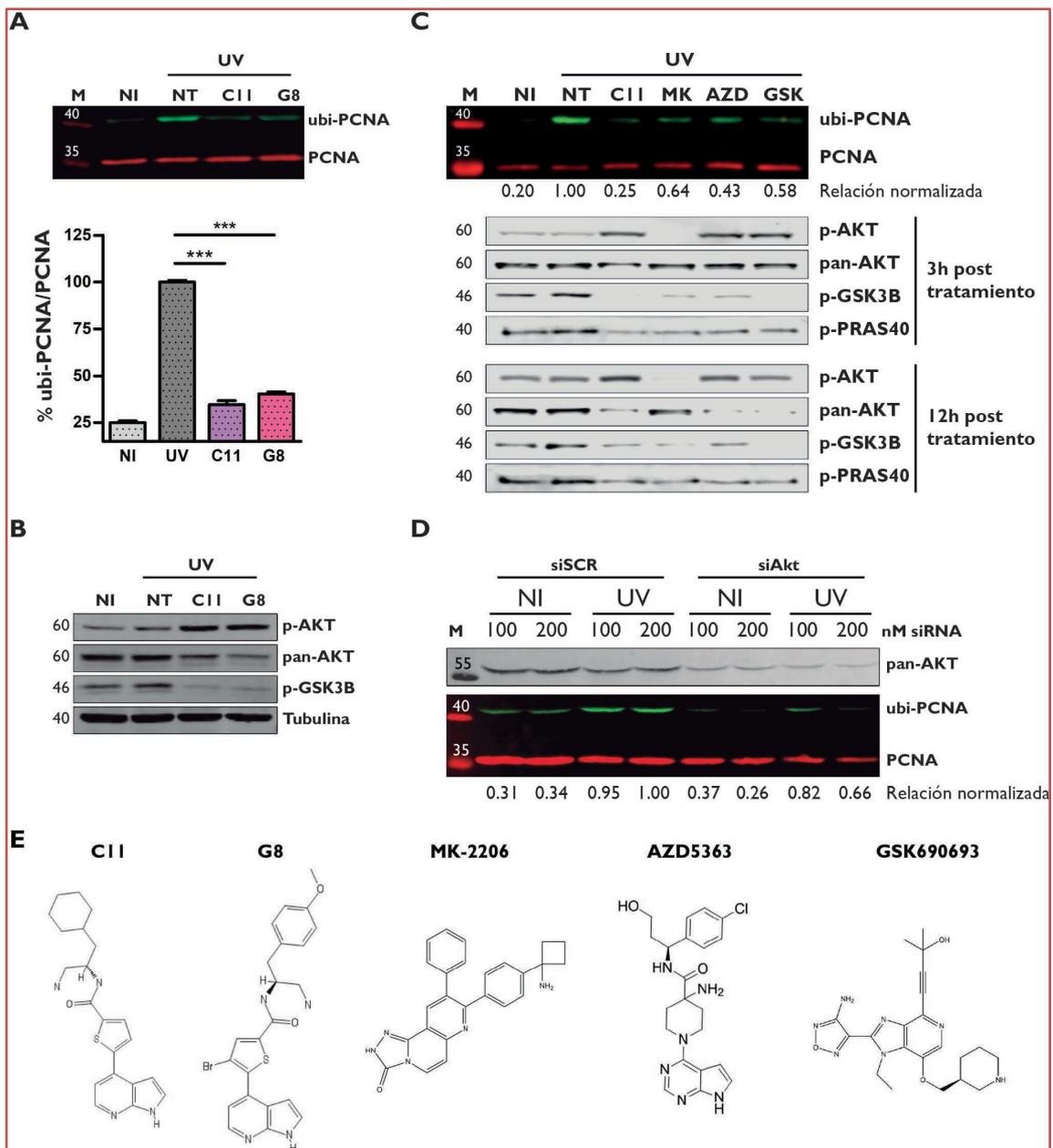


Figura 19: La inhibición de AKT bloquea la ubiquitinación de PCNA. A) Se irradiaron células U2OS (UV 15J/m²) y se trataron durante 12 h con los inhibidores indicados a 1 μM. El gráfico del panel inferior muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con el post-test Tukey Kramer (***: $p \leq 0.001$). B) Células U2OS fueron tratadas como en A) y las muestras se procesaron para detectar los niveles de pAKT, AKT total y p-GSK3β. α-tubulina se utilizó como control de carga. C) Células U2OS fueron pre-tratadas por 12 h usando 0.5 μM de C11 y 5 μM de inhibidores comerciales de AKT no relacionados estructuralmente: MK-2206 (Merck), AZD5363 (AstraZeneca), GSK690693 (GlaxoSmithKline). Luego de la irradiación (UV 15J/m²), se agregaron los inhibidores a 20 μM, salvo C11 que se utilizó a 1 μM. Se realizaron WB para evaluar pAKT, AKT, p-GSK3β y p-PRAS40 luego de 3 y 12 h de post-tratamiento para confirmar la inhibición de la actividad de AKT de cada compuesto. D) Se transfectaron células U2OS con dos concentraciones de siRNAs contra AKT. Luego de 48 h, las células se irradiaron (UV 15J/m²), y 12 h más tarde las muestras se procesaron para la determinación de la ubiquitinación de PCNA por WB, E) Estructura química de todos los inhibidores de AKT utilizados.

3.2 La inhibición de AKT no modifica los valores basales de ubi-PCNA en células no perturbadas y está vinculada con la actividad quinasa de PI3K y DNA PKCs

Para obtener un mayor conocimiento del eje de señalización de AKT involucrado en promover la ubiquitinación de PCNA, se exploró la inhibición de múltiples quinasas que podrían estar involucradas en la activación directa o indirecta de AKT en respuesta a UV. En primer lugar, se observó que la inhibición de la reconocida quinasa PI3K, que actúa río arriba de AKT, condujo a una fuerte inhibición de la ubiquitinación de PCNA (Fig. 20A). Este resultado confirma claramente que si los niveles celulares de pAKT son reducidos, la inducción de ubi-PCNA luego de la irradiación UV es críticamente afectada. PI3K participa en la activación de AKT en respuesta a varios ligandos fisiológicos pero no ha sido directamente relacionada con la activación de AKT luego de un estímulo genotóxico.

Por lo tanto, también se decidió investigar las “PI3K-like” de respuesta al daño al ADN: ATM, ATR y DNA-PKcs. Se observó que tanto la inhibición de ATM como de ATR no bloquearon la inducción de la ubiquitinación de PCNA luego de UV, mientras

que la inhibición de DNA-PKcs sí lo hizo, aunque con menor eficiencia que cuando se inhibe PI3K (Fig. 20A). Por este motivo, también se evaluó la inhibición de DNA-PKcs combinada con una dosis sub-óptima del inhibidor de AKT CII (Fig. 20B). El efecto aditivo observado, en conjunto con reportes previos indicando que DNA-PKcs fosforila y regula AKT en respuesta a irradiación UV [90], sugieren la posibilidad de que ambas quinasas sean parte de la misma respuesta celular para promover la ubiquitinación de PCNA.

En línea con esta noción, ninguno de los inhibidores que bloquean la inducción de la ubiquitinación de PCNA luego de UV (incluyendo el potente inhibidor de AKT CII) fueron capaces de alterar los niveles basales de ubi-PCNA en células no perturbadas (Fig. 20C). Esta conclusión fue respaldada por experimentos utilizando siRNAs contra la deubiquitinasa de PCNA: USPI. Bajo condiciones donde no hay perturbaciones en el sistema, la disminución de los niveles de USPI lleva a un aumento sustancial de la ubiquitinación de PCNA, la cual fue solo ligeramente atenuada por la inhibición de AKT (Fig. 20D). Por lo tanto, concluimos que AKT es selectivamente requerido para la eficiente ubiquitinación de PCNA en respuesta al estrés replicativo inducido por la irradiación UV.

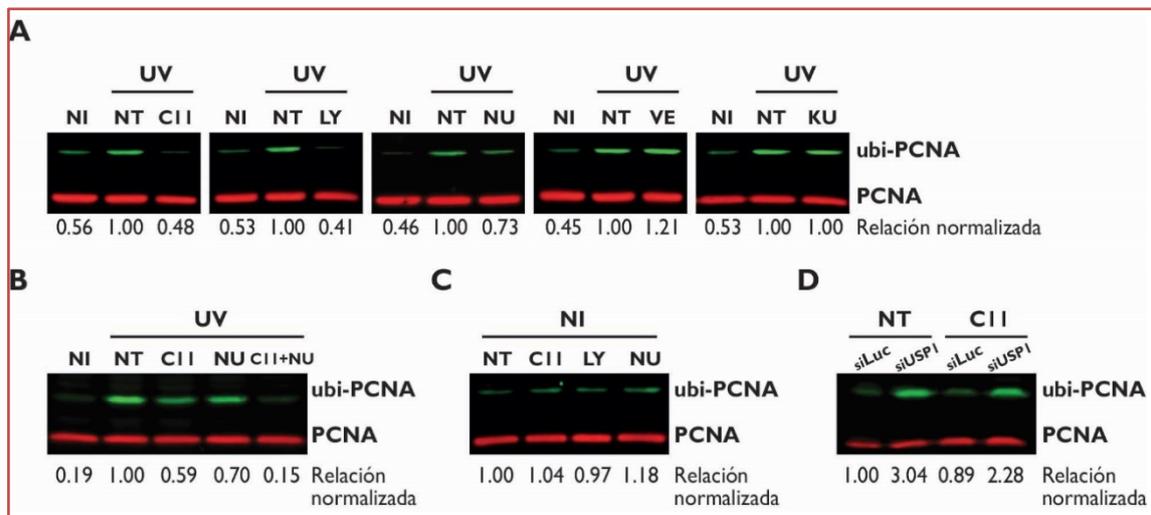


Figura 20: La inhibición de AKT bloquea la ubiquitinación de PCNA únicamente en condiciones de estrés replicativo. A) Células U2OS fueron pre-tratadas durante 12h con los siguientes inhibidores de quinasas: inhibidor de PI3K (LY294002, 50 μ M), inhibidor de ATR (VE-821, 1 μ M), inhibidor de ATM (KU-55933, 1 μ M), inhibidor de DNA-PKcs (NU7026, 20 μ M) y el inhibidor de AKT C11 (1 μ M). Luego, las células fueron irradiadas con UV (15 J/m²), y tratadas durante 12 h con los inhibidores y concentraciones mencionados anteriormente. B) Células U2OS fueron tratadas en paralelo o de manera combinada con dosis subóptimas del inhibidor C11 (0.1 μ M) y la dosis óptima del inhibidor NU7026 (20 μ M). C) Células U2OS fueron tratadas durante 12 h con la dosis óptima de un determinado inhibidor de quinasas (LY294002 50 μ M, NU7026 20 μ M and C11 1 μ M). D) Se transfectaron células U2OS con el siRNA específico para USP1 (75 nM). Luego de 48 h, las células se trataron con 1 μ M de C11 y 12 h después fueron procesadas para cuantificar la ubiquitinación de PCNA por WB.

3.3 La inhibición de AKT bloquea la activación de marcadores de TLS y altera la procesividad de la horquilla de replicación

Para confirmar si el bloqueo de la ubiquitinación de PCNA desencadenada por la inhibición de AKT es suficiente para alterar los parámetros funcionales de TLS, se realizaron diferentes ensayos específicos.

Dado que ubi-PCNA es requerido para dirigir eficientemente a las polimerasas de TLS a los sitios de daño en el ADN, se evaluó inicialmente el reclutamiento de la polimerasa η de TLS a sitios de ADN dañado. Para analizar este fenómeno en grandes poblaciones celulares, se empleó la línea celular estable GFP-H-Pol η , cuyo protocolo de generación fue descrito en el Capítulo I. En primer lugar, se realizó irradiación local de UV con filtros de policarbonato que poseen poros de 5 μ m, los cuales permiten la irradiación de áreas discretas dentro del núcleo que pueden ser identificadas mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos contra uno de los principales tipos de lesiones inducidas por UV: dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs) (Fig. 21A). Una vez identificadas las áreas dañadas, se realizó el análisis microscópico de áreas positivas para el reclutamiento focal GFP-H-Pol η en presencia y ausencia de la inhibición de AKT. Mientras que en las condiciones control el

reclutamiento de GFP-H-Pol η fue observado en casi la totalidad de las células positivas para CPDs, en las condiciones de inhibición para AKT menos del 50% de las células positivas para CPDs mostraron niveles detectables de reclutamiento de GFP-H-Pol η (Fig. 21B).

Para confirmar el resultado obtenido mediante irradiación local, se utilizó un método basado en la irradiación global con UV donde la placa completa es irradiada con una dosis menor de UV y, previo a la fijación, las células son tratadas con un pulso corto de PBS conteniendo 0.1% Tritón (Fig. 21C). De esta forma la fracción de GFP-H-Pol η unida a la cromatina permanece cargada en los sitios de ADN dañado, mientras que la fracción soluble es extraída de la célula por el detergente. Para cuantificar la cantidad de fluorescencia total de GFP-H-Pol η de las células se desarrolló un Macro con el software de análisis de imágenes Image J, utilizando DAPI para la identificación de núcleos y su segmentación. Luego de utilizar este Macro para cuantificar varias imágenes de cada condición, confirmamos que la inhibición de AKT afecta severamente la fracción de GFP-H-Pol η retenida en la cromatina luego de la irradiación UV (Fig. 21D). En consecuencia, pudimos concluir que la inhibición de AKT afecta dos parámetros funcionales de TLS: la ubiquitinación de PCNA y el reclutamiento de las polimerasas de translesión a los sitios de daño del ADN.

Los datos obtenidos hasta el momento indicaban que TLS se encuentra afectada cuando la quinasas AKT es inhibida luego de la irradiación UV. Para obtener aún más evidencia que soporte esta conclusión, se decidió realizar análisis de fibras de ADN para estudiar la procesividad de las horquillas de replicación luego de UV. La técnica de análisis de fibras de ADN permite el marcado de horquillas de replicación activas *in vivo* mediante la incorporación secuencial de dos análogos de nucleótidos halogenados: IdU (5-Iodo-2'-deoxiuridina) y CldU (5-Cloro-2'-deoxiuridina) en la

hebra nascente de ADN. Luego que los nucleótidos han sido incorporados, las células son lisadas y fibras de ADN únicas son estiradas en un portaobjetos de vidrio para microscopio. Consecutivamente, los tramos de ADN nascente marcados por los nucleótidos son inmunomarcados con anticuerpos dirigidos específicamente a estos nucleótidos y visualizados mediante microscopía de fluorescencia. De esta manera una horquilla de replicación activa se observa compuesta por dos tramos de señales roja y verde respectivamente. Esta técnica fue aprendida durante una pasantía realizada en el Instituto Leloir bajo la supervisión de la Dra. Vanesa Gottifredi y la Dra. Sabrina Mansilla [91]

La hipótesis de trabajo fue que si la activación de TLS se encuentra afectada luego de la inhibición de AKT, la procesividad de la horquilla de replicación de ADN también debería estar afectada. Se trabajó con pulsos secuenciales de CIdU e IdU en células irradiadas con UV y se realizó la medición del largo total de fibras bi-color de ADN, las cuales permiten determinar la procesividad relativa de las horquillas de replicación (Figura 21E). Se observó una disminución significativa en la velocidad media de la elongación de ADN cuando las células irradiadas fueron tratadas con CII (Fig. 21F). Dicha capacidad de procesamiento deficiente de las horquillas de replicación se encuentra en línea con los efectos de la inhibición de AKT observados sobre los niveles de ubi-PCNA (Fig. 18) y sobre el reclutamiento de la polimerasa de translesión η a los sitios de daño del ADN (Fig. 21 B y D).

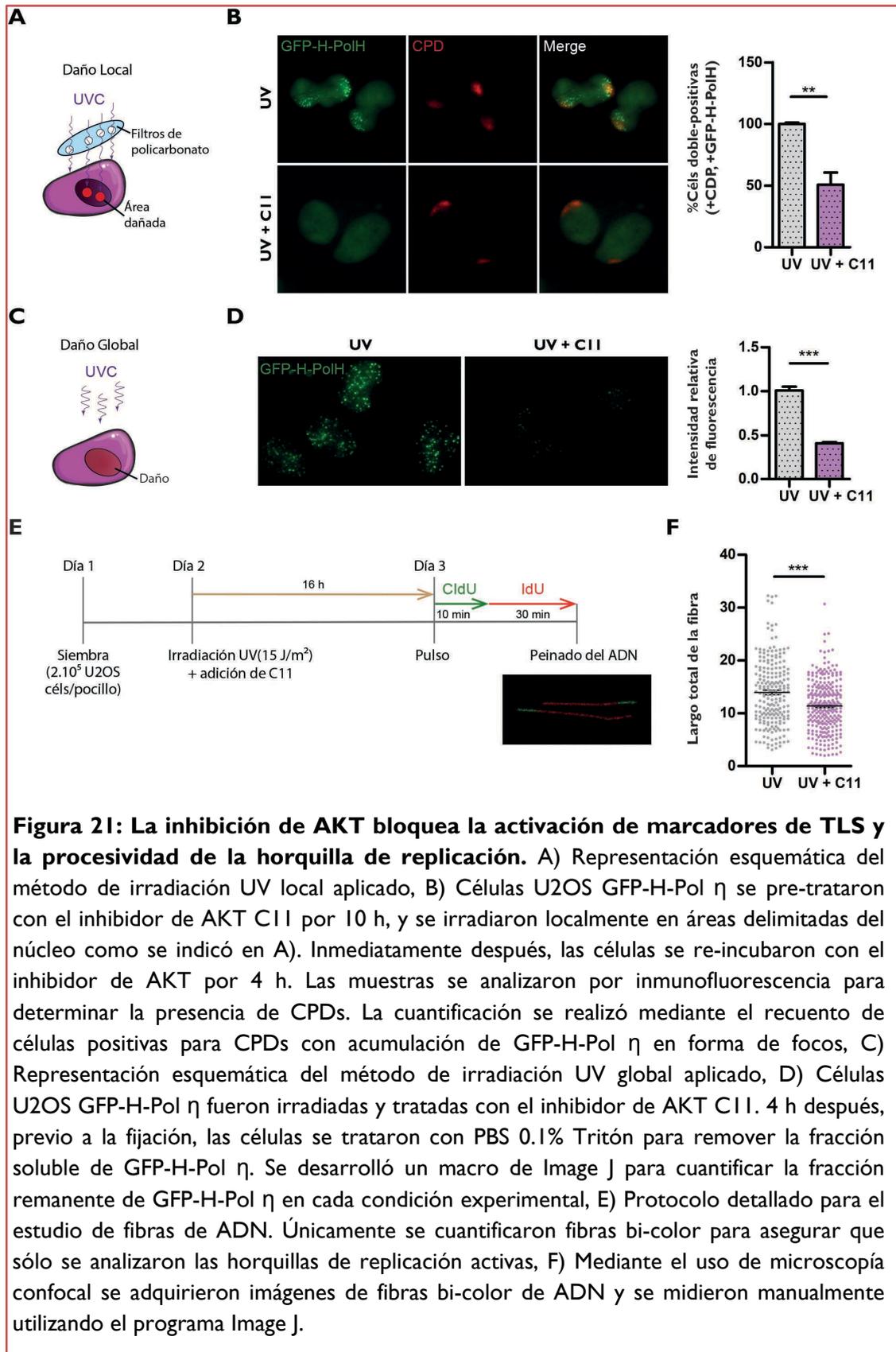
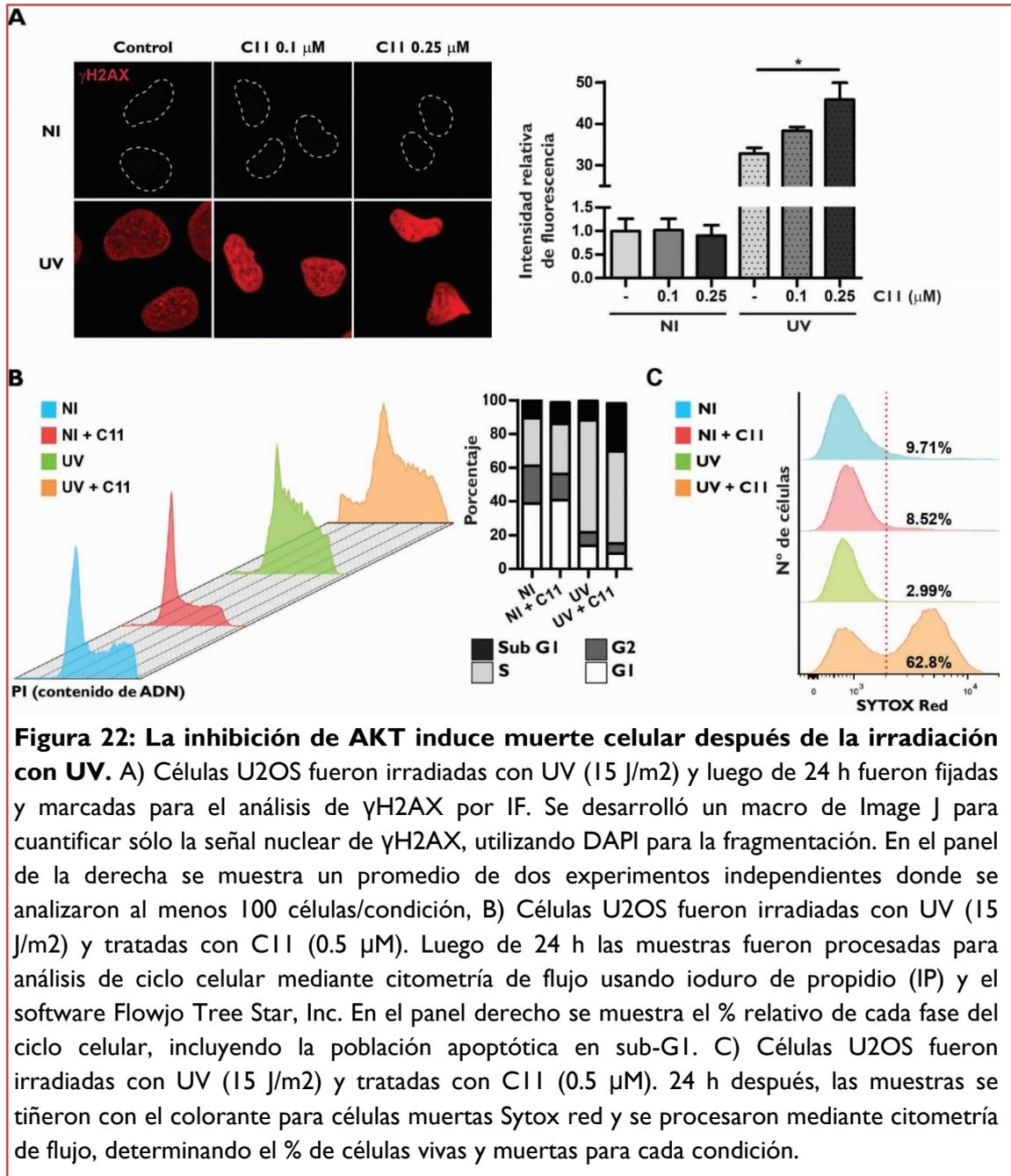


Figura 21: La inhibición de AKT bloquea la activación de marcadores de TLS y la procesividad de la horquilla de replicación. A) Representación esquemática del método de irradiación UV local aplicado, B) Células U2OS GFP-H-Pol η se pre-trataron con el inhibidor de AKT C11 por 10 h, y se irradiaron localmente en áreas delimitadas del núcleo como se indicó en A). Inmediatamente después, las células se re-incubaron con el inhibidor de AKT por 4 h. Las muestras se analizaron por inmunofluorescencia para determinar la presencia de CPDs. La cuantificación se realizó mediante el recuento de células positivas para CPDs con acumulación de GFP-H-Pol η en forma de focos, C) Representación esquemática del método de irradiación UV global aplicado, D) Células U2OS GFP-H-Pol η fueron irradiadas y tratadas con el inhibidor de AKT C11. 4 h después, previo a la fijación, las células se trataron con PBS 0.1% Tritón para remover la fracción soluble de GFP-H-Pol η . Se desarrolló un macro de Image J para cuantificar la fracción remanente de GFP-H-Pol η en cada condición experimental, E) Protocolo detallado para el estudio de fibras de ADN. Únicamente se cuantificaron fibras bi-color para asegurar que sólo se analizaron las horquillas de replicación activas, F) Mediante el uso de microscopía confocal se adquirieron imágenes de fibras bi-color de ADN y se midieron manualmente utilizando el programa Image J.

Debido a que AKT promueve la activación de TLS, deducimos que la inhibición de AKT en células irradiadas con UV debería conducir a un aumento del estrés replicativo, daño en el ADN y, potencialmente, muerte celular. Para probar esta hipótesis, primero exploramos la fosforilación de la histona H2AX como un marcador amplio de inducción de daño en el ADN. Como se esperaba, mientras γ H2AX no aumentó marcadamente luego de la inhibición de AKT en células no irradiadas, sí lo hizo luego de la irradiación UV (Fig. 22A); sugiriendo que el aumento en la fosforilación de H2AX en estas células puede estar relacionada a la inhibición de TLS.

Posteriormente se procedió a evaluar la progresión del ciclo celular en concomitancia con la inhibición de AKT luego de irradiación UV. Estos análisis revelaron que la inhibición de AKT no induce un cambio marcado en el perfil de las células no irradiadas, provocando sólo una pequeña disminución de la población celular en G2 y un pequeño aumento en la población sub-G1 (Fig. 22B). Como era esperable, la irradiación UV condujo a una acumulación notable de células en fase S como resultado del estrés replicativo. Notablemente, cuando la irradiación UV fue combinada con la inhibición de AKT, se observó un aumento sustancial en la población sub-G1, sugiriendo la activación rápida del programa de apoptosis en estas células (Fig. 22B). La confirmación de muerte celular inducida por la irradiación UV en combinación con la inhibición de AKT fue realizada utilizando el colorante de muerte celular Sytox red [92], el cual confirmó una pronunciada disminución en la viabilidad celular (Fig. 22C).



CONCLUSIONES: CAPÍTULO III

- 1- Se confirmó que la inhibición de AKT utilizando diferentes estrategias experimentales (farmacológicas y genéticas) inhibe la ubiquitinación de PCNA en células sometidas a irradiación UV.

- 2- La inhibición de PI3K y DNA-PKcs modulan la ubiquitinación de PCNA

- 3- La inhibición de AKT afecta el reclutamiento de la polimerasa de TLS η a sitios de ADN dañado, así como la procesividad de la horquilla de replicación en células sometidas a irradiación UV.

- 4- La inhibición de ubi-PCNA mediante la inhibición de AKT en células irradiadas se correlaciona con la generación de daño en el ADN, la inducción de estrés replicativo y el disparo de muerte celular

RESULTADOS

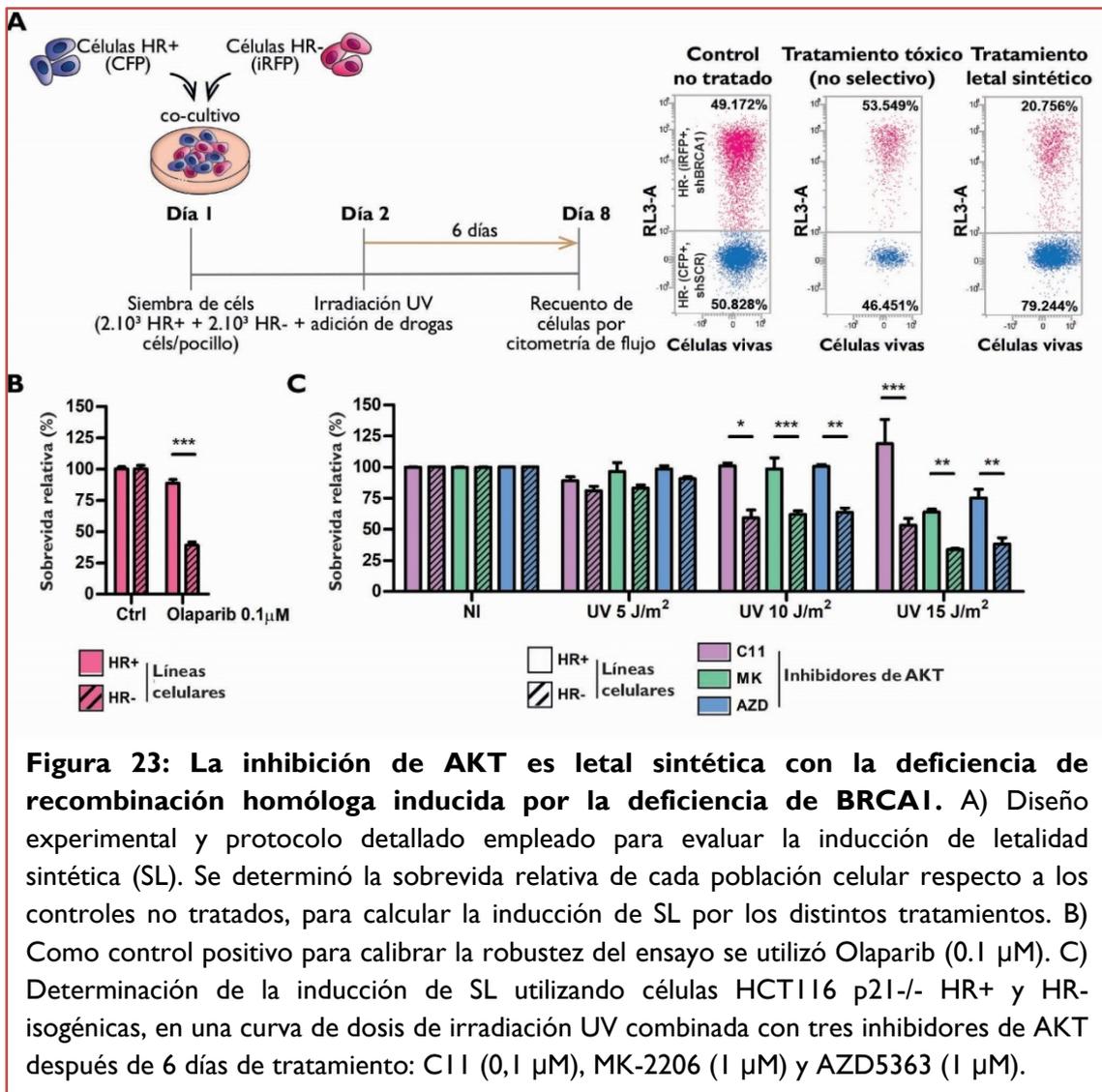
CAPÍTULO IV

La inhibición de AKT luego de irradiación UV es letal sintética en células deficientes en Recombinación Homóloga

Con el fin de analizar el potencial de inducción de Letalidad Sintética (LS) de la inhibición de AKT en ensayos con células deficientes en recombinación homóloga se utilizó inicialmente un método generado en el laboratorio. Este consiste en el co-cultivo de células proficientes y deficientes en recombinación homóloga en el mismo pocillo, con la posterior determinación del porcentaje de células de cada población que sobrevive al tratamiento. En este diseño experimental, la deficiencia en HR en contextos isogénicos es inducida experimentalmente mediante la transducción lentiviral de shRNAs contra BRCA1.

La disminución en los niveles de BRCA1 fue evaluada por western blot y la inhibición de HR fue confirmada utilizando el método de “direct repeats” descrito por el laboratorio de Maria Jasin [93, 94]. Dado que la población de células proficientes en HR (shSCR) y la población de células deficientes en HR (shBRCA1) expresan diferentes proteínas fluorescentes, la viabilidad relativa de ambas poblaciones celulares es determinada al final del experimento mediante recuento celular total de células en cada pocillo por citometría de flujo automatizada (Fig. 23A). Este ensayo permite discriminar si un tratamiento (o una combinación de tratamientos) es igual o selectivamente tóxico para una determinada población celular [94]. Como control positivo de la inducción de letalidad sintética se utilizó el inhibidor de PARPs Olaparib, un reconocido inductor de letalidad sintética en células HR-deficientes (Fig. 23B).

Notablemente, la combinación de irradiación UV y la inhibición de AKT, empleando distintos inhibidores, dispararon una fuerte inducción de LS en una manera dependiente de la dosis de UV utilizada (Fig. 23C). Este resultado fue sumamente importante, pues proporcionó la primera prueba de concepto experimental de que la inhibición de la ubiquitinación de PCNA puede disparar LS en células tumorales deficientes en recombinación homóloga.

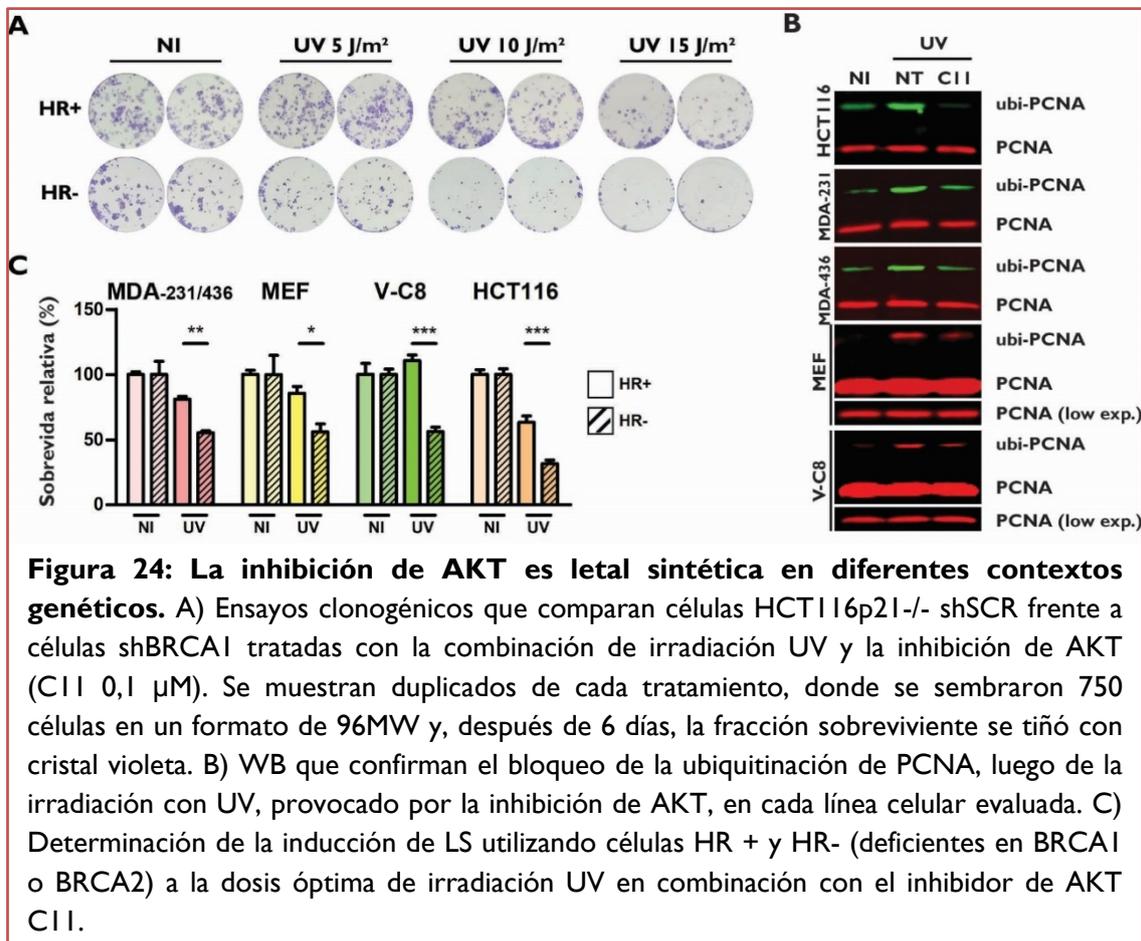


Para eliminar posibles artefactos derivados del co-cultivo de las poblaciones proficientes y deficientes en BRCA1, también se realizaron ensayos clonogénicos en

monocultivo con cada línea celular. Se observó una disminución del potencial clonogénico en las células deficientes en HR tratadas con CII, en comparación con células proficientes en HR tratadas con el mismo inhibidor (Fig. 24A). Para validar este fenotipo de LS en diferentes contextos genéticos, realizamos experimentos de sobrevivencia con múltiples pares de líneas isogénicas y no isogénicas (HR-proficientes vs HR-deficientes). Utilizamos un par de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB 231-BRCA1wt vs MDA-MB 436-BRCA1KO), un set de células MEF wild-type (shSCR vs shBRCA1), una línea de hamster BRCA2 KO y su contraparte reconstituida (VC8 vs VC#13) y un par de líneas HCT116 (shSCR vs shBRCA2). La condición indispensable para seleccionar estas líneas fue la sensibilidad selectiva al inhibidor de PARP Olaparib en la contraparte deficiente en BRCA de cada par. En todas las líneas celulares, la inhibición de AKT afectó la inducción de la ubiquitinación de PCNA (Fig. 24B) e indujo LS en la contraparte deficiente en HR de cada par evaluado luego de irradiación UV (Fig. 24C). Conjuntamente, estos resultados nos permitieron concluir que la inhibición de AKT en el contexto de irradiación UV induce LS en células HR-deficientes.

Los resultados obtenidos hasta este momento indicaban claramente que la inhibición de AKT afecta la ubiquitinación de PCNA (Capítulo III) y que induce LS en un contexto genético deficiente en HR luego de UV (Figs. 23 & 24 de este capítulo). No obstante, estos resultados no son suficientes para demostrar una relación directa entre estos fenotipos, principalmente debido a las múltiples funciones descritas para AKT en procesos celulares que promueven la sobrevivencia [95]. Por este motivo, se utilizaron modelos experimentales adicionales que permitan estudiar la contribución de

la ubiquitinación de PCNA en la sobrevivencia de células HR-deficientes sometidas a irradiación UV en manera independiente de AKT.



Como enfoque inicial se evaluó la disminución de los niveles de expresión de RAD18, la E3 ligasa responsable de la mono-ubiquitinación de PCNA, mediante la utilización de vectores lentivirales con shRNAs. Se evaluaron cuatro secuencias diferentes de shRNAs y se seleccionaron dos que mostraban una marcada disminución de RAD18 y que afectaban severamente la ubiquitinación de PCNA luego de UV (Fig. 25 A & B). Posteriormente, se adaptó el ensayo de inducción de LS para evaluar el impacto del silenciamiento de RAD18 en la LS relacionada a la irradiación UV y a la proficiencia de HR (Fig. 25). El aumento de la sensibilidad a la irradiación UV en las células transducidas con shRAD18 se observó exclusivamente en la línea celular

deficiente en HR, pero no en su contraparte isogénica proficiente en HR. Este resultado soporta las conclusiones previas, indicando que la inhibición de la ubiquitinación de PCNA desencadena LS en células deficientes en HR expuestas a UV (Fig. 25D). Sin embargo, el hecho de que RAD18 no es una E3 ligasa exclusiva de PCNA dificulta concluir de manera fehaciente una simple relación causa-efecto y entre la inhibición de la ubiquitinación de PCNA y la inducción de LS.

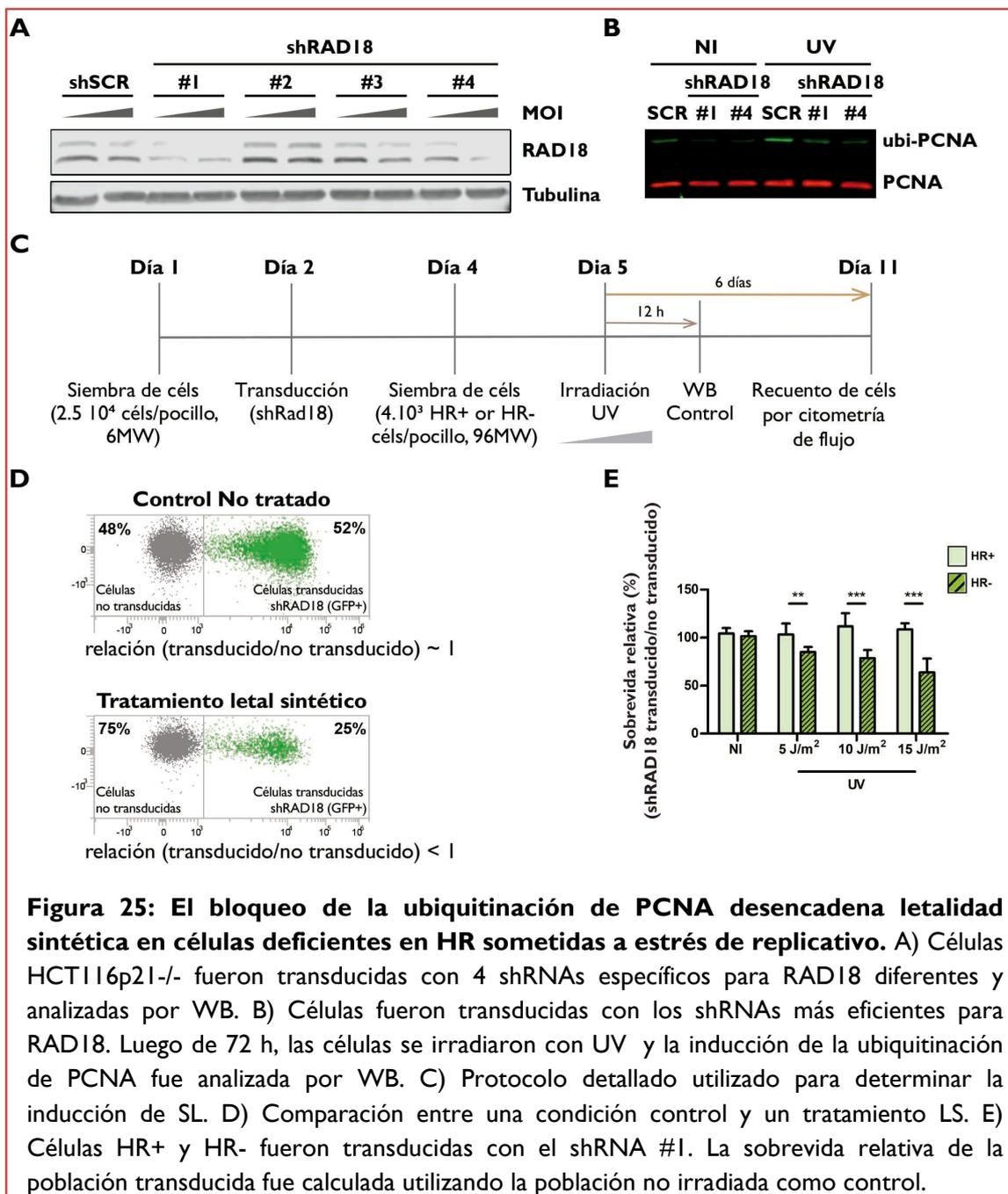
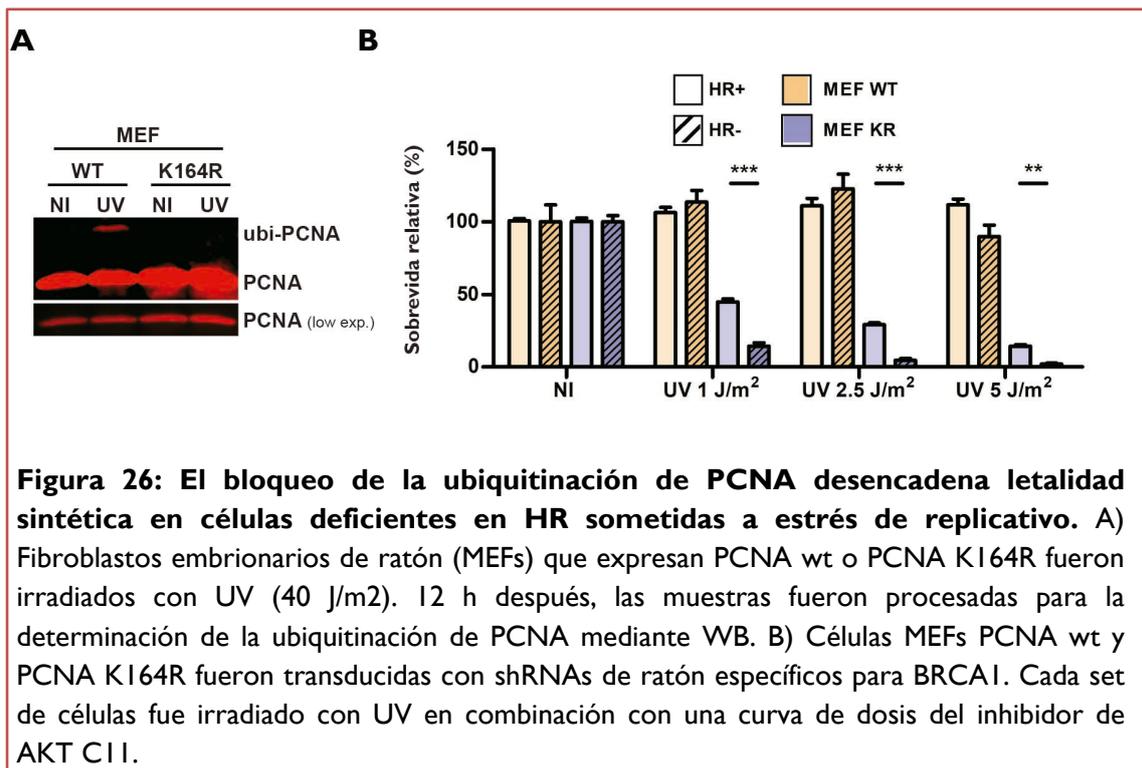


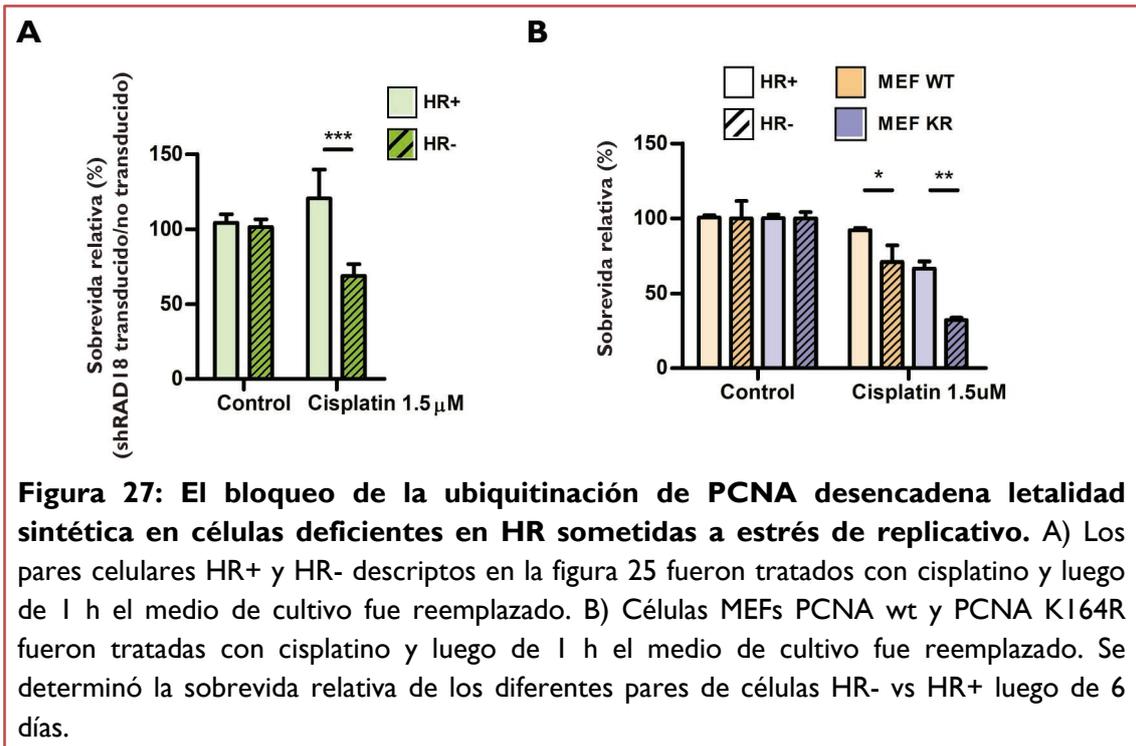
Figura 25: El bloqueo de la ubiquitinación de PCNA desencadena letalidad sintética en células deficientes en HR sometidas a estrés de replicativo. A) Células HCT116p21^{-/-} fueron transducidas con 4 shRNAs específicos para RAD18 diferentes y analizadas por WB. B) Células fueron transducidas con los shRNAs más eficientes para RAD18. Luego de 72 h, las células se irradiaron con UV y la inducción de la ubiquitinación de PCNA fue analizada por WB. C) Protocolo detallado utilizado para determinar la inducción de SL. D) Comparación entre una condición control y un tratamiento LS. E) Células HR⁺ y HR⁻ fueron transducidas con el shRNA #1. La sobrevida relativa de la población transducida fue calculada utilizando la población no irradiada como control.

Como enfoque complementario para estudiar exclusivamente el rol de ubi-PCNA en la supervivencia de células HR-deficientes sometidas a irradiación UV, se recurrió a un modelo knock-in de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), donde PCNA wild-type fue reemplazado por una versión no-ubiquitinable mediante una mutación puntual en K164R. Este modelo fue realizado en Holanda por el grupo del Dr. Jacobs y fue compartido mediante un esquema de colaboración con nuestro laboratorio.

En primer lugar se confirmó experimentalmente que las células PCNA^{K164R} no mostraban inducción de la ubiquitinación de PCNA luego de UV. Dado que en estas células de ratón no funciona el anticuerpo que detecta la forma ubiquitinada de PCNA, se utilizó tanto para la forma total de PCNA como la ubiquitinada el mismo anticuerpo, lo que requirió modificar el protocolo de WB e incrementar sustancialmente la carga de proteínas para detectar esta forma modificada de PCNA (Fig. 26A). Posteriormente, se realizaron experimentos de supervivencia en los cuales el gen BRCA1 fue silenciado por shRNAs lentivirales tanto en MEFs con PCNA^{WT} como con PCNA^{K164R}. Notablemente, se observó una fuerte inducción de LS en las células PCNA^{K164R} BRCA1-deficientes (Fig. 26B). Estos resultados confirman los hallazgos previos que indican que la disminución de ubi-PCNA conlleva a una inducción de LS en células HR-deficientes y demuestran que el bloqueo selectivo de la ubiquitinación de PCNA mediante diversos enfoques es suficiente en sí mismo para inducir LS en estos contextos.



Si bien los resultados presentados hasta aquí constituyeron una prueba de concepto sólida de una novedosa estrategia terapéutica selectiva para eliminar células HR-deficientes, una limitación obvia de estos experimentos es que, dada su baja penetrancia, la irradiación UV no puede ser utilizada como agente sensibilizador en la clínica. Es por ello que se analizó también la droga quimio-terapéutica cisplatino, la cual fue ampliamente estudiada como inductor de estrés replicativo en la clínica [96]. Además, se ha demostrado que la tolerancia al daño al ADN por cisplatino requiere la activación de TLS mediada por Polη, al igual que la irradiación UV. Sorprendentemente, se observó que la contraparte deficiente en HR tanto de las células transducidas con shRAD18 como en las células MEF PCNA^{K164R} muestra una sensibilidad incrementada a cisplatino (Fig. 27). En conjunto, estos resultados revelan el potencial de inhibir la ubiquitinación de PCNA como una estrategia terapéutica para sensibilizar células deficientes en HR a los tratamientos que inducen estrés replicativo y la activación de TLS.



CONCLUSIONES: CAPÍTULO IV

- 1- Se comprobó la inducción de letalidad sintética con diversos inhibidores de AKT en células deficientes en recombinación homóloga sometidas a irradiación UV.
- 2- Se demostró que la inhibición de la ubiquitinación de PCNA (modelo shRAD18 y MEFS KI64R) en conjunto con la deficiencia en recombinación homóloga deriva en letalidad sintética en células sometidas a irradiación UV o al tratamiento con cisplatino.
- 3- Se concluye que la inhibición de la ubiquitinación de PCNA es una estrategia terapéutica para atacar selectivamente células tumorales deficientes en recombinación homóloga sometidas a tratamientos de estrés replicativo que activan el mecanismo de síntesis por translesión.
- 4- Los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista Oncogene. Doi: 10.1038/s41388-019-0724-7. Este trabajo se realizó en co-autoría con la Dra. Alejandra Iris García, quien realizó varios de los ensayos presentes en esta tesis.

Link Open Access: <https://www.nature.com/articles/s41388-019-0724-7>

RESULTADOS

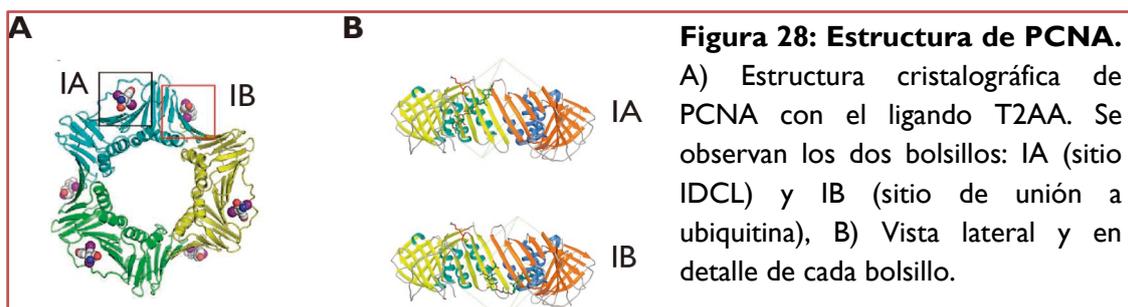
CAPÍTULO V

Estrategia de docking molecular y validación temprana para inhibidores de la mono-ubiquitinación de PCNA

Inspirados en los resultados descriptos en los capítulos previos, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Marcos Villarreal y Dr. Rodrigo Quiroga del Departamento de Química Teórica y Computacional de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. El objetivo de la colaboración fue el de desarrollar una estrategia de cribado virtual utilizando docking molecular para detectar potenciales inhibidores directos, selectivos y exclusivos de la ubiquitinación de PCNA en la lisina 164.

Como primer paso, se desarrolló un protocolo de cribado virtual utilizando la estructura cristalográfica de PCNA y su interacción con T2AA (4-{4-[(2s)-2-Amino-3-Hidroxipropil]2,6-diidodofenoxi}fenol). Esta molécula fue reportada en el año 2014 por el grupo del Dr. Fuji como un inhibidor de TLS [97]. Sin embargo, de estos estudios los autores concluyen que T2AA se une a dos bolsillos distintos de PCNA. El primer bolsillo, denominado Pocket 1A, es un bolsillo de unión de distintos ligandos a PCNA llamado loop de conexión entre dominios (IDCL en inglés), fundamental para la coordinación que lleva a cabo PCNA en la horquilla de replicación interactuando con diversas proteínas [40]. El segundo bolsillo, denominado Pocket 1B, se encuentra en la proximidad del residuo lisina 164 donde se une la ubiquitina (Fig. 28). Por este motivo, si bien T2AA puede comportarse como un inhibidor de TLS, también se comporta como un inhibidor global de proteínas que interactúan con PCNA. Por lo tanto, T2AA no cumple con la *selectividad inhibitoria de TLS* que se busca en este trabajo de tesis.

El protocolo de cribado virtual desarrollado por el grupo del Dr. Villarreal selecciona aquellas moléculas que presenten una alta afinidad por el Pocket IB (sitio de unión a ubiquitina) y baja o nula afinidad por el Pocket IA (sitio de interacción con distintos ligandos) logrando así identificar moléculas que alteren selectivamente y exclusivamente la mono-ubiquitinación de PCNA, sin afectar las funciones de PCNA esenciales durante la replicación de ADN.

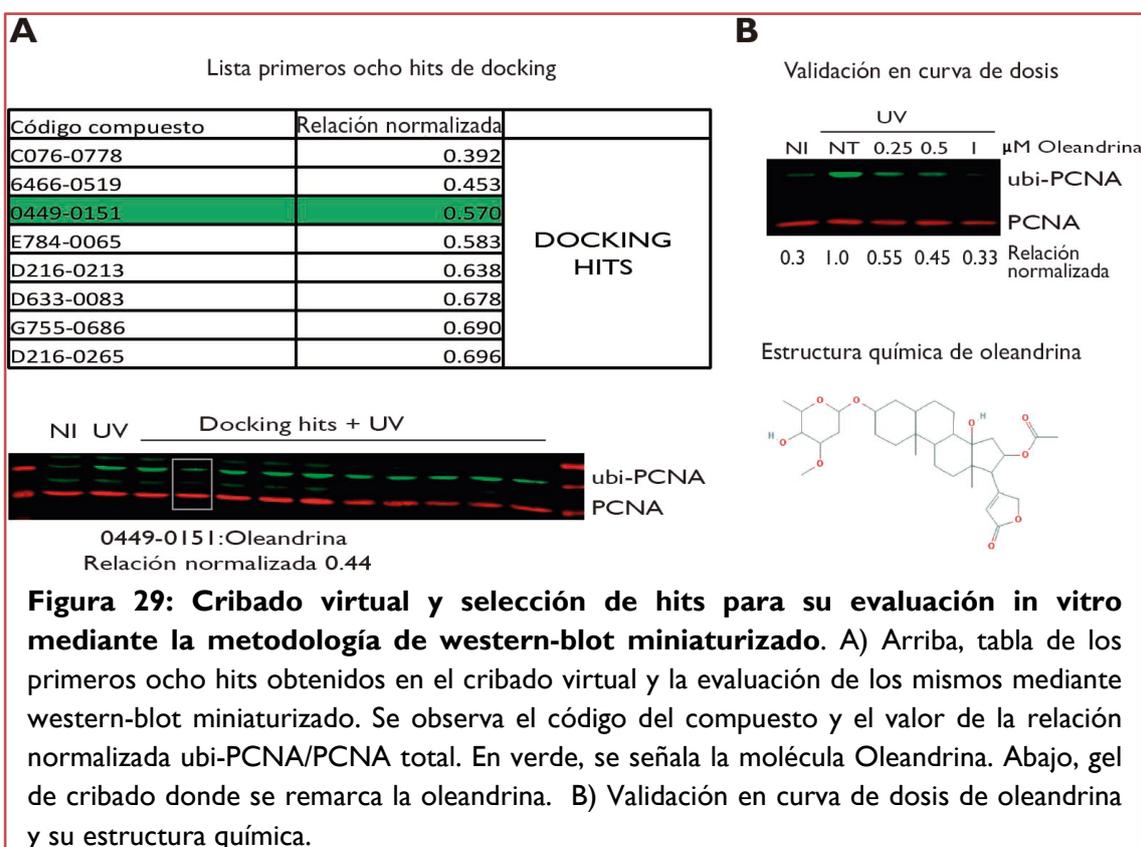


Luego del desarrollo del protocolo, se seleccionaron dos bibliotecas de compuestos químicos a utilizar en el cribado: Spectrum collection (3477 drogas) y Chemdiv 3D Bio-diversity (9807 drogas). Estas bibliotecas ya se encontraban disponibles en nuestro laboratorio y se disponía de la estructura digital de cada una de las drogas, lo cual permitía proceder rápidamente con los cribados y con la validación experimental en líneas celulares de los hits obtenidos.

Al finalizar el cribado virtual se obtuvo una lista de 160 compuestos con alta afinidad por el pocket IB, que luego fueron evaluados *in vitro* mediante la estrategia de cribado desarrollada en el capítulo I. La molécula 0449-0151 de la biblioteca Chemdiv, conocida como Oleandrina, fue el único compuesto validado exitosamente *in vitro* en curva de dosis-respuesta (Fig. 29). Notablemente, en comparación con los inhibidores identificados en el Capítulo 2 (inhibidores de AKT) que modulan la inhibición de ubi-PCNA sólo a 12 h post-irradiación UV, la Oleandrina inhibe la mono-ubiquitinación de

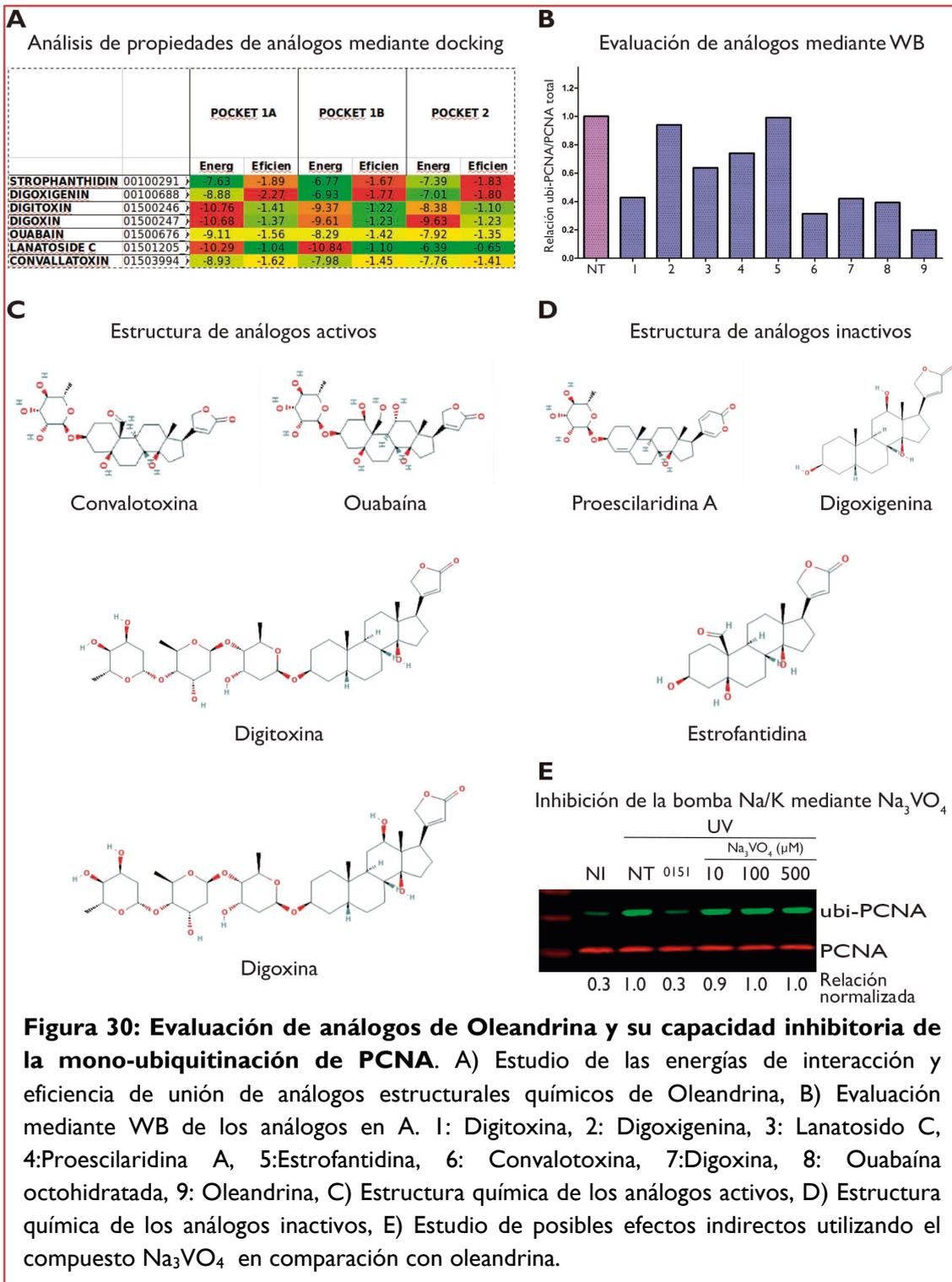
PCNA a 4h post-irradiación UV (tan pronto como es detectada en las muestras control), lo cual coincide con un mecanismo de acción de tipo directo.

La Oleandrina [16 β -acetoxi- 3 β - (2,6-dideoxi-3-O-metil-L-arabino-hexopirano siloxi)- 14-hidroxicard- 20(22)-enolido] es un producto natural aislado de las hojas de Nerium Oleander L. (Apocynaceae), que por su actividad biológica es clasificado como glicósido cardiotónico de tipo cardenólido.



Posteriormente, el grupo del Dr. Marcos Villareal y Dr. Rodrigo Quiroga analizaron diferentes análogos de esta molécula mediante el programa Vinardo de acoplamiento molecular (descrito brevemente en la introducción) y seleccionaron una lista de 7 compuestos con estructuras y afinidades similares a las de oleandrina. Estos compuestos se evaluaron mediante irradiación UV y se observó que solamente

cuatro de ellos ejercen un efecto inhibitorio de la mono-ubiquitinación de PCNA: Digoxina, Convalotoxina, Digoxina y Ouabaína octahidratado (Fig. 30).



Estos compuestos son esteroides cardiotónicos, conocidos ampliamente en la literatura, por ejercer su acción mediante la inhibición de la bomba de Na^+ , K^+ - ATPasa [98]. Con lo cual, también era necesario evaluar si este efecto en la mono-ubiquitinación de PCNA es, efectivamente, un efecto directo aún no descrito para estas moléculas, o si se trata de un efecto indirecto de la inhibición de la bomba que impacta sobre la ubiquitinación de PCNA. Si bien, esta experimentación aún se encuentra en proceso, disponemos de 2 pruebas experimentales que apuntan a que el efecto de estas moléculas sobre ubi-PCNA no está vinculado a la bomba Na^+ - K^+ . En primer lugar, es importante remarcar que sólo cuatro de los inhibidores de la bomba evaluados en células sometidas a irradiación UV efectivamente inhibieron la mono-ubiquitinación de PCNA. En segundo lugar, cuando se utilizó ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) descrito en literatura como inhibidor potente de esta bomba mediante un mecanismo diferente al de los esteroides cardiotónicos [99], se observó que incluso a altas concentraciones de Na_3VO_4 , la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA no se encontraba afectada (Fig. 30).

Conjuntamente, estos resultados indicarían que estos inhibidores estarían inhibiendo de manera directa la mono-ubiquitinación de PCNA. Quedan todavía por realizar diversos ensayos experimentales para confirmar que esta inhibición no es un efecto indirecto de la posible inhibición de la bomba de Na^+ , K^+ - ATPasa. A largo plazo, el objetivo de este trabajo es el de evaluar su potencial terapéutico en tumores que presenten deficiencias en recombinación homóloga con las metodologías empleadas en los capítulos 3 y 4. Hasta la fecha de la escritura de esta tesis, no se ha descrito que este tipo de moléculas afecten la mono-ubiquitinación de PCNA.

CONCLUSIONES: CAPÍTULO V

- 1- Se realizó un cribado virtual mediante docking molecular para identificar inhibidores directos de la ubiquitinación de PCNA. Se analizaron 13.284 compuestos y una lista de 160 hits fue evaluada mediante la plataforma de WB descrita en el capítulo I.

- 2- La molécula Oleandrina fue el único hit validado exitosamente mediante la plataforma de WB en curvas dosis-respuesta. Cuatro compuestos adicionales con estructuras similares fueron identificados como inhibidores de la ubiquitinación de PCNA.

- 3- Los resultados de este trabajo fueron presentados en el workshop internacional EMBL: DNA damage and repair in cell physiology and disease.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis doctoral se centró en el diseño y desarrollo de plataformas tecnológicas para el cribado, identificación y validación de inhibidores farmacológicos de TLS. Como ya se ha comentado brevemente en la introducción varios grupos han enfocado sus esfuerzos en identificar inhibidores de distintas polimerasas de TLS con el objetivo de evaluar su potencial terapéutico en el tratamiento de tumores. Esta tesis presenta como **primera hipótesis** que la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA podría tener un efecto biológico aún más robusto que la inhibición individual de polimerasas de TLS.

Otro punto clave fue, realizar experimentos de prueba de concepto que permitan validar la **segunda hipótesis** central de esta tesis doctoral: la inhibición de TLS podría inducir letalidad sintética en células deficientes en recombinación homóloga. Resulta fundamental señalar que esta hipótesis plantea una estrategia terapéutica innovadora y selectiva en un contexto científico y clínico actual que demanda terapias de precisión que presenten menores efectos adversos y una mayor ventana terapéutica.

A continuación se realiza una discusión en tres etapas: el desarrollo de plataformas de cribado, el rol de AKT en la modulación de la mono-ubiquitinación de PCNA y la inhibición de TLS en células HR-deficientes.

Desarrollo de plataformas de cribado

En el capítulo I de la presente tesis doctoral se describe en detalle el diseño y desarrollo de la plataforma de WB miniaturizado y la evaluación de una plataforma de

microscopía para evaluar el reclutamiento de polimerasas de TLS a los sitios de ADN dañado.

Esta etapa fue crítica para avanzar en la tesis doctoral e implicó abordar las limitaciones y los desafíos de desarrollar una plataforma de cribado dentro de un laboratorio de investigación. La plataforma debía ser económicamente accesible, no requerir un alto grado de automatización y garantizar un rendimiento y reproducibilidad adecuados.

Se probaron diversas estrategias de cribado como IC-WB, FLISA, Dot-Blot, que fueron descartadas por diversas razones (Capítulo I). Principalmente, es relevante mencionar la identificación de la modificación pos-traducciona de PCNA que fue central para esta tesis (ubi-PCNA). A la fecha, hay un solo anticuerpo disponible comercialmente por la empresa Cell Signaling Technology, lo cual limitó severamente la selección de la metodología. Como **primera conclusión** de esta sección podemos afirmar que si los anticuerpos detectan la modificación pos-traducciona (MPT) en su conformación nativa, los métodos como IC-WB ofrecen un excelente compromiso entre la sensibilidad, el rendimiento y los bajos costos necesarios para un laboratorio de investigación. Sin embargo, si los anticuerpos disponibles solamente detectan la MPT en el contexto de la proteína desnaturizada, concluimos que el WB clásico es el enfoque más robusto considerando los parámetros antes descriptos, como fue el caso de esta tesis doctoral.

Utilizar una metodología como WB para un cribado presentaba dos limitaciones que debían ser superadas para realizar el cribado: rendimiento y reproducibilidad. La técnica clásica requiere de grandes cantidades de muestra para detectar la proteína de interés (equivalente al menos a un pocillo de una placa de 24

pocillos) lo cual resulta incompatible con un cribado dónde se evalúan centenares de compuestos. Con respecto a la reproducibilidad, el WB clásico incluye numerosos pasos que son difíciles de automatizar e incrementan el error humano. Realizar un WB de hasta 24 muestras puede ser altamente reproducible pero procesar muestras mayores no es recomendable.

En el desarrollo del Capítulo I demostramos que se logró adaptar el tamaño de la muestra necesaria hasta reducirla a un único pocillo de una placa de 96 pocillos, superando la primera limitación. La adición de la enzima benzonasa al buffer de carga permitió evitar cualquier traslado de la muestra reduciendo así posibles errores humanos y disminuyendo la variabilidad inter-experimento. De esta manera, fuimos capaces de realizar la siembra de células, la adición de drogas, la irradiación UV y la lisis de las muestras en la misma placa de 96 pocillos. Esto nos permitió el cribado de 80 compuestos por placa más los controles positivos y no tratados. Además, con la incorporación de una mínima automatización (empleo de pipetas multicanales electrónicas y un pequeño brazo robótico) fue posible aumentar la reproducibilidad de la plataforma superando la segunda limitación.

Como **segunda conclusión** de esta sección, en este trabajo de tesis doctoral presentamos una serie de estrategias que podrían ser utilizadas por otros grupos de investigación interesados en realizar cribados de mediano rendimiento para moduladores de MPTs. Aún si resultase necesario realizar modificaciones adicionales para un cribado con una MPT diferente, gran parte del protocolo desarrollado en esta tesis se mantendría similar para un cribado con un plataforma de WB miniaturizado. De esta manera, este protocolo sería de gran utilidad, para grupos de investigación con financiamiento moderado o sin equipos que provean un alto grado de automatización.

Este desarrollo fue publicado como método en la revista High Throughput [100]. Cabe mencionar que éste es el primer reporte publicado de una plataforma de cribado basada en un WB-miniaturizado.

Respecto a la plataforma propuesta de microscopía para evaluar el reclutamiento de polimerasas de TLS a sitios de ADN dañado, la misma no pudo ser implementada por una limitación técnica del microscopio disponible. Sin embargo, las herramientas y el conocimiento adquirido en el desarrollo de la misma fueron fundamentales para resultados posteriores en esta tesis tales como: el programa de captura automática en imagen de campo claro (Capítulo II) y la generación de la línea celular estable U2OS GFP-H-Pol η la cual fue utilizada para evaluar el reclutamiento de esta polimerasa en concomitancia con la inhibición de AKT (Capítulo III). Esta plataforma permanece a la espera y podría ser utilizada en el recientemente adquirido High Content Analyzer del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas.

El rol de AKT en la modulación de la ubiquitinación de PCNA

La presente tesis doctoral se contextualiza en el estudio del mecanismo de tolerancia al daño del ADN: Síntesis por Translesión. Como se mencionó en la introducción, la preservación de la integridad del genoma es un proceso fundamental para la homeostasis celular como así también la regulación de la supervivencia celular presentada como el balance entre la reparación del ADN dañado y la inducción de apoptosis como respuesta a ese aumento de daño. Es por ello que numerosos mecanismos han evolucionado para lidiar con el fin de resguardar la integridad del ADN [2]. Estos mecanismos son complementarios y redundantes y se pueden dividir, a grandes rasgos, en aquellos que reparan el daño y aquellos que lo toleran.

Los mecanismos de tolerancia más estudiados son el intercambio de templados y TLS, dos mecanismos relacionados para tolerar el daño en la fase S, que comparten un rasgo en común: la ubiquitinación de PCNA como una MPT necesaria para la eficiencia de estos procesos [5]. Mientras que TLS necesita de mono ubi-PCNA, el intercambio de templados requiere poli ubi-PCNA. Sin embargo, es importante remarcar que la poli-ubiquitinación de PCNA precisa de la mono-ubiquitinación inicial de PCNA en el mismo residuo (K164) para activar este mecanismo [25, 40]. Por ello, la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA también implica la inhibición de la poli-ubiquitinación de PCNA y afecta potencialmente ambas vías de tolerancia al daño.

El presente trabajo de tesis doctoral se propuso como objetivo identificar inhibidores directos de la mono-ubiquitinación de PCNA. Los resultados de este trabajo (Capítulos II y III) revelan un nuevo rol para la quinasa de supervivencia AKT: la modulación de la ubiquitinación de PCNA. Este descubrimiento fue validado mediante la inhibición farmacológica utilizando diferentes inhibidores comerciales de AKT (MK-2206, AZD5363 y GSK690693) como así también utilizando siRNA contra AKT (Capítulo III). La participación de AKT en la modulación de la ubiquitinación de PCNA no había sido descrita anteriormente y aún resta dilucidar los agentes río abajo de AKT encargados de promover esta inhibición ubi-PCNA, ya que nuestros resultados indican que no se trataría de una fosforilación directa de AKT sobre PCNA.

Profundizando en la **primera hipótesis** planteada, se analizó si la inhibición de la ubiquitinación de PCNA a través de la inhibición de AKT modificaba los parámetros funcionales de TLS. Se comprobó, en el Capítulo III, que tanto el reclutamiento de la polimerasa GFP-H-Pol η como la procesividad de la horquilla de replicación se encontraban afectados en presencia de los inhibidores de AKT, en comparación con los controles no tratados (en presencia de irradiación UV). Como era de esperar, el

bloqueo de TLS mediante la inhibición de AKT condujo a un incremento del estrés replicativo, evidenciado por el aumento de la fosforilación de la histona H2AX, y muerte celular luego de la irradiación UV (Capítulo III). Como **primera conclusión** de esta sección podemos afirmar que, efectivamente, la inhibición de la mono-ubiquitinación de PCNA resulta en un efecto biológico robusto afectando parámetros funcionales de TLS y conduciendo a muerte celular por aumento y/o mal manejo del estrés replicativo.

Como se ha planteado en la introducción, otros grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en la inhibición selectiva de alguna de las polimerasas de TLS. Por ejemplo, Dash y col. [32] describen inhibidores de la interacción proteína-proteína (PIP) entre el dominio C-terminal de la polimerasa RevI y las regiones de interacción de RevI con otras polimerasas. Aunque este trabajo presenta una nueva estrategia para inhibir TLS, resulta importante destacar que no se presentan estudios de parámetros funcionales de TLS en modelos animales, de modo que se podría argumentar que esta inhibición podría no tener un efecto robusto en un esquema terapéutico. De hecho, este trabajo realiza un único ensayo en células MEF mostrando una sensibilidad incrementada a cisplatino en concentraciones de inhibidores de 30 a 45 μ M, lo cual también plantea inquietudes respecto a posibles efectos pleiotrópicos u “off-target”.

Con respecto a los moduladores río arriba de la activación de AKT en el contexto de estrés replicativo, hay evidencia suficiente para sugerir que la quinasa maestra de la vía de Respuesta al Daño del ADN (DDR) DNA-PKcs regula AKT a través de la fosforilación directa en la Ser 473 en respuesta al daño ionizante y a la irradiación UV [101]. Los resultados de este trabajo de tesis doctoral indican que DNA-PKcs es la quinasa de DDR que podría coordinar la activación de AKT para

promover la ubiquitinación de PCNA en respuesta a UV (Capítulo III). Considerando los resultados con el inhibidor LY294002, no es posible excluir la posibilidad de que PI3K también participe en la misma vía o en una paralela a aquella utilizada por DNA-PKcs en respuesta a estrés replicativo.

No obstante, una **segunda conclusión** importante de este trabajo de tesis doctoral es que los niveles basales de ubiquitinación de PCNA no se ven afectados por ninguna de estas quinasas, incluyendo AKT. Por lo tanto es posible que una vía de estrés replicativo involucrando DNA-PKcs y AKT sea activada para promover la ubiquitinación de PCNA y TLS cuando el daño del ADN se acumula en las células. Como ya se ha mencionado, aún resta dilucidar los participantes río debajo de esta nueva vía de AKT, responsable de promover la ubiquitinación de PCNA, y evaluar si esto ocurre directamente a través de la fosforilación de sustratos relevantes de AKT o si requiere una cascada de señalización aún más compleja.

También será importante estudiar en detalle las proteínas reguladoras de TLS como RAD18 y REVI, dado que dos líneas de evidencia sugieren que el axis AKT/REVI/RAD18 podría modular la ubiquitinación de PCNA. En primer lugar, un trabajo reciente demuestra que el aumento de los niveles de REVI estimula la ubiquitinación de PCNA luego de irradiación UV a través de la interacción directa con RAD18 [78]. Segundo, en levaduras, la mutante por delección del homólogo de AKT, Sch9, muestra niveles reducidos de REVI y bloqueo de TLS [102].

Otra posible línea de investigación surge de la investigación de un motivo de interacción presente en PCNA denominado APIM (AlkB homologue 2 PCNA-interacting motif) [103]. Muchas de las proteínas que contienen sitios APIM se encuentran involucradas en la vía de señalización PI3K/AKT, con lo cual podría resultar de una interacción directa de alguno de los agentes río abajo de AKT que presente un

sitio APIM interactuando con PCNA. Dentro de esta misma línea de evidencia, un péptido capaz de interrumpir la interacción de PCNA con proteínas que contengan el sitio APIM fue desarrollado: ATX-101 [104]. En el trabajo de Raeder y col. se ha observado que la presencia de ATX-101 afecta la colocalización de REV3L (polimerasa que participa del paso de extensión de TLS) con PCNA [105], sugiriendo una modulación del proceso de TLS a través de la interacción en el sitio APIM, lo cual también va en línea con un posible agente río abajo de AKT que module la funcionalidad de TLS a través de este sitio.

En este trabajo hemos establecido por primera vez una relación entre AKT y la vía de tolerancia al daño del ADN a través de la activación de TLS. En línea con este descubrimiento, AKT ha sido relacionada previamente con la modulación de vías de reparación al daño del ADN para promover la supervivencia celular a costa de comprometer la estabilidad genómica, lo cual puede ser considerado como una estrategia adicional de la tolerancia al daño del ADN. Un ejemplo claro de esto es la modulación del “mismatch repair” (MMR) por AKT, a través del control de la estabilidad y localización de la proteína de MMR: hPMS2 [106]. Dado que la inducción de la apoptosis por los aductos de base como O⁶MeG requieren de la activación de MMR, la atenuación de MMR por AKT promovería la supervivencia celular en este contexto, pero incrementaría las posibilidades de adquirir mutaciones. Otro ejemplo de la activación de vías propensas a error de la reparación al daño del ADN mediada por AKT es la estimulación de la vía no homologa de unión final (NHEJ), mediante la colaboración con DNA-PKcs [107]. Por ello, este trabajo proporciona evidencia de un rol emergente para AKT y DNA-PKcs en la tolerancia al daño del ADN, que será de gran importancia para comprender los mecanismos que gobiernan la elección entre la supervivencia celular y la muerte celular en respuesta al daño del ADN.

La inhibición de TLS en células HR-deficientes es una estrategia innovadora y selectiva posible de emplear contra tumores HR-deficientes

Resultados de diferentes grupos sugieren que la ubiquitinación de PCNA y los dominios de unión a ubiquitina de las polimerasas de TLS son menos críticos para la supervivencia celular en mamíferos que en levaduras. Por un lado, diferentes grupos informaron que para aumentar la sensibilidad asociada con la inhibición de la TLS en diferentes modelos celulares, se requiere una inhibición concomitante de la activación del punto de control mediante el tratamiento con cafeína, lo que demuestra que la intrincada red de DDR en mamíferos es capaz de amortiguar los efectos deletéreos de la inhibición de TLS [108]. Por el otro lado, evidencia crítica de la importancia de la ubiquitinación de PCNA fue obtenida gracias a la generación de un modelo de mamíferos de PCNA no ubiquitinable. Los modelos de células MEFs PCNA^{K164R} mostraron una sensibilidad moderada a UV comparados con las MEFs PCNA^{WT}, en particular a bajas dosis de UV [28]. Esta sensibilidad moderada a UV observada en células de mamífero comparada con los fenotipos extremos observada en levaduras, junto con el rol central de mantenimiento de PCNA en la replicación de ADN, desalentó al campo de investigación a explorar aún más el potencial terapéutico de inhibir la ubiquitinación de PCNA.

Este trabajo de tesis se enfocó en explorar la posibilidad de que algunos contextos genéticos puedan presentar una sensibilidad aumentada a la inhibición de TLS. De hecho, la **segunda hipótesis central** de este trabajo se basó en que la sensibilidad a UV asociada a la inhibición de la ubiquitinación de PCNA podría ser mucho más marcada en contextos HR-deficientes debido a los roles compensatorios y complementarios que HR juega con TLS durante el estrés replicativo. De esta manera la inhibición de TLS podría inducir letalidad sintética en células deficientes en

recombinación homóloga. Además, el hecho de que informes recientes revelaron que la deficiencia en HR es un rasgo mucho más amplio en tumores humanos que lo previamente supuesto, posiciona esta investigación en un nicho de importancia crítica para el desarrollo y descubrimiento de drogas y para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas [109].

El razonamiento de este trabajo de tesis doctoral fue que la sola inhibición de TLS sería insuficiente para activar una respuesta sustancial de LS en células deficientes en HR por lo que se debería combinar con inductores de estrés replicativo tales como UV o cisplatino. Cuando se inhibió la ubiquitinación de PCNA mediante la inhibición de AKT, el silenciamiento de RAD18 o utilizando un modelo no ubiquitinable de PCNA, se observó LS en células deficientes en BRCA1 (Capítulo IV), indicando de esta manera que la inhibición dirigida de las vías de tolerancia al daño del ADN es selectivamente tóxica cuando las células son deficientes en recombinación homóloga. Estos resultados son prometedores y presentan la posibilidad del uso farmacológico de inhibidores de TLS como sensibilizadores de drogas que atacan la replicación del ADN como cisplatino, el cual es actualmente usado en primera línea para tumores de tipo HR-deficiente. Aunque el objetivo idealizado de esta tesis doctoral era encontrar inhibidores que actúen en forma directa sobre la ubiquitinación de PCNA, la utilización de inhibidores de AKT, el silenciamiento de RAD18 o la utilización de un modelo no ubiquitinable de PCNA permitieron obtener la prueba de concepto de esta hipótesis. Como **conclusión** de esta sección podemos afirmar que efectivamente la inhibición de TLS induce letalidad sintética en células deficientes en recombinación homóloga sometidas a estrés replicativo. Por este motivo, resulta de fundamental importancia los resultados obtenidos en el Capítulo V de esta tesis doctoral, donde mediante un cribado virtual y posterior validación en células se han identificado potenciales

inhibidores directos de la mono-ubiquitinación de PCNA. Si bien aún restan ensayos experimentales para comprender en detalle su mecanismo de acción, el trabajo preliminar de esta tesis doctoral con estos compuestos resulta prometedor para el diseño de nuevas drogas.

Durante el último año de esta tesis se publicó un trabajo clave, el cual describe un compuesto capaz de inhibir la interacción de Rev1 con Pol ζ , sensibilizando tumores al tratamiento con cisplatino y prolongando la supervivencia en modelos animales [31]. Si bien este enfoque no es utilizado en tumores HR-deficientes, nuestros resultados sugieren que esta sensibilización sería aún mayor en estos tipos tumorales y proporciona una prueba de concepto clave de la posibilidad de alcanzar la inhibición de TLS *in vivo* con potencial terapéutico.

Como conclusión general, este trabajo de tesis doctoral propone una nueva estrategia terapéutica innovadora para el tratamiento de tumores HR-deficientes que propone una aproximación del tipo “First in class” para sensibilizar tumores a drogas que inducen estrés replicativo. Adicionalmente, se sugiere una nueva utilidad para los inhibidores de AKT actualmente en ensayos clínicos que podrían ser usados en combinación con inductores de estrés replicativo en cohortes de pacientes con deficiencias en HR.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivo celular

I.1 Líneas celulares utilizadas

Las líneas celulares U2OS, MDA-MB 231, MDA-MB 436 y HEK 293T fueron adquiridas de ATCC. La línea celular que expresa de manera estable DR-GFP fue amablemente cedida por M. Jasin [93]. Las líneas celulares MEFs PCNA wt y PCNAK164R fueron descritas previamente por H. Jacobs [28]. La línea HCT116 p21^{-/-} fue generosamente donada por B. Vogelstein [110]. Las líneas V-C8 fueron proporcionadas por B. Lopez [111].

Las líneas celulares fueron mantenidas en placas de plástico de 10 cm de diámetro, en una incubadora para células con temperatura controlada (37°C) y en presencia de 5% de CO₂. Las líneas celulares U2OS fueron cultivadas en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementadas con 5% de SFB (GIBCO - Internegocios). El resto de las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementadas con 10% de SFB. Todas las líneas celulares se mantuvieron en presencia de antibiótico (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina).

Las células fueron repicadas por tripsinización y sembradas nuevamente al alcanzar una confluencia del 100%. De rutina, para los experimentos, las células fueron primero lavadas con PBS, incubadas con tripsina (Cat#15400054, Thermo Fisher Scientific) a 37°C por 2 minutos y luego recolectadas en medio DMEM suplementado al 5% o 10% de SFB (de acuerdo a la línea celular). Luego las células fueron contadas mediante un contador electrónico (Countess FL – Thermo Fisher) y sembradas con

pipetas manuales o automáticas. Las líneas celulares no fueron mantenidas por más de 30 repiques.

Para congelar células, se dividió una suspensión de 1 mL de células en medio completo, proveniente de una placa de 10 cm de diámetro a una confluencia del 100%, en dos tubos y se agregó DMSO al 10% v/v a cada tubo. Los criotubos se llevaron a -80°C en un congelador adecuado y posteriormente se guardaron viales de seguridad en termos de nitrógeno líquido. Para descongelar células se transfirió el contenido del criotubo a un falcon con 10 mL de medio completo y se centrifugó a 800 g para remover el DMSO, resuspendidas en 10 mL de medio completo y sembradas en una placa de 10 cm.

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron negativas para la presencia de mycoplasma evaluadas mediante PCR múltiplex.

I.2 Irradiación de células con luz UV

Las irradiaciones con luz UV fueron realizadas utilizando tubos fluorescentes germicidas de mercurio. La luz emitida por estos tubos es monocromática de 254 nm de longitud de onda. El sistema de irradiación construido en el laboratorio emite una dosis de UV de 1 J/m² por segundo, de tal manera que si se desea una dosis de UV de 15 J/m² se debe mantener la lámpara prendida durante 15 segundos.

Para la irradiación de células primero se removió el medio por aspiración o inversión, se realizó un lavado con PBS a temperatura ambiente y se procedió a irradiarlas en ausencia de PBS, solo conteniendo una delgada capa de líquido. Inmediatamente después se agregó medio de cultivo.

Para la irradiación **local** de UV con filtros de policarbonato se procedió a remover el medio, agregar 1 ml de PBS y cuidadosamente colocar el filtro con poros de 5 μm en el pocillo. Luego se aspiró el PBS excedente y se procedió a irradiar con 120 J/m^2 . Luego de la irradiación se agregó 1 mL de medio de manera oblicua para levantar el filtro. Todos los experimentos de irradiación local se realizaron exclusivamente en placa de 24 pocillos.

I.3 Transfecciones transitorias y transducciones virales

En general las transfecciones, salvo que se indique lo contrario se realizaron con el reactivo de transfección JetPrime (Polyplus transfection). Brevemente el protocolo de transfección consiste en: siembra de células en el formato de placa deseado a una confluencia del 80%, el día posterior transfección con el ADN plasmídico en medio conteniendo SFB y sin antibiótico. 12h post-transfección el medio es renovado por medio fresco con SFB y antibiótico (100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina).

Los plásmidos parentales GFP-Pol η , GFP-Pol k , GFP-Rev1 y GFP-Pol i fueron una donación del Dr. Alan Lehmann. Las transfecciones transitorias con estos plásmidos se realizaron en una placa de 24 pocillos con 80.000 células por pocillo. Como regla general, se evaluaron al menos dos cantidades de ADN plasmídico (100ng y 500ng) a fines de elegir aquella condición más adecuada.

Para las transfecciones en la línea celular HEK293T con el fin de obtener partículas virales utilizando JetPrime se sembraron $2,5 \times 10^6$ en placa de 10cm. Se preparó el mix de ADN en una relación 5:5:1 de los siguientes plásmidos: vector de

transferencia, psPAX2 (plásmido de empaquetamiento) y, pMD2.G (plásmido de envoltura).

Las transfecciones con RNA interferente se realizaron en las concentraciones de 100 y 200nM en células sembradas a un 40% de confluencia en placa de 24 pocillos utilizando JetPrime de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron incubadas por 72h para lograr un buen silenciamiento con el RNA interferente de la proteína de interés.

I.4 Generación de línea celular estable U2OS iRFP-C1

Para la obtención de esta línea celular se realizó una transfección del plásmido iRFP-C1 (#54786 Adgene) con JetPrime. Se transfectaron 10ug de ADN en una placa de 10cm de diámetro conteniendo 1.5×10^6 células U2OS. Se cambió el medio de transfección al día siguiente y se procedió a realizar la primera ronda de *separación celular* por citometría de flujo “sorting” 48h después de la transfección.

La preparación de las células para la citometría de flujo fue la siguiente: aspiración del medio de cultivo, lavado en PBS, tripsinización y colecta de células en un falcon con 10 mL de medio de cultivo. Posteriormente se centrifugaron a 800 g por 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en medio con 1% de SFB y sin antibióticos. Luego del “sorting” las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio con 10% SFB y antibióticos (200 U/mL de penicilina y 200 µg/mL de estreptomicina), centrifugadas a 800 g por 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Luego las células fueron sembradas en medio con 10% SFB y antibióticos (200 U/mL de penicilina y 200 µg/mL de estreptomicina) de acuerdo a la cantidad de células obtenidas en el “sorting”

Para la generación de esta línea celular estable se necesitaron de tres rondas de “sorting” a fines de lograr una población estable y de expresión homogénea del plásmido.

I.5 Generación de línea celular estable U2OS GFP-RevI por dilución clonal

Para la obtención de la línea celular estable GFP-RevI se procedió a realizar una transfección transitoria en la línea celular U2OS y posterior “sorting” como fue previamente descrito para la línea celular U2OS-iRFP.

Luego de tres rondas de “sorting” se realizó una dilución clonal dónde se contaron 500 células y se sembraron en una placa de 10 cm. Se cambió el medio cada dos días y una vez que los clones alcanzaron un número de 50 células, aproximadamente, se procedió a transferirlos a placas individuales de 24 pocillos. Los clones se volvieron a analizar por microscopía una vez que llegaron a confluencia y se decidió proseguir con la amplificación de 8 de ellos individualmente (clones 1-8) y además generar un pool de clones denominado Bulk 7 (7 clones) pues presentaban características similares en la evaluación microscópica.

I.6 Generación de línea celular estable U2OS GFP-H-Polη

Clonado de linker hidrofílico en el plásmido GFP-Polη

Se realizó una linearización del plásmido GFP-Polη entre GFP y Polη mediante el empleo de la enzima de restricción XhoI. Se emplearon 30μg del plásmido GFP-Polη y se incubaron durante la noche a 37°C en buffer de digestión con 1μL de la enzima XhoI. Luego se corrió el mix de digestión en un gel de agarosa y se purificó el plásmido de linearización mediante un kit de purificación de ADN.

Dado que el plásmido fue linearizado con una única enzima de restricción generando extremos 3' sobresalientes, la defosforilación del vector es un requisito esencial para reducir la re-ligación del mismo vector. Para ello se realizó un tratamiento con la enzima CIAP (fosfatasa alcalina intestinal del ternero) al plásmido linearizado purificado.

Se preparó el inserto (GEGQGQGQGPRGYAYRS) con una enzima llamada T4PNK (T4 poli nucleótido quinasa) para fosforilar los extremos del inserto y habilitar así la ligación del inserto con el plásmido linearizado.

Posteriormente, se procedió a realizar la ligación utilizando la enzima T4 ligasa incubando el mix durante toda la noche a 4°C. Las colonias fueron chequeadas mediante el uso de las enzimas de restricción HindIII (sitio de restricción presente en el plásmido de origen) y SmaI (sitio de restricción generado con la incorporación del inserto). Se identificaron cinco colonias positivas que fueron luego secuenciadas para confirmar que el inserto se haya incorporado en el sentido correcto. Sólo una de ellas poseía el inserto en la dirección adecuada y este plásmido fue luego transformado en bacterias quimio-competentes para obtener mayores cantidades del mismo.

Cotransfección con pLKO-Puro

Se evaluaron diferentes relaciones de co-transfección entre el plásmido pLKO y GFP-H-Pol η y en base a resultados por microscopía se utilizó una relación 2:1 (GFP-H-Pol η : pLKO). Al día siguiente de la co-transfección se realizó un cambio de medio y se agregó puromicina a una concentración de 1 μ g/mL. La selección con este antibiótico se mantuvo por cuatro días.

“Sorting” celular

Se realizaron posteriormente dos rondas de “sorting” para obtener una línea celular con una expresión homogénea de GFP-H-Pol η .

2. Constructos de ADN, shARN y siARN

Los vectores lentivirales shRAD18 fueron comprados a la empresa Origene (#1: TL302132C; #2: TL302132B; #3: TL302132D; #4: TL302132A). shBRCA1 (TRCN0000010305, Sigma-Aldrich) fue clonado en un vector pLKO.1-TRC empleando los sitios de restricción EcoRI y AgeI; y el vector shSCR-pLKO.1 fue adquirido de la empresa Addgene (ID#1864). La dupla de siRNA usada (Cell Signaling Technology) fue la siguiente: siSCR (control) 6568S y siAKT 6211S.

3. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: α -ubi-PCNA (D5C7P; Cat# 13439), α -PCNA (PC-10; Cat# 2586), α -pan-Akt (Cat# 4691), α -p-Akt (Ser473; Cat# 9271), α -p-GSK3B (Ser9; Cat# 9336), α -p-PRAS40 (Thr246; Cat# 2997), α -RAD18 (Cat# 9040) y α -SMC-1 (Cat# 4802) de la empresa Cell Signaling Technology; α -BRCA1 (Ab-1) de la empresa Oncogene Research; α -PCNA (PC-10, Cat# sc-56) de SCBT; α - γ H2AX (Cat# 05-636-1) de la empresa Millipore; α -CPD (Cat# NMDND001) de la empresa Cosmo Bio; α -Tubulina (Cat# T9026) de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: α -ratón Alexa Fluor 594 de Jackson ImmunoResearch; α -ratón IRDye 680RD (Cat# P/N 925-68070) y α -conejo IRDye 800CW (Cat# P/N 925-32211) de LI-COR Biosciences. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Cat# D9542) de Sigma-Aldrich.

4. Análisis de proteínas mediante WB

4.1 Preparación de muestras

Para análisis de WB directos, las muestras fueron lisadas en buffer Laemmli comercial compuesto por glicerol 20% v/v, azul de bromofenol y SDS 4% m/v (BioRad). A este buffer se agregó el agente reductor 2-mercaptoetanol (355mM, Sigma) y benzonasa (250 U/uL, Santa Cruz, CAS 9025-65-4). No se utilizaron inhibidores de proteasas para la lisis.

Para el cribado, células en placa de 96 pocillos fueron lavadas con PBS y luego lisadas directamente en la placa con 40 µL/pocillo de buffer de carga preparado como se describe previamente. Luego de la adición del buffer de carga se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que la benzonasa actúe sobre la muestra. Para otros experimentos de WB se escaló el volumen de buffer de carga en función de la cantidad de células por pocillo, teniendo en cuenta que en un pocillo de una placa de 96 se utilizan 40 µL para una concentración de 20.000 células.

4.2 Preparación de geles de poliacrilamida

Para la plataforma de cribado los geles al 12% acrilamida:bisacrilamida (29:1) fueron preparados utilizando un dispositivo “multi-casting” para miniprotean 3 (BioRad). Primero se agregó el gel separador con pipeta de 50 mL en el dispositivo y luego se agregó con pipeta de 5 mL alcohol butílico para corregir pequeñas diferencias en la altura de los geles. Luego de 30 minutos se procedió a remover el alcohol butílico mediante inversión en bacha. Se agregó el gel concentrador con pipeta de 25 mL y se esperaron 30 minutos para su solidificación. Los geles armados fueron

transferidos a un recipiente y envueltos en papel con agua para mantener su humedad y almacenados en heladera a 4°C. Los geles fueron preparados el día previo a la electroforesis. Para otros experimentos de WB, se utilizó el dispositivo para minigel Bio-Rad para la preparación de geles.

4.3 Electroforesis y transferencia de proteínas en sistema semi-seco

Para los experimentos de cribado, las muestras fueron cargadas en los geles directamente desde la placa de 96 pocillos y corridas en cuba de electroforesis miniprotean tetra (BioRad) a 120 V por 2 h. El buffer de corrida contiene Tris 25mM, glicina 250 mM y SDS 0.1% m/v y se reutilizó hasta dos veces. Se utilizó un marcador de peso molecular en cada extremo del gel para identificar la parte a cortar del gel (Page Ruler Prestained Protein Ladder #26620, ThermoFisher). Se descartaron las porciones del gel correspondientes a proteínas por arriba 90kDa y por debajo de 15kDa. Posteriormente, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF (Roche) utilizando un sistema semisecho (BioRad). Las membranas de PVDF deben ser activadas cinco segundos en metanol, un minuto en agua milli q y luego dos minutos en el buffer de transferencia. El buffer de transferencia contiene Tris 50mM, glicina 40mM, SDS 1.3mM y metanol 20% v/v. La transferencia se realiza a 15 V durante una hora y el buffer de transferencia no se reutiliza.

Para otros experimentos de WB se realizaron mínimas modificaciones: las corridas se realizaron a 150 V por hora y media, el buffer de corrida se reutilizó hasta tres veces y se utilizó el marcador de peso molecular en un único extremo del gel.

4.4 Bloqueo de membranas e inmunodetección de proteínas

Para los experimentos de cribado, el bloqueo de la membrana fue realizado con una solución de Tris Buffered Saline (TBS), Tween 20 (T) al 0.1% y 5% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos lavados en solución TBS-T por cinco minutos cada uno y luego un último lavado con TBS por cinco minutos. Los anticuerpos primarios se utilizaron a una concentración de 1:1000 α -ubi-PCNA y 1:2000 α -PCNA y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios no fueron reusados para experimentos de cribado pero si fue posible reutilizarlos en otros experimentos de WB. Luego de la incubación se realizó el lavado de la membrana tres veces con buffer TBS-T por cinco minutos y luego cinco minutos en buffer TBS. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados a una concentración de 1:10000 e incubados durante una hora a temperatura ambiente. Estos anticuerpos fueron utilizados hasta seis veces para los experimentos de cribado. En otros experimentos de WB, se reutilizaron hasta diez veces. Posteriormente, se lavaron las membranas en el mismo esquema utilizado para lavarlas luego de la incubación de los anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos fueron preparados en TBS-Tween al 0.1%

La detección y la cuantificación fueron realizadas con el sistema Odyssey Clx (LI-COR Biosciences) a través del software Image Studio. Las imágenes fueron tomadas en intensidad automática y en alta resolución en los dos canales (700 y 800) simultáneamente.

5. Captura automática de imágenes de campo claro

Las células U2OS-iRFP fueron sembradas en una placa de 96 pocillos y la captura de imágenes se realizó mediante un microscopio Leica DMI8. Los parámetros de la captura automática son los siguientes: posición z-fija a 4130, autofocus con 15 capturas de 200 μm de diferencia entre cada una y la selección de la mejor imagen se realiza mediante contraste automático. Una placa de 96 pocillos demora diez minutos para ser analizada mediante el protocolo de esta captura automática.

6. Inmunofluorescencia y análisis de imágenes

Para la obtención de imágenes de epifluorescencia se utilizó el microscopio Leica DMI 8 equipado con una platina motorizada. Se utilizaron los objetivos de 20X y 63X y se obtuvieron las imágenes con el software LAS X (Leica Application Las). Las imágenes fueron luego cuantificadas utilizando el software Image J.

En general, las inmunofluorescencias se realizaron siguiendo el siguiente protocolo: células fueron sembradas en placa de 24 pocillos dónde se había agregado previamente un vidrio de microscopía. Al momento de realizar la inmunofluorescencia se removió el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se agregó una solución de fijación conteniendo PFA 2% v/v y sacarosa 2% v/v. Las células se incubaron a temperatura ambiente por quince minutos. Luego se realizó un lavado con PBS-Tween 0.1% y una permeabilización con PBS-Tritón al 0.1% v/v. Por último se agregó una solución conteniendo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la identificación de los núcleos. Los vidrios fueron luego montados en mowiol.

Para la inmunofluorescencia con tinción de CPD, las células fueron fijadas y permeabilizadas como se describió previamente. Previo a la inmunotinción con CPD se realizó una desnaturalización del ADN con una solución 0.1M de NaOH por 1 minuto con el fin de exponer los CPDs a la detección por el anticuerpo.

Para la detección de focos de GFP-H-Pol η , las células fueron pre-extraídas con Tritón al 0.1% durante 5 minutos en hielo y posterior fijación con una solución conteniendo PFA 2% v/v sacarosa 2% v/v. Este método permite únicamente la detección de los focos bien establecidos. Para cuantificar la intensidad de GFP total o de γ H2AX, se desarrolló un macro en Image J utilizando DAPI para la identificación y segmentación de los núcleos, donde se cuantificó la señal de interés.

7. Análisis de ciclo y muerte celular

Para los análisis de ciclo celular, las células fueron preparadas como se describió previamente [112]. Se utilizó el colorante Sytox Red (Thermo Fisher Scientific) para la tinción de células muertas según se describió previamente [92]. Las muestras teñidas fueron sometidas a FACS (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific) y la información obtenida fue analizada empleando el software FlowJo (FlowJo LLC).

8. Preparación e inmunomarcación de fibras de ADN

Las fibras de ADN fueron realizadas siguiendo un protocolo previamente descrito con algunas modificaciones [77]. Brevemente, las células fueron irradiadas con UVC (15 J/m²) y tratadas o no con C11 (0.5 μ M). Luego de 16 h, las células se trataron con un pulso de CldU (20 mM) por 10 minutos, se lavaron dos veces y se incubaron con un pulso de IdU (200 mM) por 30 minutos. Las fibras de ADN fueron

visualizadas con un microscopio confocal Zeiss Axioplan. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software Image J. Únicamente se cuantificaron fibras de dos colores para garantizar que solo se analizaron las horquillas de replicación activas, pero no las terminaciones ni los nuevos orígenes.

9. Ensayos clonogénicos

Se sembraron 750 células shSCR o shBRCA1 HCT116p21^{-/-} en placa de 96 pocillos. Las células fueron tratadas con una combinación del inhibidor de AKT (C11 0.1 μ M) e irradiación UV; luego de 6 días la fracción de supervivencia fue teñida con cristal violeta.

10. Análisis de recombinación homóloga

Se utilizó un ensayo de HR previamente generado en células U2OS que contiene un reportero de HR integrado a un sustrato DR-GFP [1] con algunas modificaciones mencionadas previamente [113].

11. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), empleando el test de Student de dos colas y el test de ANOVA según corresponda. Las barras representan la media \pm S.D. Otros cálculos fueron realizados con Microsoft Excel 2003.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moraes, M.C., J.B. Neto, and C.F. Menck, *DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 1362-88.
2. Eisen, J.A. and P.C. Hanawalt, *A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes*. Mutat Res, 1999. **435**(3): p. 171-213.
3. Giglia-Mari, G., A. Zotter, and W. Vermeulen, *DNA damage response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(1): p. a000745.
4. Chatterjee, N. and G.C. Walker, *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(5): p. 235-263.
5. Pilzecker, B., O.A. Buoninfante, and H. Jacobs, *DNA damage tolerance in stem cells, ageing, mutagenesis, disease and cancer therapy*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(14): p. 7163-7181.
6. Jena, N.R., *DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair*. J Biosci, 2012. **37**(3): p. 503-17.
7. Hu, J. and S. Adar, *The Cartography of UV-induced DNA Damage Formation and DNA Repair*. Photochem Photobiol, 2017. **93**(1): p. 199-206.
8. Cannan, W.J. and D.S. Pederson, *Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin*. J Cell Physiol, 2016. **231**(1): p. 3-14.
9. Lieber, M.R., *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 181-211.
10. Jasin, M. and R. Rothstein, *Repair of strand breaks by homologous recombination*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(11): p. a012740.
11. Clikeman, J.A., et al., *Homologous Recombinational Repair of Double-Strand Breaks in Yeast Is Enhanced by *MAT* Heterozygosity Through *yKU*-Dependent and -Independent Mechanisms*. Genetics, 2001. **157**(2): p. 579-589.
12. Jansen, J.G., et al., *Redundancy of mammalian Y family DNA polymerases in cellular responses to genomic DNA lesions induced by ultraviolet light*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(17): p. 11071-82.
13. Cortez, D., *Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity*. DNA Repair (Amst), 2015. **32**: p. 149-157.
14. Bębenek, A. and I. Ziuzia-Graczyk, *Fidelity of DNA replication-a matter of proofreading*. Curr Genet, 2018. **64**(5): p. 985-996.
15. Yang, W. and Y. Gao, *Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism*. Annu Rev Biochem, 2018. **87**: p. 239-261.
16. Powers, K.T. and M.T. Washington, *Eukaryotic translesion synthesis: Choosing the right tool for the job*. DNA Repair (Amst), 2018. **71**: p. 127-134.
17. Andersen, P.L., et al., *Sequential assembly of translesion DNA polymerases at UV-induced DNA damage sites*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(13): p. 2373-83.
18. Kannouche, P., et al., *Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 158-72.
19. Rothkamm, K., et al., *DNA damage foci: Meaning and significance*. Environ Mol Mutagen, 2015. **56**(6): p. 491-504.
20. Vaisman, A. and R. Woodgate, *Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick?* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2017. **52**(3): p. 274-303.
21. Pustovalova, Y., et al., *Interaction between the Rev1 C-Terminal Domain and the PolD3 Subunit of Pol ζ Suggests a Mechanism of Polymerase Exchange upon Rev1/Pol ζ -Dependent Translesion Synthesis*. Biochemistry, 2016. **55**(13): p. 2043-53.

22. Choi, J.Y., et al., *Translesion synthesis across abasic lesions by human B-family and Y-family DNA polymerases alpha, delta, eta, iota, kappa, and REV1*. J Mol Biol, 2010. **404**(1): p. 34-44.
23. Bienko, M., et al., *Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis*. Science, 2005. **310**(5755): p. 1821-4.
24. Guo, C., et al., *Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(23): p. 8892-900.
25. Povlsen, L.K., et al., *Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(10): p. 1089-98.
26. Niimi, A., et al., *Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16125-30.
27. Hoegge, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
28. Hendel, A., et al., *PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells*. PLoS Genet, 2011. **7**(9): p. e1002262.
29. Jansen, J.G., et al., *The BRCT domain of mammalian Rev1 is involved in regulating DNA translesion synthesis*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(1): p. 356-65.
30. Bertolin, A.P., S.F. Mansilla, and V. Gottifredi, *The identification of translesion DNA synthesis regulators: Inhibitors in the spotlight*. DNA Repair (Amst), 2015. **32**: p. 158-164.
31. Wojtaszek, J.L., et al., *A Small Molecule Targeting Mutagenic Translesion Synthesis Improves Chemotherapy*. Cell, 2019. **178**(1): p. 152-159 e11.
32. Dash, R.C., et al., *Virtual Pharmacophore Screening Identifies Small-Molecule Inhibitors of the Rev1-CT/RIR Protein-Protein Interaction*. ChemMedChem, 2019. **14**(17): p. 1610-1617.
33. Ketkar, A., et al., *Inhibition of Human DNA Polymerases Eta and Kappa by Indole-Derived Molecules Occurs through Distinct Mechanisms*. ACS Chem Biol, 2019. **14**(6): p. 1337-1351.
34. Srivastava, A.K., et al., *Enhanced expression of DNA polymerase eta contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(14): p. 4411-6.
35. Xu, X., et al., *Enhancing tumor cell response to chemotherapy through nanoparticle-mediated codelivery of siRNA and cisplatin prodrug*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(46): p. 18638-43.
36. Sanders, M.A., et al., *Novel inhibitors of Rad6 ubiquitin conjugating enzyme: design, synthesis, identification, and functional characterization*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(4): p. 373-83.
37. Kothayer, H., et al., *Synthesis and in vitro anticancer evaluation of some 4,6-diamino-1,3,5-triazine-2-carbohydrazides as Rad6 ubiquitin conjugating enzyme inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2016. **26**(8): p. 2030-4.
38. Bi, X., *Mechanism of DNA damage tolerance*. World J Biol Chem, 2015. **6**(3): p. 48-56.
39. Cejka, P., et al., *Decatenation of DNA by the S. cerevisiae Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA complex: a mechanism for disentangling chromosomes*. Mol Cell, 2012. **47**(6): p. 886-96.
40. Leung, W., et al., *Mechanisms of DNA Damage Tolerance: Post-Translational Regulation of PCNA*. Genes (Basel), 2018. **10**(1).
41. Liu, J., et al., *Rad51 paralogues Rad55-Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 245-8.

42. Vanoli, F., et al., *Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA lesions by template switch*. PLoS Genet, 2010. **6**(11): p. e1001205.
43. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis, 2002. **23**(5): p. 687-96.
44. Zhao, X., et al., *Cell cycle-dependent control of homologous recombination*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017. **49**(8): p. 655-668.
45. Lamarche, B.J., N.I. Orazio, and M.D. Weitzman, *The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance*. FEBS Lett, 2010. **584**(17): p. 3682-95.
46. Paull, T.T. and M. Gellert, *The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 969-79.
47. Hopfner, K.P., et al., *The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair*. Nature, 2002. **418**(6897): p. 562-6.
48. You, Z., et al., *ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5363-79.
49. Nowsheen, S. and Z. Lou, *Calling RNF168 to action*. Cell Stress, 2018. **2**(5): p. 113-114.
50. Liu, T. and J. Huang, *DNA End Resection: Facts and Mechanisms*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(3): p. 126-130.
51. Takeda, S., et al., *Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination*. Mol Cell, 2007. **28**(3): p. 351-2.
52. Nimonkar, A.V., et al., *Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 16906-11.
53. Hanenberg, H. and P.R. Andreassen, *PALB2 (partner and localizer of BRCA2)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2018. **22**(12): p. 484-490.
54. Ceccaldi, R., B. Rondinelli, and A.D. D'Andrea, *Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(1): p. 52-64.
55. Johnson, C.D., et al., *The acetylcholinesterase genes of C. elegans: identification of a third gene (ace-3) and mosaic mapping of a synthetic lethal phenotype*. Neuron, 1988. **1**(2): p. 165-73.
56. Simons, A., et al., *Establishment of a chemical synthetic lethality screen in cultured human cells*. Genome Res, 2001. **11**(2): p. 266-73.
57. Paddison, P.J., et al., *A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals*. Nature, 2004. **428**(6981): p. 427-31.
58. Jackson, R.A. and E.S. Chen, *Synthetic lethal approaches for assessing combinatorial efficacy of chemotherapeutic drugs*. Pharmacol Ther, 2016. **162**: p. 69-85.
59. Leung, A.W., et al., *Synthetic lethality in lung cancer and translation to clinical therapies*. Mol Cancer, 2016. **15**(1): p. 61.
60. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-21.
61. Wang, T., et al., *Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system*. Science, 2014. **343**(6166): p. 80-4.
62. Nijman, S.M., *Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells*. FEBS Lett, 2011. **585**(1): p. 1-6.
63. Ashworth, A. and C.J. Lord, *Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors?* Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. **15**(9): p. 564-576.
64. Ceccaldi, R., et al., *Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 258-62.
65. Takebe, N., et al., *Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(8): p. 445-64.

66. Zinovyev, A., et al., *Synthetic lethality between gene defects affecting a single non-essential molecular pathway with reversible steps*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(4): p. e1003016.
67. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
68. Hoxhaj, G. and B.D. Manning, *The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2019.
69. Yamaguchi, H. and H.-G. Wang, *The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change*. Oncogene, 2001. **20**(53): p. 7779-7786.
70. Jeong, S.-J., et al., *Activated AKT regulates NF- κ B activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells*. Oncogene, 2005. **24**(44): p. 6719-6728.
71. Kandoth, C., et al., *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. Nature, 2013. **502**(7471): p. 333-339.
72. Boyault, S., et al., *Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(1): p. 29-39.
73. Mohammadian Gol, T., H.P. Rodemann, and K. Dittmann, *Depletion of Akt1 and Akt2 Impairs the Repair of Radiation-Induced DNA Double Strand Breaks via Homologous Recombination*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(24).
74. Liu, J. and R. Wang, *Classification of current scoring functions*. J Chem Inf Model, 2015. **55**(3): p. 475-82.
75. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem, 2010. **31**(2): p. 455-61.
76. Quiroga, R. and M.A. Villarreal, *Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155183.
77. Mansilla, S.F., et al., *UV-triggered p21 degradation facilitates damaged-DNA replication and preserves genomic stability*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(14): p. 6942-51.
78. Wang, Z., et al., *REV1 promotes PCNA monoubiquitylation through interacting with ubiquitylated RAD18*. J Cell Sci, 2016. **129**(6): p. 1223-33.
79. Antonioli, P., et al., *Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(17): p. 3606-12.
80. Block, H., et al., *Production and comprehensive quality control of recombinant human Interleukin-1beta: a case study for a process development strategy*. Protein Expr Purif, 2008. **57**(2): p. 244-54.
81. Sale, J.E., A.R. Lehmann, and R. Woodgate, *Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(3): p. 141-52.
82. Soria, G., et al., *DNA damage induced Pol eta recruitment takes place independently of the cell cycle phase*. Cell Cycle, 2009. **8**(20): p. 3340-8.
83. Sabbioneda, S., et al., *Effect of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination and chromatin structure on the dynamic properties of the Y-family DNA polymerases*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5193-202.
84. Masuda, Y. and C. Masutani, *Spatiotemporal regulation of PCNA ubiquitination in damage tolerance pathways*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2019. **54**(5): p. 418-442.
85. Elkins, J.M., et al., *Comprehensive characterization of the Published Kinase Inhibitor Set*. Nature Biotechnology, 2016. **34**(1): p. 95-103.
86. Drewry, D.H., et al., *Progress towards a public chemogenomic set for protein kinases and a call for contributions*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0181585.

87. Nitulescu, G.M., et al., *Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review)*. *Int J Oncol*, 2016. **48**(3): p. 869-85.
88. Han, E.K., et al., *Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition*. *Oncogene*, 2007. **26**(38): p. 5655-61.
89. Wu, Y.T., et al., *mTOR complex 2 targets Akt for proteasomal degradation via phosphorylation at the hydrophobic motif*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(16): p. 14190-8.
90. Stronach, E.A., et al., *DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance*. *Neoplasia*, 2011. **13**(11): p. 1069-80.
91. Nieminuszczy, J., R.A. Schwab, and W. Niedzwiedz, *The DNA fibre technique - tracking helicases at work*. *Methods*, 2016. **108**: p. 92-8.
92. Wlodkowic, D., et al., *Chip-based dynamic real-time quantification of drug-induced cytotoxicity in human tumor cells*. *Anal Chem*, 2009. **81**(16): p. 6952-9.
93. Richardson, C., M.E. Moynahan, and M. Jasin, *Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations*. *Genes Dev*, 1998. **12**(24): p. 3831-42.
94. Carbajosa, S., et al., *Polo-like Kinase 1 Inhibition as a Therapeutic Approach to Selectively Target BRCA1-Deficient Cancer Cells by Synthetic Lethality Induction*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(13): p. 4049-4062.
95. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(1): p. 59-71.
96. Ubhi, T. and G.W. Brown, *Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment*. *Cancer Res*, 2019. **79**(8): p. 1730-1739.
97. Inoue, A., et al., *A small molecule inhibitor of monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) inhibits repair of interstrand DNA cross-link, enhances DNA double strand break, and sensitizes cancer cells to cisplatin*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(10): p. 7109-20.
98. Botelho, A.F.M., et al., *A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential*. *Toxicol*, 2019. **158**: p. 63-68.
99. Searle, B.M., et al., *Vanadate effect on the Na,K-ATPase and the Na-K pump in in vitro-grown rat vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1983. **53**(2): p. 186-91.
100. Villafañez, F., V. Gottifredi, and G. Soria, *Development and Optimization of a Miniaturized Western Blot-Based Screening Platform to Identify Regulators of Post-Translational Modifications*. *High Throughput*, 2019. **8**(2).
101. Tu, Y., et al., *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)-SIN1 association mediates ultraviolet B (UVB)-induced Akt Ser-473 phosphorylation and skin cell survival*. *Mol Cancer*, 2013. **12**(1): p. 172.
102. Madia, F., et al., *Oncogene homologue Sch9 promotes age-dependent mutations by a superoxide and Rev1/Polzeta-dependent mechanism*. *J Cell Biol*, 2009. **186**(4): p. 509-23.
103. Prestel, A., et al., *The PCNA interaction motifs revisited: thinking outside the PIP-box*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019. **76**(24): p. 4923-4943.
104. Müller, R., et al., *Targeting proliferating cell nuclear antigen and its protein interactions induces apoptosis in multiple myeloma cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e70430.
105. Raeder, S.B., et al., *APIM-Mediated REV3L(-)PCNA Interaction Important for Error Free TLS Over UV-Induced DNA Lesions in Human Cells*. *Int J Mol Sci*, 2018. **20**(1).
106. Jia, J., et al., *A novel function of protein kinase B as an inducer of the mismatch repair gene hPMS2 degradation*. *Cell Signal*, 2013. **25**(6): p. 1498-504.
107. Liu, Q., et al., *Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy*. *Neuro Oncol*, 2014. **16**(10): p. 1313-23.

108. Despras, E., et al., *ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(9): p. 1690-701.
109. Davies, H., et al., *HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures*. Nature Medicine, 2017. **23**(4): p. 517-525.
110. Bunz, F., et al., *Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 263-9.
111. Lambert, S. and B.S. Lopez, *Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms*. EMBO J, 2000. **19**(12): p. 3090-9.
112. Joray, M.B., et al., *P53 tumor suppressor is required for efficient execution of the death program following treatment with a cytotoxic limonoid obtained from Melia azedarach*. Food Chem Toxicol, 2017. **109**(Pt 2): p. 888-897.
113. Pierce, A.J., et al., *Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3237-42.