

**Estudio de la inestabilidad genómica
espontánea e inducida en mutantes
deficientes en la reparación del DNA
de *Drosophila melanogaster***

TESIS DOCTORAL
Arturo López Castel
2003



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

**Estudio de la inestabilidad genómica
espontánea e inducida en mutantes
deficientes en la reparación del DNA
de *Drosophila melanogaster***

TESIS DOCTORAL
Arturo López Castel
2003

**Estudio de la inestabilidad genómica espontánea e inducida
en mutantes deficientes en la reparación del DNA
de *Drosophila melanogaster***

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por
Arturo López Castel

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),
Octubre 2003.

Arturo López Castel

VºBº
Los Directores de la Tesis

Dra. Mª Antonia Velázquez Henar

Dr. Noel Xamena López

*A mis abuelos,
y en especial, para ti, Quim Sancho, allí donde estés.*

He comprobado durante estos años que no tengo una capacidad innata para escribir (¿mutación?, ¿variante alélica inadecuada?), pero eso no reduce mis ilusiones de llevar a cabo algún día uno de mis propósitos en esta vida: escribir un libro. Esa “cabezonería” que me caracteriza me ha ayudado a alcanzar con éxito otro de mis sueños pendientes: ser doctor en Ciencias Biológicas, y os aseguro que no ha sido nada fácil. Ahora, sentado delante de esta hoja en blanco vuelvo a certificar esta falta de fluidez para colocar con cierto sentido palabras en un papel, aunque voy a tratar de pasar la prueba con éxito.

Muchos de vosotros tenéis parte de “culpa” en que haya alcanzado esta meta, ya que entre todos, de una manera u otra, habéis conseguido que las pilas se mantuviesen cargadas para llegar al final. Sois muchos de los que me estoy acordando y que me habéis “ofrecido” infinidad de cosas: desde la oportunidad para involucrarme en el Grupo de Mutagénesis y la confianza ofrecida durante estos años para seguir haciéndolo, hasta pequeñas “joyas” que no tienen precio, y han sido muchas, como una sonrisa una mañana de lunes o una agradable conversación en las escaleras tomando un café, pasando, como no, por apoyo en momentos duros, por momentos de trabajo en común donde he aprendido cosas muy útiles o por una buena partida de squash para liberar el estrés. Sois tantos que prefiero no nombrar a nadie en estas líneas, aunque todos estáis en ellas, así evito el riesgo de olvidarme a alguien, aunque lo hago principalmente porque algunos de vosotros ni siquiera vais a poder leer estas palabras, así que aunque aquí seáis anónimos, ya sabéis que para mí todos sois nombres propios.

...agradecer a todos mis COMPAÑEROS DE TRABAJO (desde los “jefes” hasta los colaboradores de prácticas, desde aquellos que estaban en el laboratorio allá por 1995 hasta los que están ahora en el 2003) por todo el tiempo compartido, que no ha sido poco, pero en especial a tres compañeras que han estado trabajando conmigo, codo con codo y sudando a mares (y en este caso no son frases hechas), en la sala de radiactividad... para que no olvidéis esos momentos aquí dejo esta frase para que quede en la posteridad: “este es el último gel que hago”. También gracias de manera especial a otras tres compañeras que me hicieron un “huequecito” en el laboratorio y me ayudaron en mis inicios.

...a mi FAMILIA, a algunos por “animarme” al decirme que a dónde iba queriendo estudiar biología, y a todos por apoyarme todos estos años en mi trabajo, pero sobre todo fuera de él, ya sé que os lo he puesto difícil en alguna ocasión.

...a mis AMIGAS, por estar ahí y por ser cómo sois.

...a aquellos que han compartido conmigo mi afición por el deporte, sobre todo cuando la dedicación ha sido bastante seria ya que entonces habéis tenido que recibir alguna que otra reprimenda por mi parte, gracias por saber aguantarlas. Ha sido un placer compartir cancha con vosotros.

...en general a todos los que habéis compartido trocitos de mi vida estos años: compañeros de colegio, de facultad, de otros trabajos, de cursos y de distintas actividades que he realizado...

... GRACIAS A TODOS.

Quiero hacer constar, además, que parte de este trabajo se ha llevado a cabo con la aportación de una Beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (1997-2000).

"Nunca podrás descubrir nuevos océanos a menos que tengas el valor de perder de vista la orilla del río."

(Anónimo)

"Hay quienes no pueden imaginar un mundo sin pájaros; hay quienes no pueden imaginar un mundo sin agua, en lo que a mí se refiere, soy incapaz de imaginar un mundo sin libros."

(J. L. Borges)

Abreviaturas

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
(6-4)PPs	Fotoproductos de pirimidinas y pirimidonas
AP	Sitio abásico
AP-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores arbitrarios
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
BER	Reparación por escisión de bases
BLM	Bleomicina
BSF	Fracción de daño por cambios de movilidad detectado por AP-PCR
CIN	Inestabilidad cromosómica
CPDs	Ciclobutanos de pirimidina
DF	Fracción de daño total detectado por AP-PCR
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBR	Reparación de roturas de doble cadena
G₃	Tercera generación
G₆	Sexta generación
HNPCC	Cáncer colorrectal no-polipósico hereditario
HRR	Reparación por recombinación homóloga
IDLs	Bucles de inserción o de delección
mei	<i>Loci de Drosophila</i> con errores en la meiosis
MMP	Fenotipo mutador de microsatélites
MMR	Reparación de apareamientos erróneos
MSI	Inestabilidad en secuencias microsatélite
mus	<i>Loci de Drosophila</i> sensibles a mutágenos
NER	Reparación por escisión de nucleótido
nt	Nucleótidos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDF	Fracción de daño en la descendencia detectado por AP-PCR
PRR	Reparación postreplicativa o <i>bypass</i> recombinacional
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TLS	Síntesis de translesión o <i>bypass</i> replicativo
UV	Ultravioleta
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

Índice

Abreviaturas.....	I
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Inestabilidad genómica.....	3
1.1. Tipos de inestabilidad genómica.....	5
1.2. Factores genéticos implicados en la inestabilidad genómica.....	8
1.2.1. Fenotipo mutador	8
1.2.2. Reparación del DNA	9
1.2.2.1. Sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR).....	11
1.2.3. Replicación del DNA.....	15
1.2.4. Genes reguladores del ciclo celular.....	17
1.3. Inestabilidad genómica inducida.....	18
2. Detección de la inestabilidad genómica.....	18
2.1. Técnicas citogenéticas.....	19
2.2. <i>Fingerprints</i> de DNA.....	20
2.2.1. PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR).....	21
2.3. Análisis de la inestabilidad de secuencias microsatélite.....	25
3. La reparación del DNA en <i>Drosophila</i>	29
3.1. Los procesos de reparación en <i>D. melanogaster</i>	31
3.2. Mutantes deficientes en reparación del DNA estudiados en este trabajo.....	39
3.2.1. Mutante <i>mus201</i>	39
3.2.2. Mutante <i>spel1</i>	40
3.2.3. Mutante <i>mus209</i>	40

II. OBJETIVOS 43

III. ARTÍCULOS 47

Artículo 1:

López, A., Xamena, N., Marcos, R., Velázquez, A. Germ cells microsatellite instability. The effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (*spel1*). *Mutat. Res.* 514: 87-94 (2002)..... 49

Artículo 2:

López, A., Baida, A., Marcos, R., Xamena, N., Velázquez, A. Spontaneous and bleomycin-induce genomic alterations in the progeny of *Drosophila* treated males depends on the *Msh2* status. DNA fingerprinting analysis. *DNA Repair* 1: 941-954 (2002)..... 59

Artículo 3:

López, A., Xamena, N., Marcos, R., Velázquez, A.. The *Drosophila melanogaster mus209^{B1}* mutant (PCNA) impairs genomic stability. Analysis by DNA fingerprinting. *Genetics* (enviado)..... 75

IV. DISCUSIÓN 117

1. Detección de alteraciones genómicas en *Drosophila* mediante AP-PCR 119
2. Inestabilidad genómica espontánea en la línea germinal asociada a una deficiencia en *msh2* 123
3. Inestabilidad genómica inducida en la línea germinal del mutante *spel1* (*msh2*) de *D. melanogaster* 126

4. Inestabilidad genómica espontánea transmitida durante generaciones en la línea germinal asociada a una alteración en el factor de replicación PCNA.....	131
5. Inestabilidad genómica en individuos heterocigotos <i>msh2</i> ^{+/-} y <i>mus209</i> ^{+/-} : haploinsuficiencia.....	135
V. CONCLUSIONES.....	139
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	143
Anexo 1.....	177



I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Inestabilidad genómica

La estabilidad del genoma es muy importante tanto para mantener la homeóstasis celular como para garantizar la continuidad genética durante la proliferación celular y la reproducción de los organismos multicelulares. Por otro lado, la molécula de DNA tiene una estructura dinámica sujeta a cambios constantes que pueden originar alteraciones estables (mutaciones), modificando así la información genética de los organismos. Los cambios pueden surgir de forma **espontánea** durante los procesos básicos del metabolismo celular, siendo éstos debidos a errores en la reparación, replicación o recombinación y a la acción de intermediarios metabólicos con capacidad reactiva. Las alteraciones en el DNA también pueden ser **inducidas** por agentes exógenos de tipo físico, químico o biológico, presentes con frecuencia en nuestro entorno (Figura 1). Por lo tanto, el DNA en las células de un organismo está sometido a cambios continuos, ya sea por causas endógenas o exógenas.

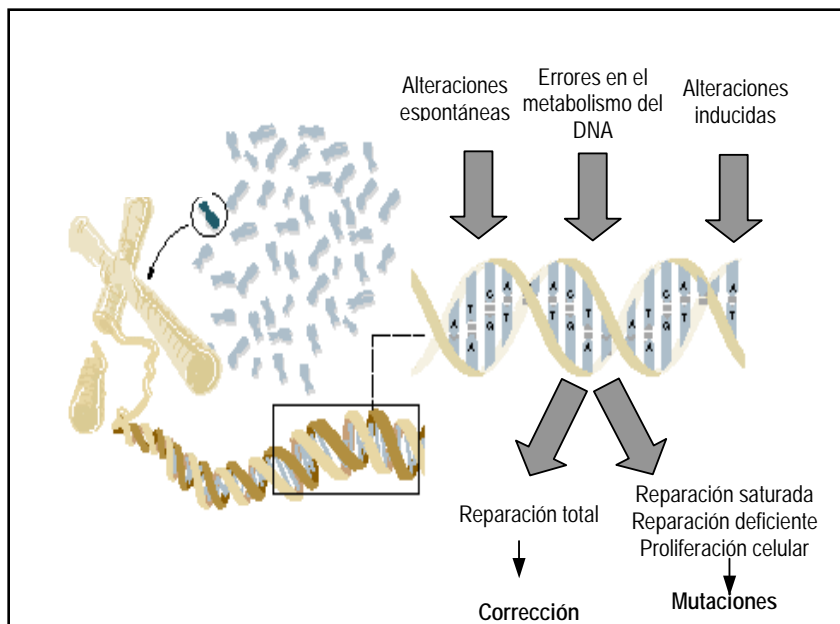


Figura 1. Factores que gobiernan la acumulación de mutaciones en el DNA.

Está demostrado que algunos de los agentes ambientales con los que estamos en contacto son mutagénicos e, incluso, algunos de ellos son también carcinogénicos en humanos (Loeb y Loeb, 2000). Sin embargo, tal como se ha llegado a determinar actualmente, una gran parte de las alteraciones que ocurren en el DNA se producen por causas endógenas: hidrólisis, metilación, especies reactivas de oxígeno, etc. Se estima que el DNA de una célula puede sufrir unas 100.000 modificaciones por día, un número de alteraciones que sería incompatible con la vida si no fuera por los mecanismos de reparación existentes que se encargan de eliminar la mayor parte de este daño (Friedberg *et al.*, 1995).

El término “reparación” del DNA engloba muchos procesos, más o menos complejos, muy conservados durante la evolución, cuya principal función consiste en permitir que la información genética se transcriba eficientemente y, lo más importante, que pueda ser replicada fielmente (Friedberg *et al.*, 1995).

La inestabilidad genómica, por definición, hace referencia a una tasa de mutación espontánea elevada en las células. En la actualidad se ha establecido que la inestabilidad genómica es una característica importante de procesos como el cáncer o el envejecimiento celular. Sin embargo, en células normales, a pesar de la gran cantidad de daño que se da en su DNA, la tasa de mutación espontánea es baja, debido a que los procesos celulares básicos como la replicación, la reparación y el control del ciclo celular funcionan correctamente. Por lo tanto, la inestabilidad genómica asociada a la presencia de una elevada tasa de alteraciones en el genoma de las células indica que se ha roto el equilibrio entre el daño espontáneo y la capacidad de reparación del mismo por la célula, debido a la **saturación de los sistemas de reparación** (producida por una tasa elevada de daño en el DNA) o a **factores genéticos** (alteraciones en genes implicados en la estabilidad del genoma, que garantizan la fidelidad de la síntesis del DNA y/o su adecuada reparación).

De aquí se deduce que en la inestabilidad genómica están involucrados errores en la replicación del DNA, deficiencias en reparación del DNA y/o alteraciones en el control de la segregación cromosómica que conllevan una tasa de mutación espontánea elevada y definen el **fenotipo mutador**, característico de algunos tipos de cáncer (Loeb, 2001). El impacto social que tienen las consecuencias fenotípicas, asociadas a las mutaciones, como el cáncer o las enfermedades genéticas hereditarias, actúa como uno de los principales

motores impulsores del estudio de los mecanismos y factores implicados en la estabilidad del genoma, para poder, así, establecer la contribución relativa de los mismos y adoptar medidas preventivas.

1.1. Tipos de inestabilidad genómica

Los estudios de inestabilidad genómica en células tumorales sugieren que existen dos tipos de inestabilidad generados a partir de vías diferentes (Figura 2), aparentemente excluyentes, y que se caracterizan por manifestar la inestabilidad a nivel cromosómico (aneuploidías, translocaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones) o a nivel del DNA (mutaciones puntuales, alteración de secuencias microsatélite).

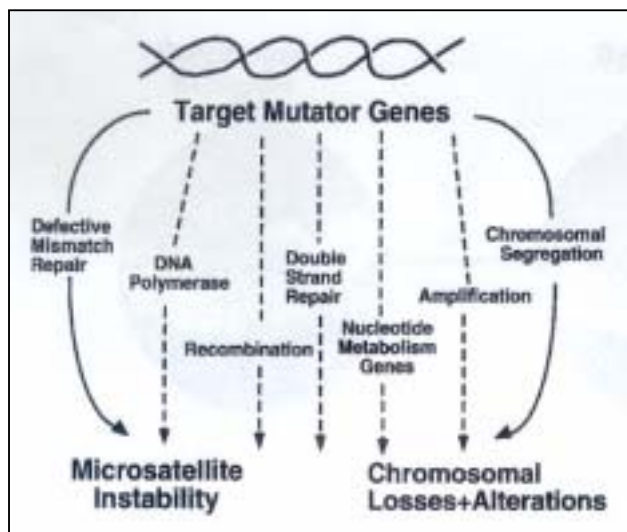


Figura 2. Diferentes vías de inestabilidad genómica: inestabilidad en secuencias microsatélite (MSI) e inestabilidad cromosómica (CIN) (de Loeb y Loeb, 2000)

La **inestabilidad cromosómica** (CIN, *Chromosomal Instability*) tendría su origen en la alteración de genes que afectan a la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Aunque todavía no se han identificado los componentes de este proceso, uno de los candidatos más atractivos es el gen *hBUB-1*, esencial en eucariotas (Basu *et al.*, 1999), con una función clara en el proceso de división celular (Taylor y McKeon, 1997). De esta

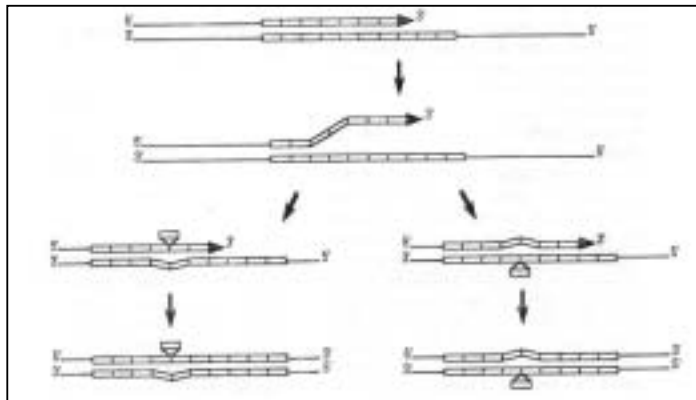
forma, alteraciones tanto en genes de este tipo (*BUB1*, *MAD3L*) como en genes supresores de tumores (*p53*, *APC*) o en oncogenes (*p21*), podrían contribuir a la frecuencia elevada de aneuploidías y aberraciones cromosómicas que caracteriza a la mayoría de los tumores (Lengauer *et al.*, 1997). Sin embargo, debido a que muchos de estos genes controlan la proliferación celular, la CIN asociada a los procesos tumorales podría ser debida a la alta tasa de división de dichas células, más que a la existencia de un proceso concreto que garantice la estabilidad cromosómica (Loeb y Loeb, 2000). Por lo tanto, actualmente, queda aún por dilucidar la secuencia de acontecimientos que tiene lugar en el fenotipo mutador caracterizado por CIN.

La **inestabilidad en secuencias microsatélite** (MSI, ***Microsatellite Instability***) se halla asociada a incrementos de la tasa de mutación puntual espontánea de 100-1000 veces (Malkhosyan *et al.*, 1996) que se detectan fácilmente a través de la elevada inestabilidad en secuencias microsatélite (Ionov *et al.*, 1993; Loeb, 1994), por lo cual, a este fenómeno se le ha denominado **fenotipo mutador de microsatélites** (MMP, ***Microsatellite Mutator Phenotype***).

El proceso de inestabilidad genómica que da lugar a la MSI es el mejor caracterizado. En condiciones normales, los microsatélites tienen una tasa de mutación espontánea más elevada que otros tipos de secuencias del genoma, con valores de 10^{-4} - 10^{-5} en levaduras (Henderson y Petes 1992), 10^{-3} - 10^{-4} en humanos (Weber y Wong, 1993), o del orden de 10^{-6} en *Drosophila* (Schug *et al.*, 1997). Actualmente se conocen los mecanismos causantes de la elevada tasa de mutación espontánea característica de los microsatélites, así como los procesos celulares que generan inestabilidad en estas secuencias. Los principales mecanismos comprenden el deslizamiento de las polimerasas de DNA durante la replicación (o *slippage*) y la recombinación.

- **Deslizamiento de las polimerasas de DNA:** durante la replicación de secuencias cortas repetidas en tándem, cuando se produce la disociación-reasociación de las cadenas, se pueden formar pequeños bucles, tal como se indica en la Figura 3. Estas estructuras, si no son reparadas, darán lugar a un aumento o disminución del número de unidades repetidas, dependiendo de si el bucle se forma en la cadena de nueva síntesis o en la parental, respectivamente (Streisinger *et al.*, 1966; Sia *et al.*, 1997).

Figura 3. Alteración de la longitud en secuencias microsatélite debido al deslizamiento de las polimerasas de DNA (modificado de Sia *et al.*, 1997).



- **Recombinación:** los procesos de recombinación y de conversión génica pueden alterar la longitud de los microsatélites. La recombinación desigual se puede producir entre cromátidas hermanas o entre cromosomas homólogos, generando expansiones y contracciones de las repeticiones (Figura 4). Sin embargo, la conversión génica implica la transferencia unidireccional de información, probablemente como respuesta al daño en el DNA (Sia *et al.*, 1997).

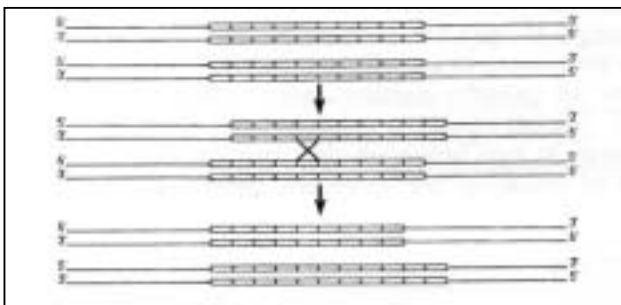


Figura 4. Alteración de la longitud en secuencias microsatélite debido a la recombinación desigual de las repeticiones (modificado de Sia *et al.*, 1997).

La mayoría de trabajos que nos permiten entender el mecanismo que genera MSI se han realizado en *Escherichia coli* o levaduras y están basados en sistemas que contienen la inserción de secuencias repetidas de DNA dentro de regiones codificantes. De esta forma, se pueden detectar fácilmente mutaciones de cambio de fase de lectura (*frameshifts*) producidas por la inserción o delección de la unidad repetida. Estos estudios sugieren que la causa más frecuente de MSI es el deslizamiento de las polimerasas de DNA (Sia *et al.*, 1997) producido por la parada y disociación de las mismas durante la replicación (Viguera

et al., 2001). Sin embargo, no se puede descartar totalmente el papel de la recombinación en algunos casos de MSI (Richard y Pâques, 2000).

1.2. Factores genéticos implicados en la inestabilidad genómica

En las células el ciclo celular procede de forma ordenada, siendo los procesos de replicación del DNA y de segregación cromosómica muy precisos. De esta forma, se garantiza que las células hijas reciban la misma información genética de la célula progenitora. Como cabe esperar, los errores en estos procesos pueden conllevar una acumulación de mutaciones que tendría graves consecuencias para el organismo, como ocurre en el caso del cáncer. Por lo tanto, la alteración de los genes implicados en dichos procesos puede ser la causa principal de la inestabilidad en el genoma.

1.2.1. Fenotipo mutador

El concepto de **fenotipo mutador** se formuló (Loeb *et al.*, 1974) con el fin de explicar la elevada tasa de mutación observada en las células de pacientes de una gran variedad de enfermedades humanas. Este concepto ha ido evolucionando de acuerdo con el conocimiento adquirido sobre dichas enfermedades, sobre todo a nivel molecular (Loeb, 1991). Como se ha indicado anteriormente, las células sufren un daño continuo que es reparado, de tal forma que existe un equilibrio entre estos dos procesos, permitiendo que la mayoría del daño sea eliminado. Cuando este equilibrio se rompe se produce la acumulación de mutaciones, generándose un fenotipo mutador que se manifiesta como CIN o MSI en las células tumorales (Loeb, 1994). Así, para explicar la inestabilidad genómica encontrada en las células tumorales se propusieron, inicialmente, dos procesos diferentes que pueden dar lugar a un fenotipo mutador:

- la **acumulación de mutaciones** (Loeb, 1974), debido a un incremento de la tasa de errores durante la replicación del DNA o durante su reparación. Aquí, están implicadas tanto las polimerasas de DNA, como las proteínas que participan en la replicación y en los distintos sistemas de reparación. De esta forma, se producen

mutaciones al azar en el genoma que, eventualmente, pueden afectar a genes implicados en la proliferación celular. El resultado final es una cascada de mutaciones que se produce durante sucesivas divisiones celulares.

- la **selección clonal** (Nowell, 1976) de células con mutaciones en genes que proporcionan una ventaja selectiva para el crecimiento.

Ambos procesos son independientes aunque pueden actuar sinérgicamente a la hora de desarrollar un fenotipo mutador (Mao *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 1997).

1.2.2. Reparación del DNA

La capacidad que tienen las células para reparar el daño producido en el DNA es fundamental tanto para la supervivencia celular como para la estabilidad del genoma durante la proliferación celular. Durante estos últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos de reparación en diferentes organismos, poniéndose de manifiesto su elevada conservación y la compleja conexión de los mismos con otros procesos celulares como la transcripción, la replicación o la recombinación.

Los organismos han desarrollado, a lo largo de la evolución, sofisticados sistemas para responder al daño ocasionado en el DNA, que abarcan la reversión directa del daño mediante la actuación de fotoliasas y alquiltransferasas; la escisión del mismo, ya sea por escisión de bases (BER, **Base Excision Repair**), por escisión de nucleótidos (NER, **Nucleotide Excision Repair**) o por reparación de apareamientos erróneos (MMR, **Mismatch Repair**); y la reparación de roturas de doble cadena (DSBR, **Double-Strand Breaks Repair**) y de entrecruzamientos. Además, existen mecanismos tolerantes de daño, como el *bypass* replicativo o el *bypass* recombinacional (revisado en Friedberg *et al.*, 1995).

En humanos, la relación entre reparación del DNA e inestabilidad genómica es cada vez más clara. Existen enfermedades genéticas humanas causadas por la alteración de genes que intervienen en distintos mecanismos de reparación y que se caracterizan por CIN, MSI y/o sensibilidad citotóxica a ciertos mutágenos.

Alteraciones en el principal sistema de reparación, NER, dan lugar a la aparición de síndromes caracterizados por la fotosensibilidad de los individuos que las padecen. Estos síndromes comprenden el *xeroderma pigmentosum* (XP), cuyos pacientes presentan un mayor riesgo de sufrir cáncer de piel, debido a que sus células no son capaces de reparar las lesiones producidas por la luz UV, sufriendo además anomalías neurológicas; el síndrome de *Cockayne* (CS, **C**ockayne **S**yndrome), caso particular de deficiencia en NER, que afecta a la reparación acoplada a la transcripción (TCR, **T**ranscription-**C**oupled **R**epair), en el que los pacientes presentan un cuadro clínico complejo con degeneración neurológica, aunque no se observa que haya una predisposición a desarrollar cáncer de piel; y la tricotiodistrofia (TTD, **T**richo**t**hio**d**ystrophy), en la que los pacientes presentan ictiosis en la piel en combinación con retraso mental y físico, relacionándose también con un defecto en TCR (revisado en Bootsma *et al.*, 1998; De Boer y Hoeijmakers, 2000).

Asimismo, existen síndromes humanos que se caracterizan por la presencia de inestabilidad cromosómica debido a: **(1)** deficiencias en complejos proteicos encargados de la protección de la integridad genómica durante la reparación, este es el caso de alteraciones en proteínas del complejo MRE11 (compuesto por MRE11, RAD50 y NBS1), que dan lugar al síndrome de Nijmegen (NBS, **N**ijmegen **B**reakage **S**yndrome) o de mutaciones en los genes *NBS1* y *MRE11*, que dan lugar a un síndrome similar a la *ataxia telangiectasia* (ATLD, **A**taxia **T**elangiectasia **L**ike **D**isorder), ambos síndromes se caracterizan por una alta incidencia de cáncer (Van der Burgt *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1999); **(2)** alteraciones en el proceso de la reparación por recombinación homóloga (HRR, **H**omologous **R**ecombination **R**epair), ya que, recientemente, se han identificado mutaciones en dos genes que codifican para helicasas implicadas en este proceso, asociadas al síndrome de Bloom (BS, **B**loom **S**yndrome) y al síndrome de Werner (WS, **W**erner **S**yndrome), ambos caracterizados por la predisposición a una amplia variedad de tipos de cáncer (Gangloff *et al.*, 2000; Franchitto y Pichierri, 2002).

Además, existen otros síndromes humanos en los que, aunque no se conoce muy bien la función celular de los genes implicados, se sabe que participan en la respuesta celular al daño en el DNA y cuya alteración genera inestabilidad cromosómica y distintas anomalías congénitas en los individuos afectados, como son la anemia de Fanconi (FA, **F**anconi **A**nemia) y la *ataxia telangiectasia* (AT, **A**taxia **T**elangiectasia) (Friedberg *et al.*, 1995). En los últimos años se ha hecho un avance considerable en el conocimiento de

los mecanismos desencadenantes de estos síndromes, estableciéndose relaciones hasta ahora desconocidas entre las distintas proteínas implicadas, así como, con otras proteínas importantes para la integridad genómica y la susceptibilidad al cáncer, como son BRCA1 o BCRA2 (García-Higuera *et al.*, 2001; Grompe y D'Andrea, 2001; Howlett *et al.*, 2002).

También están relacionados con la estabilidad del genoma los procesos implicados en la reparación postreplicativa, como la síntesis de la translesión (TLS, *Translesion Synthesis*), que permite replicar el genoma a pesar de la presencia de daño no reparado mediante la intervención de polimerasas con una función muy específica, pero con tendencia a producir mutaciones (Baynton y Fuchs, 2000).

Por último, mencionar que la deficiencia en el sistema de MMR, que trataremos a continuación, se ha asociado con la aparición de cáncer en humanos, como los relacionados con el síndrome de Cáncer Colorrectal No-Polipósico Hereditario (HNPCC, (*Hereditary Nonpolyposic Colorectal Cancer*) y algunos de tipo esporádico (Perucho, 1996; Peltomäki, 2001a), caracterizados por MSI y una elevada tasa de mutación espontánea.

1.2.2.1. Sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR)

La reparación de apareamientos erróneos o *mismatch repair* (MMR) es un mecanismo de reparación postreplicativa encargado de corregir bases mal apareadas y de eliminar pequeños bucles que se producen en el DNA durante la replicación. Este proceso de reparación sigue unos pasos muy bien definidos: reconocimiento de la alteración, escisión de la zona afectada y resíntesis. Además, como puede observarse en la Tabla 1, las proteínas implicadas en el proceso de MMR están muy conservadas evolutivamente, lo que pone de manifiesto la importancia de este tipo de reparación para mantener la integridad del genoma en todos los organismos, desde bacterias a eucariotas superiores (ver las revisiones recientes de Harfe y Jinks-Robertson, 2000; Hsieh, 2001; Marti *et al.*, 2002).

Para entender el proceso de MMR se toma como referencia el existente en *E. coli*, por tratarse de un sistema simple que consta de tres proteínas que funcionan como homodímeros: MutS, que reconoce la alteración y se une a ella; MutL, que permite la formación del complejo de reparación funcional, uniéndose tanto a MutS como a MutH; y

Tabla1. Genes implicados en reparación de apareamientos erróneos (MMR): función y homologías evolutivas

<i>E. coli</i>	Función proteica procarriótica	Levaduras	<i>Drosophila</i>	Mamíferos	Función proteica eucariótica
<i>mutS</i>	Reconocimiento del apareamiento erróneo	<i>msh1</i>	—	—	Corrección de alteraciones en mitocondrias
		<i>msh2</i>	<i>spe1</i>	<i>MSH2</i>	Forma heterodímeros con MSH3 y MSH6 para: Reparación de errores en la replicación Reparación de apareamientos erróneos en intermediarios de la recombinación Eliminación de colas no homólogas (sólo con MSH3) en reparación por SSA ^a Respuesta a daño en el DNA (en mamíferos): apoptosis
		<i>msh3</i>	—	<i>MSH3</i>	Forma heterodímeros con MSH2 (eliminación de pequeños lazos)
		<i>msh4</i>	—	<i>MSH4</i>	Forma heterodímeros con MSH5 para promover el entrecruzamiento en meiosis
		<i>msh5</i>	—	<i>MSH5</i>	Forma heterodímeros con MSH4 para promover el entrecruzamiento en meiosis
		<i>msh6</i>	<i>msh6</i>	<i>MSH6</i>	Forma heterodímeros con MSH2 (eliminación de pequeños lazos y apareamientos erróneos)
<i>mutL</i>	Posicionamiento del complejo reparativo	<i>pms1</i>	<i>pms2</i>	<i>PMS2</i>	Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparación de errores en la replicación Reparación de apareamientos erróneos en intermediarios de recombinación Inhibición de la recombinación entre secuencias no idénticas Respuesta a daño en el DNA (en mamíferos): apoptosis
		<i>mlh1</i>	<i>mlh1</i>	<i>MLH1</i>	Forma heterodímeros con PMS1/PMS2, MLH2 y MLH3
		<i>mlh2</i>	—	<i>PMS1</i>	Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparar errores en la replicación Reparar apareamientos erróneos en intermediarios de recombinación
		<i>mlh3</i>	—	<i>MLH3</i>	Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparar errores en la replicación Promover el entrecruzamiento en meiosis
		—	—	—	—
		—	—	—	—
<i>mutH</i>	Endonucleasa Discriminación de las cadenas	—	—	—	—
—	—	<i>exo1</i> <i>pol30</i>	<i>tosca</i> <i>mus209</i>	<i>EXO1</i> <i>PCNA</i>	Escisión de la lesión (actividad endonucleasa)?? Discriminación de las cadenas??

— : Homólogos no identificados. ^a SSA: Single-Strand Annealing. Tabla adaptada de Harfe y Jinks-Robertson (2000)

MutH, que tiene función endonucleasa (activada por MutL), con capacidad de discriminar la cadena a reparar mediante el reconocimiento de la señal de hemimetilación transitoria más cercana a la alteración en las secuencias GATC, al realizar una incisión en la cadena no metilada que corresponde a la cadena de nueva síntesis. Seguidamente, la helicasa II y distintas exonucleasas de cadena sencilla se encargan de la escisión de la zona alterada (Figura 5).

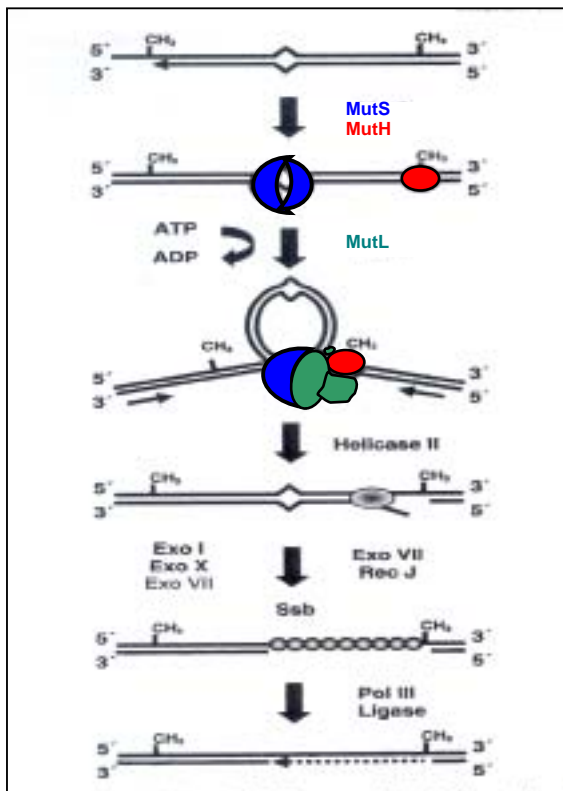


Figura 5. Sistema de MMR en *E. coli*. En azul, rojo y verde se representan las proteínas MutS, MutH y MutL, respectivamente (modificado de Marti *et al.*, 2002)

En eucariotas el sistema es más complejo, existiendo varios genes homólogos para cada uno de los genes *MutS* y *MutL* de procariontes. Las proteínas codificadas por estos genes, *MSH* (homólogos de *MutS*) y *MLH* (homólogos de *MutL*), forman heterodímeros entre sí que poseen diferentes funciones, lo que incrementa la especificidad del sistema. Como se indica en la Tabla 1, en humanos hay cinco genes homólogos *MSH* (*MSH2-6*) y cuatro *MLH* (*MLH1, MLH3, PMS1-2*). Se han identificado tres heterodímeros que desempeñan un papel esencial en la reparación de apareamientos erróneos: hMutS α (hMSH2-hMSH6), que

reconoce apareamientos erróneos y pequeños bucles, siendo el más abundante; hMutS β (hMSH2- hMSH3), que reconoce pequeños bucles en ausencia de hMSH6; y hMutL α (hMLH1-hPMS2), que estabiliza la estructura (Figura 6). También se han descrito otros dos heterodímeros: hMLH1-hMLH3, cuya función no está clara, aunque podría ser redundante al complejo hMLH1-hPMS2; y hMSH4-hMSH5 que funciona de manera específica en meiosis (Arnheim y Shibata, 2000).

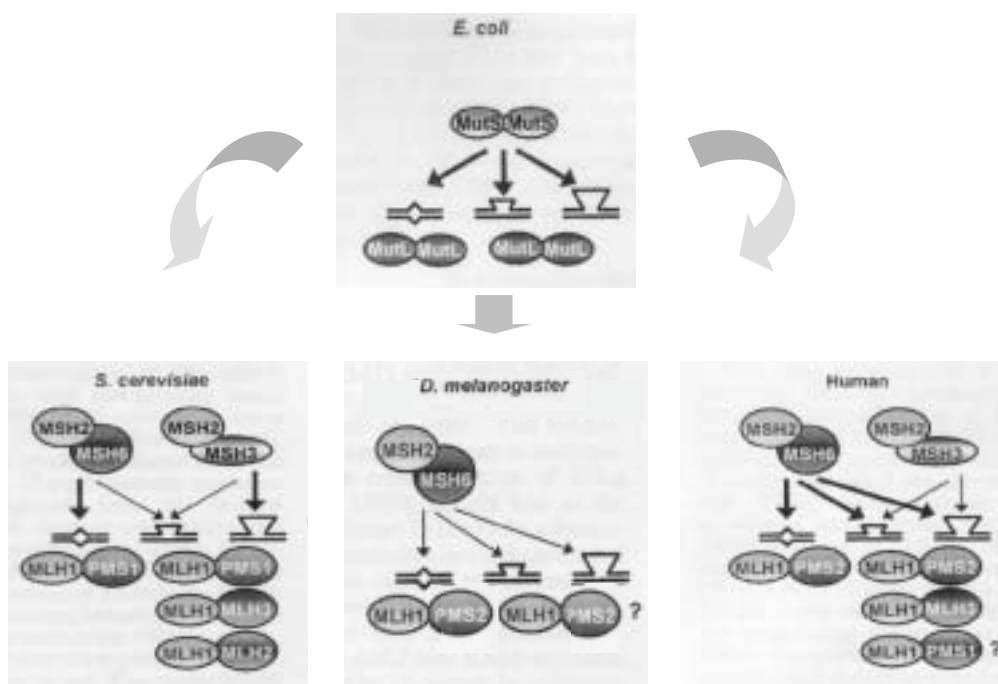


Figura 6. Sistema de MMR en eucariotas: complejos que reconocen apareamientos erróneos base-base, inserciones-delecciones pequeñas (IDLs, *Insertion-deletion loops*, +1nucleótido) e IDLs grandes (+2-8 nucleótidos). Las flechas gruesas indican la especificidad por la alteración; las flechas delgadas indican una función de redundancia (*S. cerevisiae*), una función hipotética (*D. melanogaster*) o una función de soporte (humanos) (modificado de Marti *et al.*, 2002).

No se han encontrado homólogos de la proteína MutH en eucariotas, lo cual no sorprende, puesto que no existe un mecanismo de metilación similar al de procariontes, por

lo tanto, es poco probable que el mecanismo de discriminación de la cadena a reparar esté basado en este proceso. Existen algunas evidencias que sugieren que la señal relevante podría ser la presencia de una muesca (*nick*) en la cadena recién sintetizada (Modrich, 1997), mientras que otras apuntan la posibilidad de que ciertos factores de la replicación podrían ser los responsables de la señal de discriminación debido a la asociación que existe entre este sistema de reparación y la maquinaria de replicación. Algunos estudios en levaduras indican la implicación de la proteína PCNA (**P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen) en la MMR, tanto durante la síntesis reparativa como en pasos anteriores a ésta (Umar *et al.*, 1996). Además, se ha encontrado una interacción clara entre el PCNA y distintas proteínas de MMR (Clark *et al.*, 2000; Kleczkowska *et al.*, 2001).

Estudios recientes demuestran que las proteínas del sistema de MMR también están implicadas en otros procesos celulares. Mientras que el complejo MSH4-MSH5 juega un papel importante en la meiosis (Arnheim y Shibata, 2000), las proteínas MSH2 y MSH3 intervienen en los procesos de recombinación homóloga asociados a la DSBR (Saparbaev *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 1997). Asimismo, las proteínas de MMR participan en la reparación acoplada a la transcripción (Mellon *et al.*, 1996) y en la respuesta a distintos tipos de daño en el DNA producidos por agentes químicos y físicos. Respecto a la respuesta al daño en el DNA, las células deficientes en MMR muestran tolerancia a agentes alquilantes (Branch *et al.*, 1993; Kat *et al.*, 1993; Koi *et al.*, 1994). Además, el sistema de MMR reconoce distintos tipos de daño en el DNA, como el producido por radiación (Feng *et al.*, 1991), por agentes alquilantes (Karran y Bignami, 1992) o por aminas heterocíclicas (Li *et al.*, 1996), lo cual sugiere que la MMR podría jugar un papel en la señalización de la presencia de daño en el genoma y, así, desencadenar procesos de reparación o apoptosis (Hawn *et al.*, 1995; Nehmé *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000).

1.2.3. Replicación del DNA

El grado de fidelidad de la replicación del DNA depende de las polimerasas de DNA que intervienen en el proceso y de las secuencias copiadas (Kunkel y Alexander, 1986).

Las polimerasas de DNA se encargan de la síntesis del DNA en la replicación y reparación del mismo, normalmente con tasas de error de incorporación de nucleótidos

muy bajas. Las polimerasas de DNA que llevan a cabo la replicación y algunas que intervienen en la reparación poseen actividad exonucleasa 3'-5' (*proofreading*) lo que permite corregir sus propios errores, reconociendo las bases erróneas recién incorporadas, eliminándolas e incorporando las bases correctas. Por lo tanto, alteraciones en la actividad *proofreading* de las polimerasas de DNA provocan un aumento en la tasa de mutación espontánea, generando un fenotipo mutador (Morrison *et al.*, 1993; Washington *et al.*, 1997). A este respecto, ratones con una mutación puntual que afecta al dominio 3'-5'-exonucleasa de la polimerasa de DNA δ , presentan un fenotipo mutador y un incremento en la incidencia de procesos malignos (Goldsby *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2002). Además, recientemente, se han identificado nuevas polimerasas de DNA implicadas en procesos de TLS, que serían las responsables de determinadas mutaciones y lesiones en el DNA (Woodgate, 1999). En humanos, los individuos que manifiestan la variante V de *xeroderma pigmentosum* (XP-V) presentan una mutación en el gen de la polimerasa de DNA η (Masutani *et al.*, 1999), responsable de la sensibilidad a la luz UV y de la predisposición al cáncer.

Como se ha indicado anteriormente (apartado 1.2.2.1), los errores producidos por las polimerasas de DNA durante la replicación que escapan a su actividad *proofreading* son corregidos por el sistema de MMR. De tal forma, que en las células normales, la baja tasa de mutación espontánea se debe a la acción conjunta de la actividad exonucleasa 3'-5' de las polimerasas y de la eficiencia de la MMR. Alteraciones en cada una de estas funciones se caracterizan por una tasa elevada de mutación espontánea.

La capacidad de llevar a cabo la replicación fiel del DNA por las polimerasas también depende de la secuencia. Así, durante la replicación de secuencias cortas repetidas en tándem (microsatélites) se puede producir el deslizamiento de estas secuencias (*slippage*), provocando la inserción o deleción de las unidades repetidas en la cadena recién sintetizada (Strand *et al.*, 1993). Por esta razón, las secuencias microsatélite tienen una tasa de mutación espontánea mayor que la del resto del genoma (ver apartado 1.1).

Finalmente, otros factores que intervienen en la replicación, además de las polimerasas de DNA, también juegan un papel importante en la estabilidad genómica. Así, una mutación en el gen de la ligasa I de ratón provoca errores en la replicación, generando inestabilidad e incremento en la susceptibilidad al cáncer (Harrison *et al.*, 2002). También

existen evidencias de que la proteína FEN1, que participa en la replicación de los fragmentos de Okazaki, juega un papel relevante en la estabilidad genómica (Greene *et al.*, 1999). Por último, el factor PCNA, que interacciona con muchas otras proteínas, participando en distintos procesos celulares como la replicación o la reparación, parece, asimismo, estar implicado en la estabilidad del genoma (Amin y Holm, 1996; Schweitzer y Livingston, 1999).

1.2.4. Genes reguladores del ciclo celular

Los puntos de control del ciclo celular garantizan la consecución secuencial de sucesos celulares e integran la reparación del DNA con la progresión del ciclo, de tal forma que en el caso de daño genómico elevado se puede retrasar la progresión celular, permitiendo más tiempo para la reparación del daño antes de la replicación (control G₁-S) o de la segregación del genoma (control S-G₂). Cuando la célula pierde la capacidad de controlar su ciclo celular se produce un incremento de las mutaciones génicas y cromosómicas, tanto a nivel espontáneo como inducido, debido a que se reduce la eficiencia de la reparación. Por lo tanto, las células proliferativas son muy vulnerables al daño en el DNA, constituyendo un caso extremo las células tumorales (Kaufmann y Paules, 1996).

Entre los muchos genes identificados que intervienen en el control del ciclo celular, existen algunos que están directamente implicados en la estabilidad del genoma. El gen *p53* se encuentra mutado en el 50% de los cánceres humanos (Lane, 1992; Greenblatt *et al.*, 1994) y su función principal es responder al daño en el DNA, previniendo a la célula de la acumulación de mutaciones mediante la detención del ciclo celular o la inducción de apoptosis. El gen *ATM* (**A***taxia* **T***elangiectasia* **M***utated*) juega un papel central en la regulación del ciclo celular y en la respuesta al daño en el DNA, mutaciones en este gen producen el síndrome de la *AT* que presenta una elevada predisposición al cáncer (Shiloh, 2003). Asimismo, los genes *BRAC1* y *BRAC2* están implicados en multitud de procesos, incluyendo la reparación y la recombinación del DNA, el control del ciclo celular y la transcripción, mutaciones en estos genes aumentan la susceptibilidad al cáncer de mama (Venkitaraman, 2002).

1.3. Inestabilidad genómica inducida

La investigación en el campo de la genética del cáncer ha puesto de manifiesto que la mayoría de los tumores poseen una inestabilidad genómica elevada (Lengauer *et al.*, 1997), que puede ser la causante de las múltiples mutaciones que se producen en un proceso de carcinogénesis (Loeb, 1991). Aunque, como se ha indicado anteriormente, está bien establecido que parte de esta inestabilidad está regulada genéticamente, como es el caso de la inactivación de los genes de MMR que generan tumores con MSI, factores no genéticos también pueden contribuir a dicha inestabilidad

La probabilidad de identificar un compuesto causante de inestabilidad genómica es bastante baja, ya que se necesita conocer la relación dosis-respuesta en humanos o en algún otro modelo animal. A pesar de ello, existe suficiente información que indica que la radiación ionizante induce inestabilidad genómica heredable (Dubrova *et al.*, 2000; Little, 2000; Mothersill y Seymour, 2001) y, aunque menos documentado, también se ha determinado lo mismo para algunos agentes químicos (Brennan y Schiestl, 2001). La inestabilidad genómica transgeneracional se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*; en los estudios *in vitro* se observa que el tipo de mutaciones que surge a lo largo de las generaciones difiere del tipo de mutaciones inducidas tras una irradiación directa (Little *et al.*, 1997). Además, en cultivos celulares, el incremento de la tasa de mutación inducida por la radiación persiste, al menos, durante 30 generaciones. Actualmente comienzan a emerger los primeros trabajos orientados a explicar los mecanismos de la inducción de la inestabilidad genómica heredable (Azzam *et al.*, 2001).

Podemos encontrar trabajos en la bibliografía que sugieren la interacción entre factores ambientales y deficiencias en la reparación del DNA que potencian la inestabilidad del genoma (Nehmé *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000).

2. Detección de la inestabilidad genómica

Ya hemos mencionado que la inestabilidad genómica puede manifestarse en múltiples puntos del genoma, ya sea como cambios numéricos o estructurales de los cromosomas o

como cambios puntuales que implican a una o varias bases del DNA. Por lo tanto, las técnicas más adecuadas para el análisis o detección de este tipo de inestabilidad son aquellas que están basadas en el análisis de diferentes zonas del genoma a la vez, ya que si miramos alteraciones en un solo punto específico de éste será difícil detectar tal inestabilidad. Teniendo en cuenta la naturaleza de las alteraciones que definen los dos tipos de inestabilidad genómica, CIN y MSI (definidos en el apartado 1.1), las técnicas usadas normalmente para su detección son las citogenéticas y el análisis molecular de microsatélites, respectivamente. Sin embargo, las técnicas de *fingerprinting* de DNA pueden ser una herramienta excelente en este tipo de estudios puesto que son útiles para la detección tanto de CIN como de MSI.

2.1. Técnicas citogenéticas

Las técnicas citogenéticas nos permiten la detección y estudio de la inestabilidad cromosómica (CIN), puesto que podemos observar diferentes tipos de alteraciones que abarcan aberraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías) y estructurales (inversiones, translocaciones, deleciones, duplicaciones, dicéntricos, anillos). Dichas técnicas son muy diversas y han ido evolucionando consiguiendo una mayor resolución y precisión.

Entre las técnicas citogenéticas de mayor resolución encontramos las técnicas de citogenética molecular, basadas en la hibridación de ácidos nucleicos, que permiten detectar y localizar regiones cromosómicas utilizando sondas de DNA o RNA marcadas (Gall y Pardue, 1969). Entre ellas, cabe destacar la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, ***Fluorescence In Situ Hybridization***), técnica muy sensible y versátil, que permite el uso de sondas de secuencias únicas específicas (Pinkel *et al.*, 1998). Otra de las técnicas es la hibridación genómica comparada (CGH, ***Comparative Genomic Hybridization***), que permite comparar diferentes genomas y que consiste en un marcaje diferencial con fluorocromos para poder detectar, así, diferencias cuantitativas entre genomas (amplificación génica, ganancia y/o pérdida total o parcial de cromosomas) (Kallioniemi *et al.*, 1993).

2.2. Fingerprints de DNA

El *fingerprint* del genoma es como una “huella dactilar” del DNA que permite identificarlo de forma inequívoca. Las técnicas de *fingerprinting* son muy variadas, con aplicaciones diversas que van desde la comparación de genomas relacionados, realización de mapas genéticos de ligamiento, estudios forenses y detección de alteraciones en el genoma (Caetano-Anollés, 1993). Este tipo de técnicas permite, a su vez, detectar un amplio espectro de cambios genéticos, desde alteraciones cromosómicas a mutaciones puntuales.

El desarrollo de las tecnologías para la obtención de *fingerprints* fue espectacular durante los años noventa, pasando de los métodos basados en la detección de secuencias repetidas en tándem altamente polimórficas (VNTRs, Variable Number Tandem Repeats) (Jeffreys *et al.*, 1985), en la que se utiliza la técnica de *Southern blotting* e hibridación y que, además, requiere gran cantidad de DNA, a métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), más rápidos y sencillos y que parten de pequeñas cantidades de DNA. Algunos métodos alternativos al análisis de VNTRs no requieren amplificación por PCR: análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Lenght Polymorphisms) (Botstein *et al.*, 1980), análisis con endonucleasas de restricción (REA, Restriction Endonuclease Analysis) (Schwartz y Cantor, 1984) o los fragmentos de restricción marcados en sus extremos (RFEL, Restriction Fragment End Labeling) (Steenbergen *et al.*, 1995).

Aprovechando las buenas cualidades de la PCR, las técnicas de *fingerprinting* más comunes se basan en la obtención de un *fingerprint* del genoma directamente de la reacción de PCR. Entre estas técnicas cabe destacar aquellas que amplifican secuencias del genoma al azar utilizando para ello cebadores arbitrarios, como son: PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR, Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) (Welsh y McClelland, 1990), polimorfismos de DNA amplificados al azar (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) y *fingerprinting* por amplificación de DNA (DAF, DNA Amplification Fingerprinting) (Caetano-Anollés *et al.*, 1991). Todas estas técnicas emplean estrategias de amplificación muy similares aunque difieren en algunos aspectos como son la longitud de los cebadores utilizados (6-8 nt en DAF y RAPD y, aproximadamente, 20 nt en la AP-PCR) y el método de separación y visualización de los fragmentos de DNA amplificados (geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio en

RAPD, geles de secuenciación y autorradiografía en AP-PCR y geles de secuenciación y tinción con plata en DAF), generando *fingerprints* de diferentes complejidades.

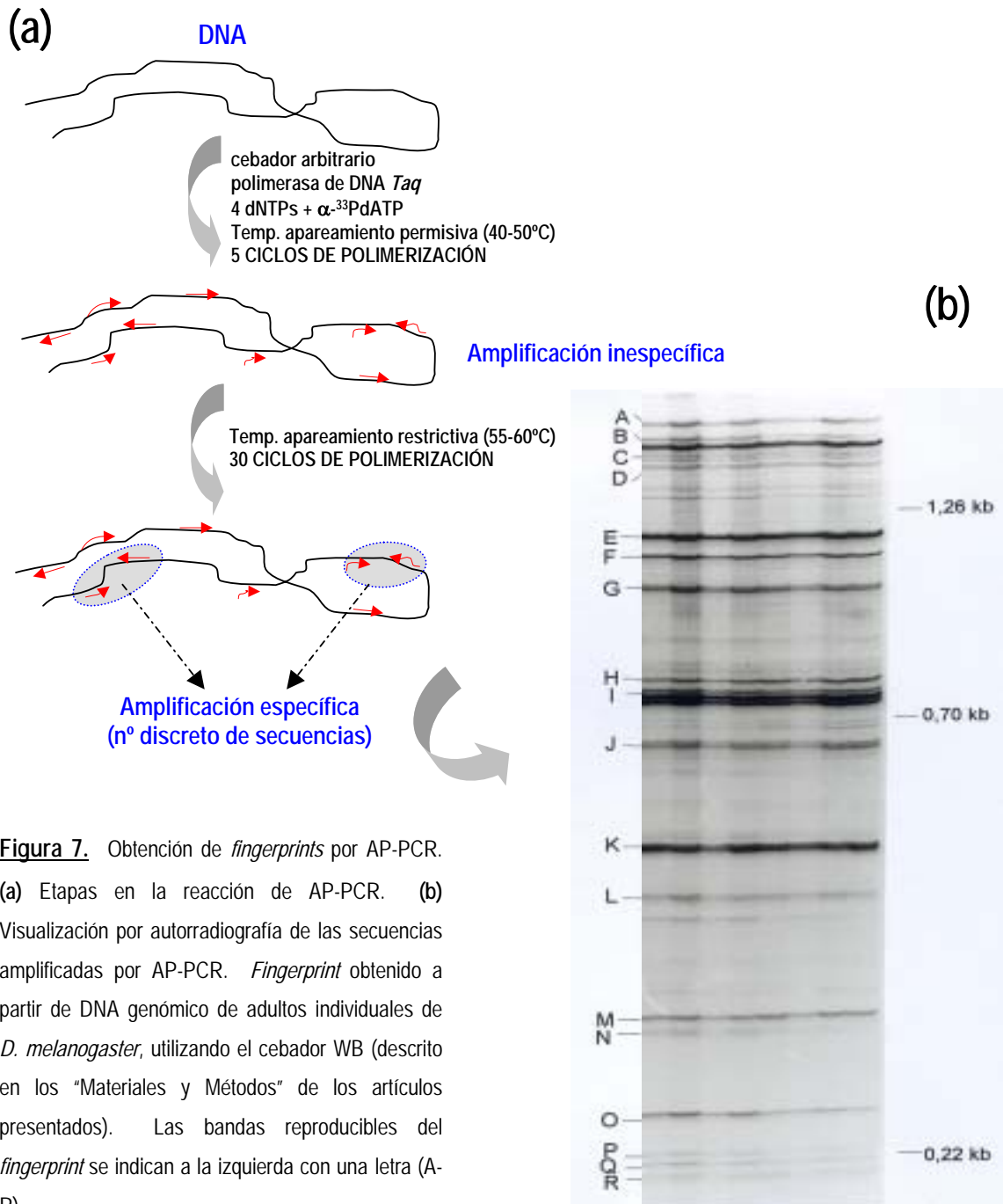
Basándose en los principios de las técnicas de AP-PCR, RAPD o DAF, se han desarrollado otras estrategias que permiten obtener diferentes variedades de *fingerprints*. Así, tenemos la inter-SSR-PCR (*Inter-Simple Sequence Repeats PCR*), que utiliza cebadores con secuencias repetidas cortas (Zietkiewicz *et al.*, 1994), la AFLP (*Amplification Fragment Length Polymorphisms*), que consiste en la amplificación de fragmentos de restricción por PCR (Vos *et al.*, 1995), la RAHM (*Random Amplified Hybridization Microsatellites*) (Cifarelli *et al.*, 1995) y la RAMPO (*Random Amplified Microsatellite Polymorphisms*) (Richardson *et al.*, 1995), que combinan la amplificación aleatoria de secuencias de DNA por PCR con la hibridación utilizando sondas de secuencias microsatélite, o la DS-PCR (*Double Stringency PCR*), que combina la amplificación aleatoria con la amplificación con cebadores de secuencias microsatélite (Matioli y De Brito, 1995).

2.2.1. PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR)

La PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR) es una técnica rápida y sencilla, que nos permite obtener *fingerprints* de DNA a partir de la amplificación por PCR de múltiples fragmentos, representativos de todo el genoma, utilizando, generalmente, un único cebador arbitrario. Esta técnica, descrita por primera vez por Welsh y McClelland (1990), se ha aplicado con éxito en estudios de taxonomía y filogenia, ya que permite detectar diferencias entre los genomas de distintas especies o variedades, así como en estudios de mapas genéticos o de detección de alteraciones genéticas (Welsh y McClelland, 1991; Peinado *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993; Micheli y Bova, 1997).

El proceso de amplificación de DNA genómico por AP-PCR consta de dos etapas (Figura 7a): **(1)** unos primeros ciclos con una temperatura baja de hibridación del cebador (condiciones poco severas), que facilita su unión inespecífica a múltiples regiones del DNA genómico y, **(2)** unos últimos ciclos de mayor severidad, en los que se incrementa la temperatura de hibridación del cebador. Tras las primeras rondas del proceso las regiones amplificadas contienen la secuencia del cebador en sus extremos, de tal forma, que los

siguientes ciclos de mayor severidad permitirán amplificar de forma específica aquellos productos que tengan una longitud adecuada. De este modo, se genera un número discreto de bandas que proporciona un *fingerprint* característico del cebador y del genoma utilizado.



Bajo las condiciones de amplificación por AP-PCR se obtienen normalmente entre 20-40 bandas reproducibles, con un rango de tamaño de las secuencias entre 200-2000 nucleótidos, detectadas mediante autorradiografía tras separarlas en un gel de secuenciación (Figura 7b), lo cual permite una alta resolución en la detección de distintos tipos de alteraciones genéticas. Además, los experimentos de AP-PCR en humanos demuestran que no existe desviación estadística en la amplificación de secuencias de los distintos cromosomas (Yasuda *et al.*, 1996; Malkhosyan *et al.*, 1998), por lo que el patrón de bandas obtenido en el *fingerprint* se puede considerar representativo de todo el genoma.

Un aspecto importante en la técnica de AP-PCR es la reproducibilidad del patrón de bandas, en la que juega un papel importante la calidad y cantidad del DNA inicial (Micheli y Bova, 1997). Por lo tanto, es necesario comprobar la reproducibilidad de los *fingerprints* de AP-PCR con los distintos cebadores, asegurándonos que el DNA no esté degradado.

La AP-PCR, evidentemente, permite analizar alteraciones en la línea germinal (Welsh *et al.*, 1995) y se ha utilizado con éxito para la detección de alteraciones heredables (Kubota *et al.*, 1992; Shimada y Shima, 1998; Vasil'eva *et al.*, 2001). Sin embargo, los estudios en la línea somática sólo pueden llevarse a cabo si las alteraciones tienen un origen clonal, como en el caso de la formación de un tumor (Peinado *et al.*, 1992), donde la técnica proporciona una interesante alternativa molecular a las técnicas citogenéticas (Yasuda *et al.*, 1996). En realidad, la técnica de AP-PCR se aplicó originariamente para la detección de alteraciones relacionadas con el cáncer, permitiendo descubrir una vía carcinogénica alternativa de inestabilidad genómica a partir de los pequeños cambios de movilidad en algunas bandas de los *fingerprints* que mostraba el tejido tumoral respecto al normal, denominada fenotipo mutador de microsatélites (Peinado *et al.*, 1992; Ionov *et al.*, 1993).

En los estudios de alteraciones en el genoma mediante AP-PCR se pueden observar dos tipos de cambios en el patrón de bandas de los *fingerprints*: cuantitativos (cambios de intensidad en las bandas) y cualitativos (cambios de movilidad, aparición y desaparición de bandas), algunos de los cuales se pueden apreciar en el *fingerprint* mostrado en la Figura 8.

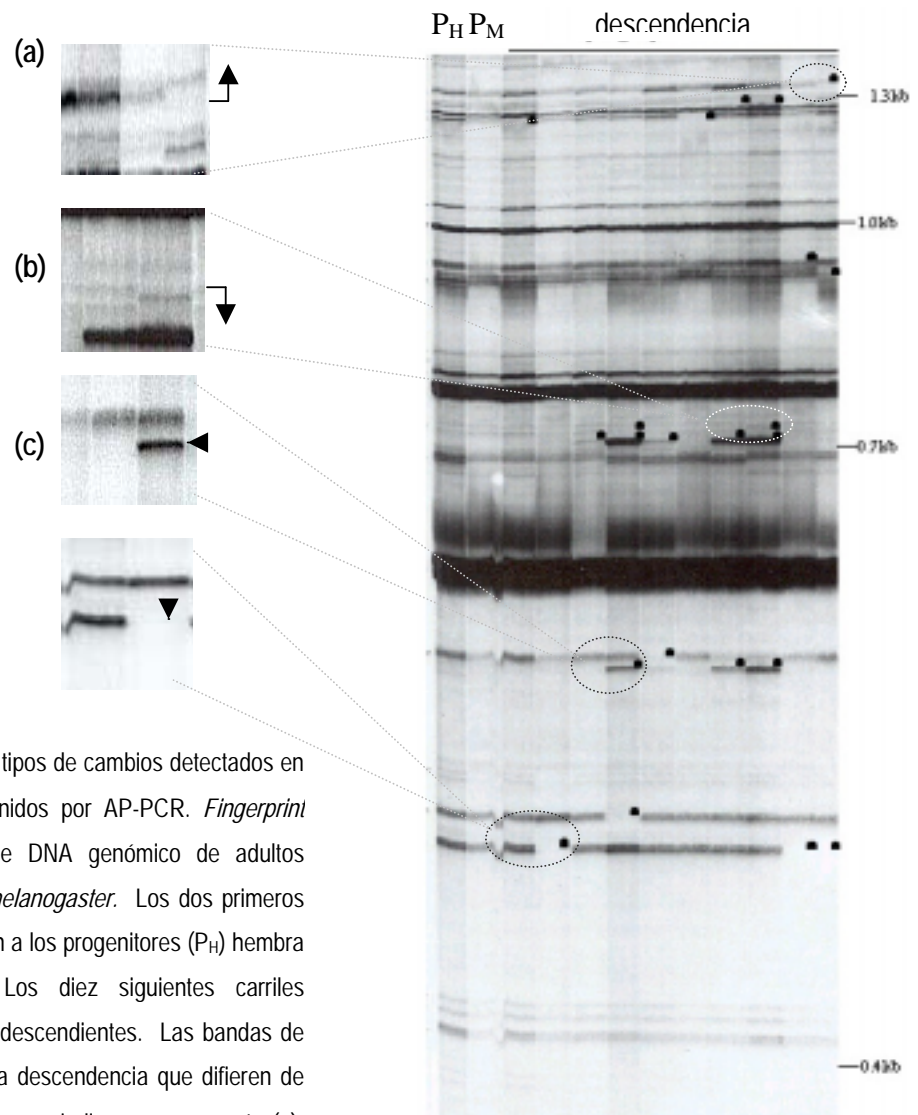


Figura 8. Distintos tipos de cambios detectados en los *fingerprints* obtenidos por AP-PCR. *Fingerprint* obtenido a partir de DNA genómico de adultos individuales de *D. melanogaster*. Los dos primeros carriles corresponden a los progenitores (P_H) hembra y (P_M) macho. Los diez siguientes carriles corresponden a sus descendientes. Las bandas de los *fingerprints* de la descendencia que difieren de las de los progenitores se indican con un punto (●). (a) y (b) cambios de movilidad, (c) banda nueva, (d) desaparición de una banda.

Los cambios en las bandas de un *fingerprint* son el reflejo de distintas alteraciones en el genoma, así, la pérdida de bandas puede deberse a pérdidas alélicas o a mutaciones en la zona de unión del cebador o en la secuencia interna que flanquea a ésta; la aparición de bandas nuevas puede tener su origen en mutaciones en la zona de unión del cebador o en reordenamientos (Peinado *et al.*, 1992; Malkhosyan *et al.*, 1998), y por último, los cambios de movilidad de las bandas se deben a pequeñas inserciones o deleciones entre dos sitios de unión del cebador, que corresponden habitualmente, a regiones microsatélite (Ionov *et al.*, 1993).

2.3. Análisis de la inestabilidad de secuencias microsatélite

Los genomas de un gran número de organismos presentan regiones de secuencias repetidas simples, las denominadas **secuencias microsatélite**. Así, un microsatélite se define como una región del DNA en la que una secuencia de 1-10 pares de bases se repite en tándem de ocho a varias decenas de veces, encontrándose repartidas aleatoriamente por todo el genoma.

Como ya se ha mencionado anteriormente, son secuencias inestables que sufren cambios con una frecuencia mucho mayor que las secuencias no repetidas. Esta inestabilidad es la causa del elevado polimorfismo que presentan, característica útil en su uso como marcadores genéticos: en la elaboración de mapas de ligamiento cromosómico, en estudios de la estructura poblacional y de divergencia, en la detección de pérdida de heterocigosidad en tumores (LOH, ***Loss of Heterozygosity***), así como en pruebas de paternidad, estudios forenses, etc. La variación de la longitud de los microsatélites que se encuentran dentro o próximos a ciertos genes puede, también, alterar su función o expresión, provocando distintas enfermedades genéticas en humanos: distrofia miotónica, corea de Huntington, síndrome del frágil-X (Redy y Housman, 1997). Por otra parte, la MSI elevada es un buen marcador a la hora de determinar riesgo de sufrir ciertos tipos de cáncer asociados a defectos en MMR.

Debido a la relación entre MSI, deficiencia en MMR y cáncer, se está poniendo mucho énfasis en el desarrollo de técnicas de análisis de microsatélites útiles para el diagnóstico de procesos cancerígenos. A este respecto, ante el gran número de publicaciones aparecidas sin un criterio de análisis preestablecido y con una posible repercusión en el diagnóstico de cáncer en diferentes poblaciones, en 1997 el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU publicó unas normas y definiciones aplicables al estudio de microsatélites en humanos, con el fin de eliminar cualquier tipo de confusión y evitar la interpretación errónea de los datos (Boland *et al*, 1998). Según estas normas, se recomienda el análisis de al menos cinco microsatélites diferentes, para evitar, así, que discrepancias sobre un solo *locus* cambien el resultado global del análisis. Asimismo, se estipuló que, en dicho panel de cinco microsatélites, la presencia de alteraciones en dos o más de ellos se consideraría como elevada inestabilidad de microsatélites (MSI-H) y la alteración en un solo microsatélite sería considerada como una inestabilidad baja (MSI-L). La MSI-H es lo que

se conoce como fenotipo mutador, directamente relacionado con el desarrollo tumoral. Posteriormente, González-García y colaboradores (2000) han propuesto un criterio de diagnóstico de MSI alternativo en el que la presencia de mutaciones en dos o más microsatélites de un panel de al menos cuatro *loci* microsatélite analizados se considera como indicador de MSI positiva.

Hasta ahora se han seguido dos procedimientos para la detección de MSI: una de ellas consiste en analizar directamente las secuencias microsatélite del genoma y la otra basada en un análisis indirecto en el que la secuencia microsatélite se introduce en un gen marcador y se utiliza la reversión o inactivación del mismo como indicador de la alteración (Figura 9).

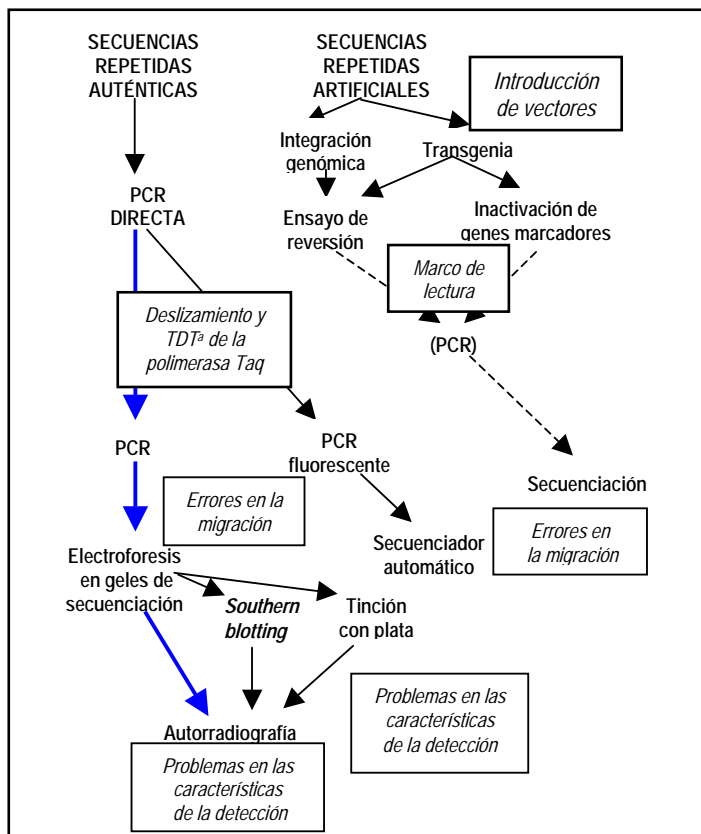


Figura 9. Procedimientos seguidos para el análisis de MSI. Detección de cambios en secuencias repetidas directamente por PCR (izquierda de la figura) y detección de la reversión o inactivación de genes marcadores que contienen secuencias repetidas artificiales (derecha de la figura). Los posibles problemas técnicos en cada caso se indican dentro de los cuadros. En azul la metodología utilizada en nuestro caso (modificado de Maehara *et al.*, 2001). ^aTDT (*T*erminal *D*eoxynucleotidy *T*ransferase Activity)

El análisis directo de la MSI por PCR presenta dos claras ventajas al análisis indirecto, por una parte permite conocer cuál es la inestabilidad en las condiciones concretas del genoma y organismo analizado, y además, permite de forma sencilla el análisis de varios microsatélites a la vez (PCR múltiple) (Figura 10).

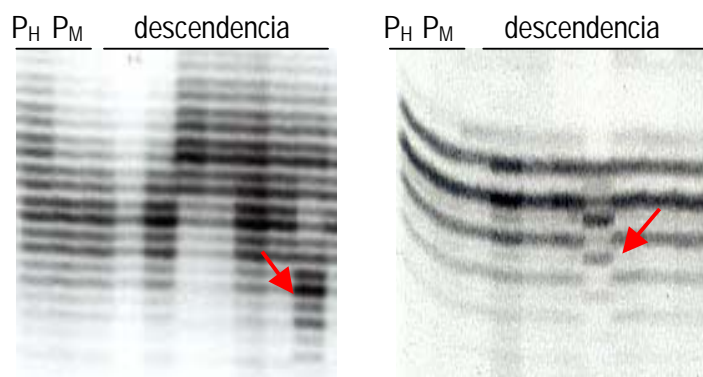


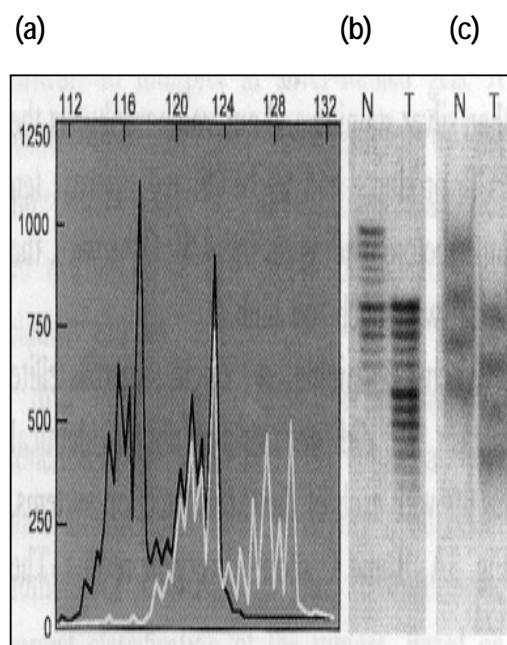
Figura 10. MSI en la línea germinal, detección por autorradiografía de dos *loci* diferentes. Los cambios en el patrón de amplificación de la descendencia se indican con una flecha.

El análisis de la MSI mediante PCR permite obtener resultados fiables y reproducibles en la mayoría de los casos. Es importante caracterizar el patrón de amplificación de cada microsatélite analizado, ya que puede variar dependiendo de la polimerasa de DNA utilizada. Por ejemplo, la polimerasa de DNA *Taq* (la más utilizada en las reacciones de PCR), añade una base adicional al final de la polimerización, lo que da lugar a pequeñas diferencias al comparar su producto amplificado con el obtenido con otras polimerasas de DNA. A ello hay que añadir que, al igual que con cualquier otra polimerasa, al sintetizar una secuencia repetida se puede producir el deslizamiento de las cadenas y la consecuente alteración del tamaño de dicha secuencia. A pesar de estos inconvenientes, la mayoría de los productos amplificados son los correctos, aunque existe, no obstante, interés en reducir lo máximo posible estos inconvenientes para mejorar la reproducibilidad de esta técnica (Ginot *et al.*, 1996; Oda *et al.*, 1997).

La detección de las secuencias microsatélite amplificadas por PCR se realiza mediante electroforesis, normalmente utilizando geles de poliacrilamida desnaturalizantes (de secuenciación), ya que los geles de agarosa no tienen la suficiente resolución para detectar cambios de tamaño debidos a la ganancia o pérdida de una o varias repeticiones de la secuencia del microsatélite. En cuanto a la visualización hay que destacar tres

métodos (Christensen *et al.*, 1999): **tinción de plata, marcaje radiactivo y fluorescencia** (Figura 11).

Figura 11. Visualización de los microsátélites con las tres metodologías utilizadas habitualmente: (a) fluorescencia en un secuenciador ABI Prism, (b) marcaje radiactivo y (c) tinción con plata (modificado de Christensen *et al.*, 1999).



Los tres métodos son efectivos y se emplean habitualmente. Sin embargo, la tinción de plata presenta una mayor dificultad en la interpretación de los patrones de bandas, aunque es más limpio, seguro y económico. Sin duda la detección más sensible es la que se lleva a cabo con fluorescencia, debido a que el análisis se realiza mediante un secuenciador automático, siempre más objetivo que un observador, aunque también mucho más caro. El marcaje radiactivo se ha mostrado igualmente sensible y la interpretación de datos concuerda con la obtenida automáticamente por el secuenciador, pero requiere unas cuidadosas medidas de seguridad. En general, aunque existen pequeñas discrepancias entre los tres métodos, el resultado global es aproximadamente el mismo (Christensen *et al.*, 1999).

3. La reparación del DNA en *Drosophila*

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es uno de los organismos eucariotas genéticamente mejor estudiados. Introducida como organismo experimental a principios del siglo XX, se ha utilizado en diferentes campos de investigación como la biología del desarrollo, la biología celular, la neurobiología, la biología de poblaciones, la ecología o la evolución, y no debe sorprender, por lo tanto, que se hayan llevado a cabo en este organismo, también, múltiples trabajos en relación con los mecanismos de reparación del DNA.

Los estudios desarrollados hasta el momento han puesto de manifiesto el alto grado de conservación de los procesos de reparación del DNA en *Drosophila* respecto a los de otros organismos eucariotas. Por ello, *D. melanogaster* puede ser considerado un organismo modelo idóneo para los estudios de mecanismos de reparación del DNA en eucariotas que sirve de excelente punto de conexión de los estudios llevados a cabo en organismos procariotas y eucariotas inferiores con los realizados en organismos eucariotas superiores.

El análisis de las funciones de reparación del DNA en *D. melanogaster* ha seguido dos tipos de aproximación: **genética**, inicialmente basada en el aislamiento de cepas mutantes sensibles a mutágenos (Smith, 1973, 1976; Boyd *et al.*, 1976, 1981, 1982; Smith *et al.*, 1980), que ha permitido la identificación de genes involucrados en la reparación del DNA, y una aproximación complementaria a **nivel bioquímico**, que ha definido los aspectos funcionales de los procesos de reparación del DNA en los mutantes identificados (Boyd *et al.*, 1980, 1983, 1987).

Como consecuencia de la aproximación genética se han descrito más de una treintena de mutantes sensibles a mutágenos, la mayoría de ellos asociados a alteraciones en los procesos de reparación del DNA tal como ha revelado su análisis bioquímico (Boyd *et al.*, 1987). Entre estos mutantes, los denominados *mus* (***mutagen-sensitive loci***) se obtuvieron por mutagénesis química y una posterior selección de individuos sensibles a mutágenos (Smith *et al.*, 1980; Boyd *et al.*, 1983), y los *mei* (***meiotic loci***) se aislaron a partir de mutantes que presentaban deficiencias en el proceso de la meiosis (Baker y Carpenter, 1972; Baker *et al.*, 1976). En la mayoría de casos, la sensibilidad a mutágenos de los

mutantes *mus* viene dada por la deficiencia en algún mecanismo de reparación, sin embargo, sólo una pequeña parte de los mutantes *mei* están implicados en la reparación del DNA. Se ha comprobado, además, que la mayoría de estos mutantes presentan alteradas otras funciones celulares básicas como la replicación o el control del ciclo celular, lo que pone de manifiesto el papel relevante que poseen algunas proteínas interviniendo en distintos procesos del metabolismo del DNA. Esto hace que algunos de los mutantes *mus* o *mei* presenten un fenotipo complejo, caracterizado por disfunciones meióticas, inestabilidad cromosómica o defectos en la proliferación celular; siendo este el caso de los mutantes *mus101*, *mus209* o *mei41*, entre otros.

Los diferentes *loci mus* y *mei* se distribuyen de manera heterogénea en los distintos cromosomas de *D. melanogaster*. Nueve de ellos se hallan en el cromosoma X (*mus101*, *mus102*, *mus105*, *mus106*, *mus108*, *mus109*, *mus111*, *mei9* y *mei41*), once en el II (*mus201-mus211*) y otros once en el III (*mus301*, *mus302* y *mus304-mus312*) (Boyd *et al.*, 1987). Hay que tener en cuenta, además, otros mutantes aislados posteriormente no englobados en los conocidos *loci mus* y *mei*, como *DmRAD54* (Kooistra *et al.*, 1997) o *spellchecker-1* (Flores y Engels, 1999), involucrados también en mecanismos de reparación.

Hoy en día, la vía de estudio a nivel genético de las funciones de reparación del DNA en *Drosophila* ha sufrido un avance considerable debido al perfeccionamiento de las **técnicas de clonación**, que han permitido aislar nuevos genes implicados en la reparación del DNA (Digilio *et al.*, 1996, Kooistra *et al.*, 1999b; Jin *et al.*, 2000), aunque el análisis queda limitado porque no se poseen cepas mutantes en estos genes. Por otra parte, se ha completado la caracterización de distintos mutantes sensibles a mutágenos ya conocidos (Banga *et al.*, 1994; Sekelsky *et al.*, 1995; Houle y Friedberg, 1999).

Por último, mencionar que la **secuenciación del genoma** de *Drosophila* ha permitido determinar con rapidez la presencia o ausencia de posibles genes implicados en reparación de DNA con secuencias similares a las de estos genes en otros organismos. Con ello se ha establecido un mejor conocimiento de las vías de reparación existentes en *Drosophila*, tanto a nivel de composición génica como a un nivel funcional (Sekelsky *et al.*, 2000a; FlyBase, 2003).

3.1. Los procesos de reparación en *D. melanogaster*

La información obtenida a partir de los estudios genéticos y bioquímicos, unida al análisis genómico, permite establecer una visión general de las distintas vías de reparación del DNA que se conocen en *D. melanogaster* (Tabla 2), clasificándolas según el proceso de eliminación del daño en:

(1) **Reversión directa de daño:** es el mecanismo de reparación más sencillo, que permite la recuperación de la estructura original del genoma. Se encarga de la eliminación de dos tipos de alteraciones:

(a) las alteraciones producidas por la luz UV que, a su vez, son de dos tipos: dímeros ciclobutano de pirimidina (CPDs, **Cyclobutane Pyrimidine Dimers**) y (6-4) fotoproductos [(6-4)PPs] (**Pyrimidine Pyrimidone Photoproducts**). La eliminación de estas alteraciones se lleva a cabo por medio de las **fotoliasas** de DNA (Friedberg *et al.*, 1995) cuyos genes, en *Drosophila*, se han clonado recientemente aunque del proceso de fotorreactivación en este organismo se tenga constancia desde hace tiempo (Boyd *et al.*, 1980). Se ha clonado el gen *phr* (Todo *et al.*, 1994), cuyos mutantes son deficientes en reparar los CPDs (Boyd y Harris, 1985, 1987), y el gen *Dm64PR*, implicado en la eliminación de los (6-4)PPs (Todo *et al.*, 1996). Recientemente, se han descrito otros genes con homología a las fotoliasas de otros organismos, pero las proteínas que codifican no muestran actividad fotoliasa, lo que sugiere que tienen más bien una función en la fotorrecepción y no en la reparación (Selby y Sancar, 1999; Okano *et al.*, 1999).

(b) las alquilaciones del DNA, mediante la actuación de las **alquiltransferasas**, que eliminan de forma específica los grupos alquilo del DNA (Friedberg *et al.*, 1995). En *Drosophila* se tenía constancia de actividad alquiltransferasa *in vitro* (Green y Deutsch, 1983; Guzder *et al.*, 1991) y sólo recientemente se ha identificado el gen que codifica la O⁶-alquilguanina-DNA alquiltransferasa, denominado *DmAGT* (Kooistra *et al.*, 1999b).

Tabla 2. Genes clonados de *Drosophila* relacionados con la reparación del DNA

Gen en <i>Drosophila</i>	Homología (con genes de otros organismos)	Mutantes identificados	Función de la proteína
<u>Reversión directa</u>			
<i>phr1</i>	—	sí	CPD fotoliasa
<i>Dm64PR (phr6-4)</i>	—	no	(6-4) fotoliasa
<i>DmAGT</i>	<i>ada</i>	no	O-6-alkylguanina-DNA alquiltransferasa
<u>BER</u>			
<i>s3</i>	—	no	proteína ribosomal DNA glicosilasa/AP liasa
<i>ogg1</i>	<i>mutM</i>	no	DNA glicosilasa/AP liasa
<i>ap3/ rppo</i>	—	no	AP endonucleasa
<i>rrp1</i>	<i>exoIII/ETH1/APN2</i>	sí	AP endonucleasa
<u>NER</u>			
<i>DmXPC</i>	<i>rad4/XPC</i>	no	NER endonucleasa, sensor del daño inducido por luz UV
<i>DmXPD</i>	<i>rad3/XPD</i>	no	Helicasa 3'-5', componente del factor TFIIH
<i>DmXPA</i>	<i>XPA</i>	no	Papel en reconocimiento del daño producido por luz UV
<i>Dmp62</i>	<i>p62</i>	sí	componente del factor TFIIH
<i>haywire</i>	<i>rad25/XPB/ERCC3/SSL2</i>	sí	Helicasa 3'-5', componente del factor TFIIH
<i>mus201</i>	<i>rad2/XPG/ERCC5</i>	sí	NER endonucleasa, actividad en 3' de la lesión
<i>mei9</i>	<i>rad1/XPF/ERCC4</i>	sí	NER endonucleasa, actividad en 5' de la lesión
<i>ddb1</i>	<i>XPE??</i>	no	Necesaria para NER <i>in vitro</i>
<u>MMR</u>			
<i>spellchecker (spel1)</i>	<i>mutS/MSH2</i>	sí	Reconocimiento de apareamientos erróneos en MMR
<i>tosca</i>	<i>exo1</i>	no	Actividad endonucleasa, unión con MSH2

Tabla 2. Genes clonados de *Drosophila* relacionados con la reparación del DNA (continuación)

Gen en <i>Drosophila</i>	Homología (con genes de otros organismos)	Mutantes identificados	Función de la proteína
<u>Tolerancia al daño</u>			
<i>mus308</i>	<i>Pol θ</i>	sí	DNA polimerasa (poll-like)/helicasa
<i>recq5/QE</i>	<i>SGS1/WNR</i>	no	Helicasa 3'-5'
<i>mus205</i>	<i>Pol ζ (REV3)</i>	sí	DNA polimerasa
<i>DNApolη</i>	<i>DNApolη</i>	no	DNA polimerasa implicada en TLS
<i>DNApolι</i>	<i>DNApolι</i>	no	DNA polimerasa implicada en TLS
<u>DSBs</u>			
<i>DmBLM/mus309</i>	<i>SGS1/BLM/recQ</i>	sí	Helicasa, homóloga a la humana deficiente en los síndromes de Werner y Bloom
<i>DmRAD54/okr</i>	<i>RAD54</i>	sí	Helicasa?? Reparación de DSBs por recombinación homóloga
<u>genes multifuncionales</u>			
<i>mei41</i>	<i>MEC1/ATR</i>	sí	Fosfatidilinositol-quinasa, reconoce DSBs, control ciclo celular G2/M
<i>mus209</i>	<i>PCNA</i>	sí	Replicación (factor procesivo de DNApol), reparación (MMR, NER, BER)
<i>Dmp53</i>	<i>p53</i>	no	Proteína de control del ciclo celular
<i>mus101</i>	<i>DPB11/rad4/cut5/topBP1</i>	sí	Proteína con dominios BRCT(probablemente forma parte de la DNA polε), papel en replicación , reparación y condensación de la cromatina
<i>DmFEN1</i>	<i>rad27/FEN1</i>	no	Actividad endonucleasa. Participa en BER y en replicación (procesado fragmentos de Okazaki)
<i>mus304</i>	—	sí	Helicasa con actividad ATPasa

(2) **Reparación por escisión:** es el tipo de reparación del DNA más usado. La especificidad de la reparación por reversión directa hace que la actuación de este mecanismo sea muy limitada, por lo tanto, la mayoría de las alteraciones son eliminadas mediante mecanismos de reparación que consisten en la escisión de la zona dañada y la restitución de ésta. Existen tres vías principales que utilizan este mecanismo, dependiendo del tipo de daño a eliminar:

(a) reparación por escisión de bases (BER): esta vía se encarga de reparar el daño producido en las bases como resultado de alquilaciones, oxidaciones y/o desaminaciones, siendo las **glicosilasas** de DNA las encargadas de reconocer el daño y realizar un corte en el enlace glicosídico que une la base dañada al esqueleto azúcar-fosfato del DNA. Las glicosilasas, tanto si son monofuncionales como bifuncionales (Dodson *et al.*, 1994), producen sitios abásicos (AP, **apurinic/apyrimidinic sites**) que son reconocidos por las AP endonucleasas, que cortan el enlace fosfodiéster en 5' del sitio AP, o por la actividad AP liasa de las glicosilasas bifuncionales, que cortan el enlace fosfodiéster en 3' del sitio AP (Friedberg *et al.*, 1995; Deutsch *et al.*, 1997; Sandigursky *et al.*, 1997). A continuación una exonucleasa, que genera un hueco de unos pocos nucleótidos, una polimerasa de DNA y una ligasa completan la reparación (Friedberg *et al.*, 1995).

A pesar de que no se ha identificado ningún mutante *mus* deficiente en BER, aunque cabe destacar el *mus206* como un buen candidato (Huang y Smith, 1997), se han identificado diferentes genes implicados en la BER. Se han clonado dos genes que codifican para glicosilasas funcionales capaces de eliminar residuos 8-oxoguanina: la proteína ribosomal S3 (Sandigurski *et al.*, 1997) y la 8-oxoguanina DNA glicosilasa (OGG1) (Dherin *et al.*, 2000), ambas proteínas con actividad AP liasa, y se ha determinado la presencia de una glicosilasa de DNA específica para apareamientos erróneos de pirimidinas, codificada por el gen *thd1* (FlyBase, 2003), a partir de las evidencias que se hallaron de este tipo de actividad en diferentes estadios de *Drosophila* (Breimer, 1986); así como actividad uracil DNA glicosilasa (Morgan y Chlebek, 1989). La actividad AP endonucleasa identificada en *Drosophila* por Spiering y Deutsch (1986) puede llevarse a cabo por los productos de los genes *AP3/RpPO* (Kelley *et al.*, 1989; Grabowski *et al.*, 1991) que presentan

homologías con endonucleasas humanas. Se han aislado mutantes para el gen *rrp1* (Sander *et al.*, 1991) que muestran deficiencia en la reparación del daño oxidativo (Gu *et al.*, 1994). Por otra parte, también se ha identificado en *Drosophila* el gen homólogo a *rad27/FEN-1* (Sekelsky *et al.*, 2000b), implicado en la BER en otros organismos.

(b) reparación por escisión de nucleótidos (NER): este mecanismo se encarga de eliminar la mayor parte de las lesiones que distorsionan la hélice de DNA, causadas por la exposición a mutágenos químicos o a luz UV. El proceso requiere varios pasos, comunes en todos los organismos: reconocimiento del daño, incisión a ambos lados de la lesión por dos **endonucleasas** que liberan un fragmento de DNA más o menos grande, síntesis del hueco generado utilizando la cadena intacta como molde, y ligación de los extremos libres (Friedberg *et al.*, 1995). Existen dos vías de actuación de NER, una que se encarga de reparar las lesiones que ocurren en cualquier punto del genoma, (que afecta a todo el genoma por igual), y otra específica de DNA que se transcribe (TCR), en la que la señal para iniciar la reparación sería la parada de la transcripción (Hanawalt, 1994).

El mecanismo de NER está bien estudiado en diferentes organismos, existiendo un grado elevado de conservación en eucariotas (Hoeijmakers, 1993). En *Drosophila* se han identificado varios mutantes sensibles a mutágenos que muestran deficiencia en NER, en concreto: *mus201* (Boyd *et al.*, 1982), *mei9* (Baker y Carpenter, 1972) y *haywire* (Regan y Fuller, 1988). El gen *mus201*, homólogo del gen humano *XPG* (Houle y Friedberg, 1999), codifica una proteína con actividad 3'-endonucleasa; *mei9*, homólogo de *rad1/XPF* (Sekelsky *et al.*, 1995), codifica una proteína con actividad 5'-endonucleasa; y *haywire* (*hay*), homólogo de *ercc3/XPB* (Koken *et al.*, 1992; Mounkes *et al.*, 1992) que codifica una proteína con actividad helicasa, componente del factor de transcripción TFIIH implicado en la NER en humanos. Aparte de estos mutantes bien caracterizados, los mutantes *mus207* (Snyder y Smith, 1982) y *mus210* (Henderson *et al.*, 1987) también presentan deficiencias en la reparación por escisión, pero todavía no se ha identificado la función implicada. Además, se han clonado otros genes que intervienen en NER, aunque no se hayan aislado mutantes deficientes en

dichos genes, como *DmXPA* (Shimamoto *et al.*, 1995), homólogo a *XPA/rad14*, la proteína a la cual codifica interviene en el reconocimiento del daño; *DmXPC* (Henning *et al.*, 1994), homólogo a *XPC/rad4*; *DmXPD* (Reynaud *et al.*, 1999), homólogo a *XPD/rad3*, que codifica para una helicasa componente del factor de transcripción TFIIH (Sandoval y Zurita, 2001); y *Dmp62* (Castro *et al.*, 2002), cuya proteína homóloga en mamíferos forma parte, también, del factor de transcripción TFIIH. Es importante señalar que a pesar de los esfuerzos realizados para verificar la existencia de la TCR en *Drosophila* hasta ahora no se ha logrado identificar a los genes homólogos a *CSA* y *CSB* de humanos, específicos de este proceso, lo que puede sugerir que *Drosophila* no presenta la vía de reparación de daño en genes que se transcriben (Sekelsky *et al.*, 2000a).

- (c) reparación de apareamientos erróneos (MMR):** este sistema juega un papel crucial en la reparación tanto de los errores producidos durante la replicación como de los apareamientos erróneos en las estructuras heterodúplex formadas durante la recombinación meiótica (Harfe y Jinks-Robertson, 2000). Además, la MMR también participa en la inhibición de la recombinación entre secuencias de DNA no idénticas y en procesos de respuesta a daño en el DNA (ver el apartado 1.2.2.1) La primera evidencia sobre la existencia de MMR en *Drosophila* se obtuvo *in vitro*, tras comprobar que extractos celulares poseían la capacidad de corregir apareamientos erróneos en el DNA (Holmes *et al.*, 1990). Actualmente, se ha aislado un único mutante de *D. melanogaster* deficiente en MMR, denominado *spellchecker1* (*spel1*), que posee una deficiencia en el gen homólogo a *mutS/MSH2* (Flores y Engels, 1999). El análisis del genoma de *Drosophila* muestra la presencia de un homólogo del gen *MSH6* pero no se han encontrado otros miembros de la familia de genes *MSH*, como *MSH4*, *MSH5* y *MSH3* presentes en levaduras y humanos (Sekelsky *et al.*, 2000a) (ver Tabla1). También se han identificado dos miembros de la familia de genes *MLH*, homólogos a *MLH1* y *PMS2*. El hecho de que en *Drosophila* no se hayan identificado el resto de genes homólogos a *mutS*, sugiere que los componentes de la MMR en este organismo son menos específicos o que otros genes alternativos están cumpliendo ese papel. Así, algunos estudios indican que proteínas que intervienen en otros sistemas de

reparación, como *DmXPF* (gen *mei9*) y *EXO1* (gen *tosca*) también intervienen en la reparación de apareamientos erróneos en los heterodúplex formados durante la meiosis (Digilio *et al.*, 1996; Bhui-Kaur *et al.*, 1998).

- (3) **Reparación de roturas de doble cadena (DSBR):** la reparación de las roturas de doble cadena es esencial tanto para el mantenimiento de la viabilidad celular como de la integridad del genoma. Las roturas de doble cadena se pueden reparar por medio de dos mecanismos principales: **(1)** unión de los extremos no homólogos (NHEJ, ***Non-Homologous End-Joining***), que permite la reunión directa de los extremos rotos, y **(2)** la HRR, que incluye procesos de conversión homóloga y el apareamiento homólogo de cadena sencilla de los extremos rotos (SSA, ***Single-Strand Annealing***) (Preston *et al.*, 2002).

En *Drosophila*, la DSBR ocurre principalmente por recombinación homóloga, donde el proceso de SSA compite con el proceso de síntesis dependiente del apareamiento de cadena sencilla (SDSA, ***Synthesis-Dependent Strand Annealing***) (Preston *et al.*, 2002). Se han identificado varios mutantes sensibles a mutágenos deficientes en la DSBR: *mus209* (Henderson *et al.*, 1987), *mus309* (Boyd *et al.*, 1981), *DmRAD54* (Kooistra *et al.*, 1997) y *mus302* (Boyd *et al.*, 1981). Se ha aislado el gen alterado en cada uno de estos mutantes excepto para *mus302*. *mus209* codifica para el factor PCNA y es homólogo al gen *PCNA* de mamíferos (Henderson *et al.*, 1994); el gen *mus309* codifica para *DmBLM*, homólogo de *BLM* (Kusano *et al.*, 1999), con función helicasa que participa en el proceso de SDSA (Adams *et al.*, 2003); el gen *DmRAD54* es homólogo al *rad54* de levaduras (Kooistra *et al.*, 1999a) y juega un papel esencial en la DSBR vía recombinación homóloga.

- (4) **Tolerancia al daño: reparación postreplicativa (PRR o *bypass* recombinacional) y reparación por síntesis de la translesión (TLS o *bypass* replicativo):** estos sistemas de reparación actúan cuando la replicación se ve interrumpida por lesiones en el DNA que no han sido previamente reparadas, siendo capaces de rellenar los huecos de cadena sencilla que presentan alteraciones en la cadena molde (Friedberg *et al.*, 1995). El sistema de *bypass* recombinacional (PRR, ***Postreplication Repair***) rellena el hueco dejado frente a la lesión utilizando como cadena molde la de la cromátida hermana (Cox, 1999), siendo éste un sistema libre de errores; mientras que el sistema de *bypass* replicativo (TLS) lleva a cabo la replicación de la cadena molde dañada mediante

polimerasas de DNA especiales, siendo un sistema, en algunos casos, no libre de errores (Woodgate, 1999).

En *Drosophila* existen genes implicados en estas vías de tolerancia al daño como el mutante *mus308* (Boyd *et al.*, 1981), que presenta alteración en un gen con actividad polimerasa y helicasa (Harris *et al.*, 1996; Oshige *et al.*, 1999; Marini y Wood, 2002), y que podría tener afectados ambos procesos de tolerancia al daño; algunos de los genes que intervienen en el proceso de HRR también intervendrían en la PRR, entre ellos *DmRAD54*; el gen *mus205* podría participar en la TLS ya que codifica para la subunidad catalítica de la polimerasa de DNA ζ (Eeken *et al.*, 2001) que es homólogo al gen *rev3* de *S. cerevisiae* implicado en TLS, aunque cabe indicar que el fenotipo del mutante *mus205* de *Drosophila* (Snyder y Smith, 1982) difiere del mutante *rev3* de levaduras. Además, se han aislado en *Drosophila* las polimerasas de DNA η y ι que presentan un papel claro en TLS (Ishikawa *et al.*, 2001).

Aparte de los procesos de reparación descritos en *Drosophila*, también se han identificado algunos genes implicados en la respuesta celular al daño. La mutación en estos genes produce un fenotipo sensible a distintos tipos de mutágenos mostrando alteraciones genómicas diversas. Entre ellos, se encuentra *mus209* (Henderson *et al.*, 1987), cuyo gen codifica para el factor PCNA (Henderson *et al.*, 1994); *mus101* (Boyd y Setlow, 1976), que presenta alterado el gen que codifica para BRCT (Yamamoto *et al.*, 2000); *mei41* (Baker y Carpenter, 1972), cuyo gen codifica para un miembro de la familia de las quinasas ATM (Banga *et al.*, 1994; Hari *et al.*, 1995), relacionado con las quinasas ATR (Sekelsky *et al.*, 2000a) y *mus304* (Brodsky *et al.*, 2000), implicado en la respuesta al daño en el DNA. También se han clonado los genes *p53* (Jin *et al.*, 2000), *DmFEN-1* (Sekelsky *et al.*, 2000b) y *DmFANCD2* (Castillo *et al.*, 2003), entre otros.

3.2. Mutantes deficientes en reparación del DNA estudiados en este trabajo

3.2.1. Mutante *mus201*

El gen *mus201* de *Drosophila*, clonado por Houle y Friedberg (1999), es homólogo al gen humano *XPG*, con una función esencial en NER, y su deficiencia está relacionada con desórdenes humanos asociados a sensibilidad a la luz UV, como son: XP, CS o TTD (Sekelsky *et al.*, 2000b). La proteína XPG presenta actividad endonucleasa específica del extremo 3' de la cadena dañada.

De los siete alelos mutantes *mus201* (Smith *et al.*, 1980; Boyd *et al.*, 1982; FlyBase, 2003) que se han aislado, en el presente trabajo, hemos utilizado el alelo *mus201^{D1}*, que presenta una pequeña deleción en su secuencia nucleotídica, provocando un cambio en la pauta de lectura que da lugar a una proteína truncada en el extremo C-terminal, y por tanto este mutante es deficiente en NER (Boyd *et al.*, 1987).

El mutante *mus201* es uno de los mutantes deficientes en reparación mejor caracterizados en *Drosophila* debido a que se ha utilizado extensamente en estudios de mutagénesis (Graf *et al.*, 1984; Vogel, 1992; Ferreiro *et al.*, 1998; Calléja *et al.*, 2001). Presenta una elevada sensibilidad a MMS, NH₂, UV y ENU, aunque débil a los rayos X (Boyd *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 1980; Boyd *et al.*, 1982; Olsen y Green, 1982; Zimmering y Thompson, 1987). La deficiencia en NER de los mutantes *mus201* se manifiesta como: incapacidad de la síntesis de DNA no programada (UDS, Unscheduled DNA Synthesis) en respuesta a MMS, MNU o UV (Dusenbery *et al.*, 1983), inducción de letales recesivos ligados al sexo (SLRL, Sex-Linked Recessive Lethals) (Boyd *et al.*, 1982; Vogel *et al.*, 1985; Ferro, 1986; Vogel, 1989; Eeken *et al.*, 1991) y reducción de la actividad AP endonucleasa (Osgood y Boyd, 1982).

3.2.2. Mutante *spe1*

El gen *spellchecker1* (*spe1*) de *Drosophila* es homólogo a los genes *mutS/MSH2*, con un papel en la MMR (Flores y Engels, 1999). Como se ha indicado en el apartado 1.2.2.1, la proteína MSH2 se encarga de reconocer los apareamientos erróneos en el DNA actuando, por lo tanto, al inicio del proceso de MMR.

El mutante *spe1* se obtiene por el solapamiento parcial de dos deleciones presentes en el cromosoma II, que da lugar a la deleción en homocigosis del gen *spe1* (Figura 12).

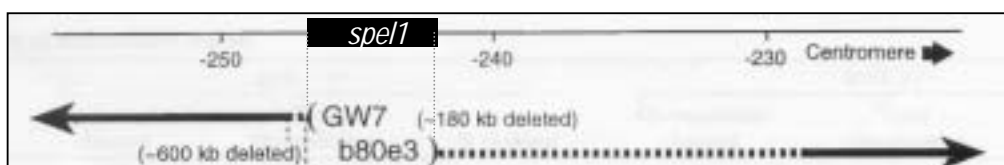


Figura 12. Mapa genético del gen *spe1*. Los mutantes, *b80e3* y *GW7*, complementan excepto en la región que comprende el gen *spe1* (modificado de Flores y Engels, 1999).

Los individuos deficientes en *spe1* son viables y relativamente fértiles, pero presentan una tasa elevada de MSI que conlleva una acumulación de mutaciones en microsatélites a lo largo de las generaciones. El gen *spe1* también interviene en la estabilidad de este tipo de secuencias repetidas durante la DSB. Sin embargo, el mutante *spe1* no presenta una especial sensibilidad a agentes alquilantes (MMS) o a rayos γ (Flores y Engels, 1999). Además, estudios con este mutante sugieren que la MMR puede jugar un papel en la mutación específica de ciertas secuencias microsatélite (Todorova y Schlötterer, 2002).

3.2.3. Mutante *mus209*

El gen *mus209* de *Drosophila*, homólogo de los genes *pol30/PCNA*, fue clonado por Henderson y colaboradores (1987) y codifica para el factor PCNA, proteína muy conservada evolutivamente, que presenta una función básica en la replicación del DNA, ya que actúa aumentando la procesividad de las polimerasas de DNA (Kelman, 1997).

Además, el factor PCNA participa en múltiples procesos de reparación como: NER (Nichols y Sancar, 1992; Shivji *et al.*, 1992), BER (Matsumoto *et al.*, 1994; Frosina *et al.*, 1996; Klungland y Lindahl, 1997), MMR (Johnson *et al.*, 1996; Umar *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998; Flores-Rozas *et al.*, 2000), PRR (Torres-Ramos *et al.*, 1996) y DSBR (Henderson y Glover, 1998; Holmes y Haber, 1999).

El PCNA presenta dos dominios funcionales e interacciona con diversos factores (Figura 13A). La forma funcional de la molécula del PCNA es un homotrímero que adopta una forma en anillo capaz de interaccionar con la doble cadena de DNA (Figura 13B). Además de desplazarse sobre el DNA, sirve de plataforma de interacción de un gran número de proteínas: polimerasas de DNA, p21, FEN-1, DNA ligasa I, XPG, RPA, DNA-(citosina-5) metiltransferasa, MSH2, MLH1, GADD45, MyD118, RFC, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas. Algunas de estas proteínas compiten entre sí por su unión a la molécula de PCNA (Tsurimoto, 1998).

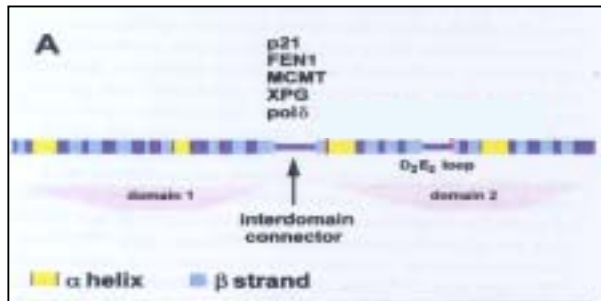
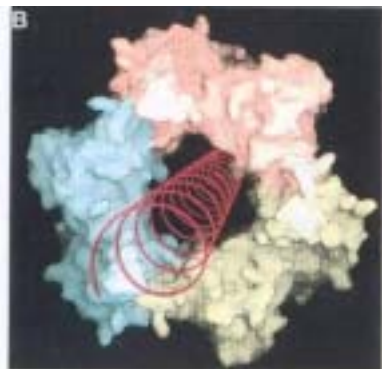


Figura 13.

(A) Esquema de un monómero del PCNA, en el que se muestra sus dominios funcionales (en amarillo se indican las hélices α y en azul claro las cadenas β). También se indica la región entre dominios donde interaccionan diversas proteínas (modificado de Henderson *et al.*, 2000).



(B) Estructura tridimensional de una molécula funcional del PCNA constituida por un trímero que adopta la forma de anillo, capaz de desplazarse sobre el DNA (de Krishna *et al.*, 1994).

En *Drosophila* se conocen 35 alelos del gen *mus209* (FlyBase, 2003). La mayoría de estas mutaciones son letales; sin embargo, entre ellos, existen algunos letales condicionales a la temperatura (*ts*, temperature sensitive), como el alelo *mus209^{B1}* utilizado en este trabajo, que han permitido determinar algunos efectos fenotípicos relacionados con una actividad reducida del PCNA (Henderson *et al.*, 1994; Henderson y Glover, 1998; Henderson *et al.*, 2000). En estos estudios se ha observado que el PCNA es requerido a lo largo del desarrollo embrionario, siendo esencial para este proceso; así, las hembras mutantes homocigotas son estériles a temperaturas permisivas para el crecimiento y los embriones y larvas mutantes son hipersensibles a agentes mutagénicos, como la radiación ionizante y el MMS. Esta sensibilidad es un reflejo del papel que juega el PCNA en la reparación del DNA. Los mutantes *mus209* son deficientes en la DSBR, además de suprimir el efecto de la variegación posicional (PEV, Positional Effect Variation), lo que sugiere la participación del PCNA en el ensamblaje y mantenimiento de la estructura de la cromatina. Esto último se ha visto ratificado por la reciente observación de la interacción entre *mus209* y miembros de los genes homeóticos del grupo *Polycomb* (Yamamoto *et al.*, 1997), que regulan la expresión génica mediante la reestructuración de la cromatina. En la búsqueda de proteínas que interaccionan con el PCNA en *Drosophila*, se han identificado varias de las ya obtenidas en otros organismos, además de algunas específicas de *Drosophila* como la transposasa del transposón *pogo* (Warbrick *et al.*, 1998).



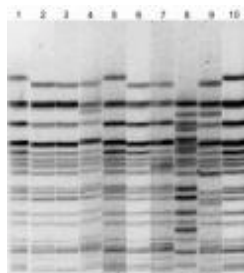
II.OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Durante los últimos años se han acumulado evidencias en favor de que la inestabilidad del genoma está estrechamente relacionada con los procesos de carcinogénesis y envejecimiento. Los continuos avances en la comprensión de los mecanismos de reparación del DNA y el cáncer ponen de manifiesto la relación entre defectos de reparación del DNA y el desarrollo tumoral, así como la importancia que tienen los mecanismos de reparación del DNA en garantizar la estabilidad del genoma.

Hoy en día, por tanto, existe un gran interés en identificar y conocer el mecanismo de actuación de los factores implicados en la estabilidad del genoma, entre ellos la reparación del DNA. Dado que *D. melanogaster* es un excelente organismo modelo para el análisis genético del que se han aislado diferentes mutantes deficientes en la reparación del DNA, permite profundizar en la comprensión de los mecanismos de reparación, sus interconexiones y sus implicaciones. Todo ello constituye la base para el planteamiento, la realización y la consecución de este trabajo. Así, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Puesta a punto de la técnica de AP-PCR en *Drosophila*, para el estudio de la inestabilidad genómica general.
2. Papel de la deficiencia en reparación de apareamientos erróneos (MMR) en la inestabilidad genómica transmitida a la descendencia y determinación de posibles factores ambientales que modulen dicha inestabilidad.
3. Papel que juega el factor de replicación PCNA en la estabilidad genómica a lo largo de las generaciones.
4. Análisis de la inestabilidad de microsatélites (MSI) en *D. melanogaster* como complemento del análisis por AP-PCR de la inestabilidad genómica, para alcanzar los objetivos 2 y 3.



III. ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

Germ cells microsatellite instability. The effect of different mutagens
in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (*spel1*)

Mutat. Res. 514: 87-94 (2002)

Analysis of genomic damage in the mutagen-sensitive *mus-201* mutant of *Drosophila melanogaster* by arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting

A. López, N. Xamena, O. Cabré, A. Creus, R. Marcos, A. Velázquez *

Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Received 10 November 1998; received in revised form 20 April 1999; accepted 21 April 1999

Abstract

DNA repair mechanisms are important to maintain the stability of the genome. In *Drosophila melanogaster*, the *mus-201* gene is required in the excision repair process. To study the contribution of the *mus-201* gene in the stability of the *Drosophila* genome, we have used the arbitrarily primed PCR fingerprinting method (AP-PCR). We have analysed the changes in the genomic DNA fingerprints from the progeny of wild-type males crossed with *mus-201* repair-deficient or repair-proficient females. After induction of DNA damage with 2-acetylaminofluorene (2-AAF) in the wild-type parental males, quantitative and qualitative differences in the AP-PCR fingerprints were detected between the two crosses, and the estimate of the genomic damage detected by AP-PCR has clearly shown that the *mus-201* repair deficiency is associated with an increase of genomic damage. The predominant type of alterations detected by AP-PCR under the *mus-201* repair-deficient conditions agree with the results obtained in microsatellite PCR analysis, suggesting that the role of the *mus-201* gene, necessary in excision repair, is not associated to the mismatch repair process. The work reported here demonstrates that the AP-PCR is a suitable technique to analyse genetic alterations in *D. melanogaster* and, consequently, can be used to compare the susceptibility to genomic damage of different DNA repair mutants. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Drosophila melanogaster*; *mus-201* mutant; DNA repair; AP-PCR; DNA fingerprinting; Genomic damage

1. Introduction

It is well known that DNA repair mechanisms are highly conserved between organisms. In eukaryotes, DNA repair processes are complex and have some overlapping pathways. These processes have been

extensively studied in *Saccharomyces cerevisiae* where DNA repair mechanisms are well understood, compared with more complex organisms [1]. On the other hand, studies using *Drosophila melanogaster* can provide a model to add more light on these mechanisms in a multicellular system.

Our knowledge about DNA repair functions in *Drosophila* comes from genetic and biochemical studies carried out on some of the over 30 mutagen-

* Corresponding author. Tel.: +34-93-5813111; Fax: +34-93-5812387; E-mail: antonia.velazquez@uab.es

sensitive mutants known in *D. melanogaster* [2,3]. At present, a more broad view of DNA repair functions in this organism is possible thanks to the isolation of some of the altered genes from these mutants, as well as other genes homologous to yeast and human DNA repair genes [4,5]. Due to the high degree of homology of *Drosophila* repair genes with those from bacteria and other eukaryotes, studies with *Drosophila* will make possible to give us a more complete picture of the repair system in high organisms and may provide direct insight about human repair mechanisms.

We have used a DNA fingerprinting method, the arbitrarily primed PCR (AP-PCR), to quantify the genomic damage in a deficient DNA repair mutant of *D. melanogaster*, the *mus-201* strain, that is defective in an early step of the excision repair process [6]. The AP-PCR technique is based on the amplification of anonymous random sequences scattered in the genome, and constitutes a simple and unbiased method to analyse complex genomes [7]; besides, it has been used for genetic mapping and DNA typing of different organisms [8,9], in cancer research [10–12], and in mutagenesis [13,14].

In this study, to analyse the genomic damage that is inherent to the repair deficient *mus-201* strain, we firstly induced DNA damage with the well known mutagen 2-acetylaminofluorene (2-AAF) to compare it with a repair proficient strain. Vogel et al. [15], by analysing thousands of chromosomes in the SLRL test, have shown that the *mus-201* strain presents a higher spontaneous recessive lethal rate than wild-type strains. In our studies, treatment with 2-AAF will increase the rate of spontaneous genetic damage in the *Drosophila* strains being, in this way, more feasible to detect alterations in the *mus-201* strain that are due to their DNA repair deficiency. In this report, we show that quantitative and qualitative genetic alterations are detected by AP-PCR in the progeny of *mus-201* females that were crossed with treated wild-type males, in contrast to the residual genetic alterations observed using repair proficient females. The data have been analysed to give an estimate of the total genomic damage found in the progeny of these strains. Altogether, our results demonstrate that the extent of the genomic damage induced is clearly dependent on the repair capabilities of the analysed individuals. We have also inves-

tigated the microsatellite instability in the progeny of *mus-201* and wild-type females, and we found no correlation with the global genomic damage quantified by AP-PCR.

2. Materials and methods

2.1. *Drosophila* stocks and culture

We used the following *D. melanogaster* strains: a wild-type strain maintained in our laboratory, *Canton-S* (*CS*); and the mutagen sensitive mutant, *cn mus-201^{D1}*, kindly provided by A. Rosenstein (Section of Molecular and Cellular Biology, Division of Biological Sciences, University of Davis, CA, USA) and J.A. Ferreiro (Department of Functional Biology, University of Oviedo, Spain). For more details on the specific genetic markers see Refs. [16,17]. The strains were maintained in 125 ml culture bottles in standard conditions at 25°C and 60% of relative humidity.

2.2. Treatment procedure

The chemical mutagen used in the treatments carried out in our experiments was 2-AAF (CAS No. 53-96-3), supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Just before treatment, 2-AAF was dissolved with 1% Tween 80 and 3% ethanol in double-distilled water to the final concentration of 4 mM, and supplied with a 5% (w/v) sucrose. Three to four days old *CS* males were treated by feeding for 24 h in glass filter special feeding units (1D3, Scott, Mainz, Germany) after 3–4 h of starvation. After treatment, the *CS* males were mated to either *CS* or *mus-201^{D1}* virgin females at a sex ratio of 1:2. They were allowed to lay eggs for 3 days in bottles supplied with standard medium to obtain brood 1 (progeny comes from treated spermatozoa), and then the same males were remated to new virgin females for 2 days to obtain brood 2 (progeny comes from treated spermatids). All parental males and females, as well as F1 flies, were collected and kept at –80°C.

2.3. Genomic DNA isolation

Adult flies kept at –80°C were used for genomic DNA extractions of individual flies, following the

method described by D.B. Roberts [18] and dissolved in 20–30 ml of double-distilled water.

2.4. AP-PCR amplification

Twenty-five microliters of reaction were prepared using 1 μ l of the DNA stock solution from individual flies (\sim 50 ng of DNA) in 1 \times PCR reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.01% gelatine), 4 mM MgCl₂, 125 μ M of each dNTP, 3 μ Ci of [α -³³P]dATP, 1 U of Taq DNA polymerase and 0.25 μ M of the arbitrary primer WB (5'-GTTAGGGAGCCGATAAAGAG-3'). The reactions were carried out in a Programmable Thermal Controller (PT-100 MJ Research, USA). A preincubation for 3 min at 94°C was followed for five cycles of low stringency conditions (94°C for 30 s, 40°C for 30 s, and 72°C for 90 s) and then for 30 cycles of high stringency conditions (94°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 60 s). Finally, 3 μ l of reaction were fractionated by electrophoresis on a 6% denaturing polyacrylamide gel (6 h at 45 W and 50°C) and visualized by autoradiography.

2.5. Quantification of genomic damage

The AP-PCR fingerprinting bands considered for the assessment of genomic damage were those reproducible and clearly visualized in the autoradiography. We consider that a reproducible band is such that is visualized in all the repeated experiments carried out.

To estimate the total genomic damage in the individual progeny detected by their DNA fingerprints, we scored the number of altered bands in each individual (increases and decreases of band intensity, mobility shifts and new bands) and the sum of changes was divided by the total number of amplified bands per individual. This total number was calculated as follows: the number of reproducible amplified bands with the primer WB (17 bands) plus the number of new amplified bands, considering the latter as possible target sequences to amplify from genomic DNA of *CS* and *mus-201* strains. This index was called progeny damage fraction (PDF).

The genomic damage identified by AP-PCR in the total progeny of a cross was expressed as the mean

PDF. Statistical differences between the genomic damage found in the different crosses were analysed by means of the Kolmogorov–Smirnov test.

2.6. Cloning AP-PCR amplified sequences

Fingerprinted bands of interest were cut from the polyacrylamide gel and eluted into 50 μ l of water for 10 min at 70°C. Two microliters of the eluted DNA were reamplified by PCR with the same arbitrary primer (WB). The conditions of the PCR reaction were the same as those for AP-PCR, but a 2.5-mM concentration of MgCl₂ was used, radiolabelled nucleotide was not incorporated and the reaction was performed for 30 high-stringency cycles. The amplified bands were cloned in the *EcoRV* site of the pBluescript SK + vector (Stratagene, USA) using standard procedures. The cloned sequences were labelled with digoxigenin-11-dUTP by PCR, using universal sequencing primers (M13/pUc sequencing primer 1, New England Biolabs, USA; M13/pUc sequencing primer 2, Promega, USA).

To confirm that the correct sequence was cloned, we performed a Southern blot hybridization from a section of the AP-PCR fingerprint gel containing the band of interest, using as a probe the labelled cloned sequences. Detection of hybridized bands was carried out with the DIG luminescent detection kit (Boehringer Mannheim, Germany), following the supplier's instructions.

2.7. PCR amplification of the cloned sequences from genomic DNA

Cloned AP-PCR DNA fragments were sequenced using a sequencing apparatus AFL (Pharmacia Biotech, Sweden). The primers designed to amplify one of the altered fingerprinting bands, the K fragment, directly from the genomic DNA were as follows: KU: 5'-GCCGATAAAGAGTGTGAGGG-3' and KD: 5'-GGAGCCGATAAAGAGCAGAC-3'. PCR was performed adding [α -³³P]dATP as described above, using high-stringency conditions for 30 cycles. PCR products were analysed by electrophoresis on a 6% denaturing polyacrylamide gel and visualized by autoradiography.

Table 1
Microsatellite primer loci

Locus	Primer (5'–3')
DMAC6	CTGTTCTTCTGCCGTTGTCA GAGCTCGGTACCCCTACTCC
DMCATHPO	TTCGACGGATCAGACTTGGTTTTTGGC GCGTTCGCCTTTCTTAGTCAATTTCCG
GREG-12	TATCGAGAGTCGCTGCTCGG CTGCCGTTGAAGGGCTGTGC
DRODSOR1	TTTGTTCAATAGAGCGTTGAC AGAACACCCCATCATAATG
DROFASI	GATGATTCGGAATCTCTCAGG TTTGACCAACTGTTTCTGC
DROZFP	TCTCGGAATAAAAATCCCTAGC TTAGCTGGTTATTTCCCTTTTCG
DROTKABL3	TCAGACCCAAATTCACACC TTTCTGCTGTTGTTGATGTGC
GREG-1	ATGCGACACATGGCCCACTA TTGCGGATCCAGTGGTTCAT
DROACS2	CACTCACTTCGAGTTCCCTACC CTAAACCCTCGGTTATGTAC

2.8. Analysis of microsatellite sequences

Microsatellite analysis was done by PCR using 1 μ l of the genomic DNA stock solution from individual flies (~50 ng of DNA) in a 25- μ l of reaction volume. PCR was carried out as described above, using 2.5-mM concentration of $MgCl_2$ and [α - ^{33}P]dATP. The reaction was taking place for 30 high-stringency cycles using 60°C as the annealing temperature of primers. The primers used to amplify the indicated loci were described by England et al. [19], Schug et al. [20], and Michalakakis and Veuille [21], and are summarized in Table 1. PCR products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

3. Results

3.1. DNA fingerprints of *mus-201* and *CS* strains

Prior to the AP-PCR analysis of the genomic damage related to DNA repair, and to ensure that there was not major genomic differences in the stocks, *mus-201* and *CS*, we performed AP-PCR DNA fingerprints in about 40 individual flies from each stock and no differences were found within

these stocks (data not shown). However, differences between *mus-201* and *CS* flies were apparent, as shown in Fig. 1, which are due to polymorphic amplified sequences in these stocks. We also carried out individual crosses using one *CS* male and one *mus-201* female and, as expected, the fingerprints obtained from the DNA of the individual progeny show a combination of both parental bands. From the fingerprints obtained with the primer WB (Fig. 1), we selected 17 reproducible amplified bands, ranging from 200 bp to over 1 kb and these bands were used to quantify the genomic damage induced in these stocks. Bands D, H, I, K and L are polymorphic, with bands D and I being particularly important because their mendelian transmission can be useful to identify the progeny from the crosses *CS* \times *mus-201* carried out in this work.

3.2. Induced genomic damage in germinal cells of *CS* males was detected as changes in the AP-PCR fingerprints under *mus-201* repair deficient conditions

In this study, we make the assumption that any defect in DNA metabolism, such as DNA repair, could increase the rate of spontaneous genomic alterations. We argued that after inducing genetic damage, it will be more feasible to detect the genetic alterations due to repair deficiencies. Taking this into account, we studied the induced genomic damage in the repair deficient strain *mus-201* of *D. melanogaster* compared with the repair proficient strain *CS*, using the AP-PCR technique. The induced damage will depend on both the mutagen used and the repair capability of the individuals.

We treated *CS* males with 2-AAF and these males were crossed either with *mus-201* or *CS* females. AP-PCR DNA fingerprints from individual emerged flies were performed to detect any changes in the pattern of bands compared with their parents. These differences have been used to quantify the induced damage related to the DNA repair deficiency of *mus-201*.

The DNA fingerprints obtained from the progeny corresponding to spermatozoa (brood 1) treated with 2-AAF, show that a high frequency of alterations were induced when parental *mus-201* females were used (Fig. 2), compared with the fingerprints ob-

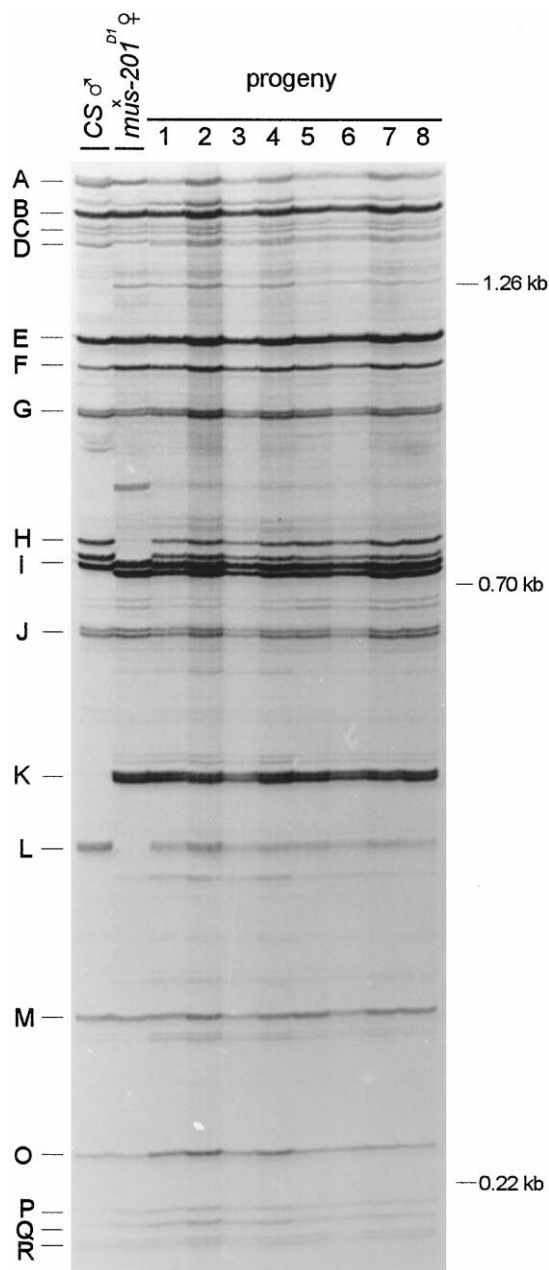


Fig. 1. DNA fingerprint by AP-PCR of the progeny from a cross of one *CS* male and one *mus-201^{D1}* female, using the WB primer. The different lanes show the fingerprints from DNA of parents, *CS* male and *mus-201^{D1}* female, and the progeny (one to four males, five to eight females). The reproducible amplified bands used to quantify the genomic damage are indicated as capital letters on the left. Size of the bands are shown on the right.

tained from the progeny using parental *CS* females (Fig. 3). By analysing the DNA fingerprints, several types of band alterations could be detected, the changes of band intensity being the most common modification (quantitative changes). Apparent mobility shifts of bands and new bands were also observed (qualitative changes) (Fig. 2).

As shown in Fig. 2, under repair deficient conditions and after treatment of spermatozoa with 2-AAF, the majority of analysed individuals presented multiple alterations, 19 out of 22 individuals (86.4%), and the total number of alterations in the progeny was estimated in 20.7% (see Table 2). However, under normal repair conditions only 1 out of 18 analysed individuals presented alterations (5.5%) (Fig. 3), and the total number of alterations in the progeny was estimated in 1.0% (see below and Table 2 for quantification of damage).

The progeny produced from treated spermatids was also analysed (brood 2). As shown in Table 2, when the parental *mus-201* strain was used, the number of individuals with alterations and the total number of alterations observed in spermatids (36.4% and 6.2%, respectively) were smaller than in spermatozoa. Furthermore, no alterations were observed in spermatids using the parental *CS* strain.

3.3. Quantification of damage

The genomic damage induced in the germinal cells of the wild-type males treated with 2-AAF depends on the repair capability of the fertilised egg (*mus-201* or *CS*). We estimated the extent of damage per germinal cell by dividing the number of altered bands found in the AP-PCR fingerprint of each emerged individual by the total number of amplified bands per individual (see Section 2). This index (PDF) corresponds to the fraction of general damage per cell and reflects the degree of induced genomic instability [12,22].

In Table 2, we indicate that, under repair deficient conditions, treatment of spermatozoa with 2-AAF induced an average fraction of damage per cell (mean PDF) of 0.21 ± 0.21 (range 0–0.64), which is significantly higher than the mean PDF in repair proficient conditions (0.01 ± 0.03 , range 0–0.14).

The number of altered bands in treated spermatids was much lower than in treated spermatozoa, in both

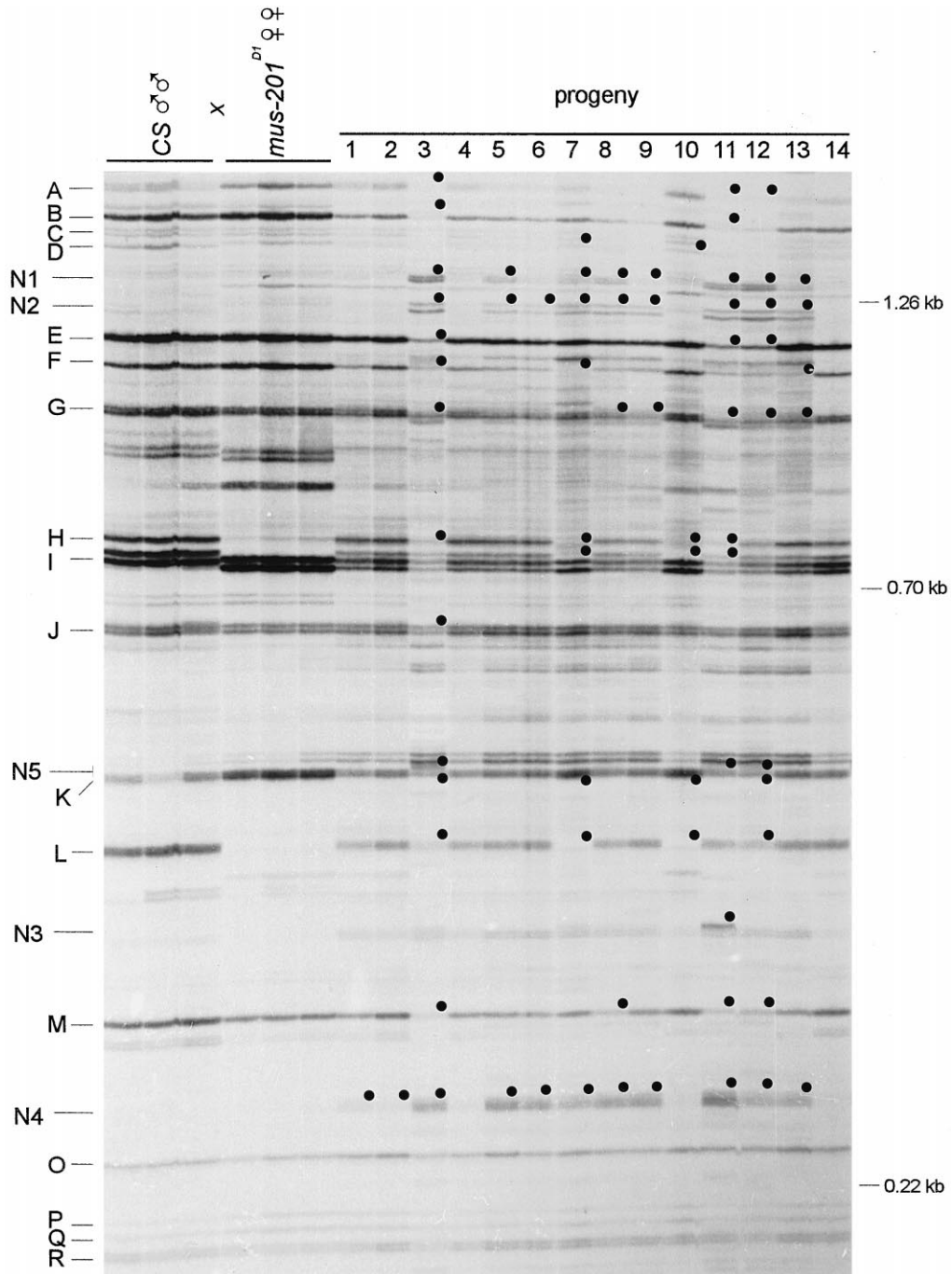


Fig. 2. AP-PCR fingerprints of genomic DNA, using the WB primer, from the progeny (brood 1) of the cross of treated CS males with *mus-201^{D1}* females. The fingerprints of representative parentals males and females are shown. The new amplified bands in the progeny fingerprints (N1–N5) are indicated on the left, together with the reproducible amplified bands. Changes in the fingerprints are indicated with a black dot (·). Size of the bands are shown on the right.

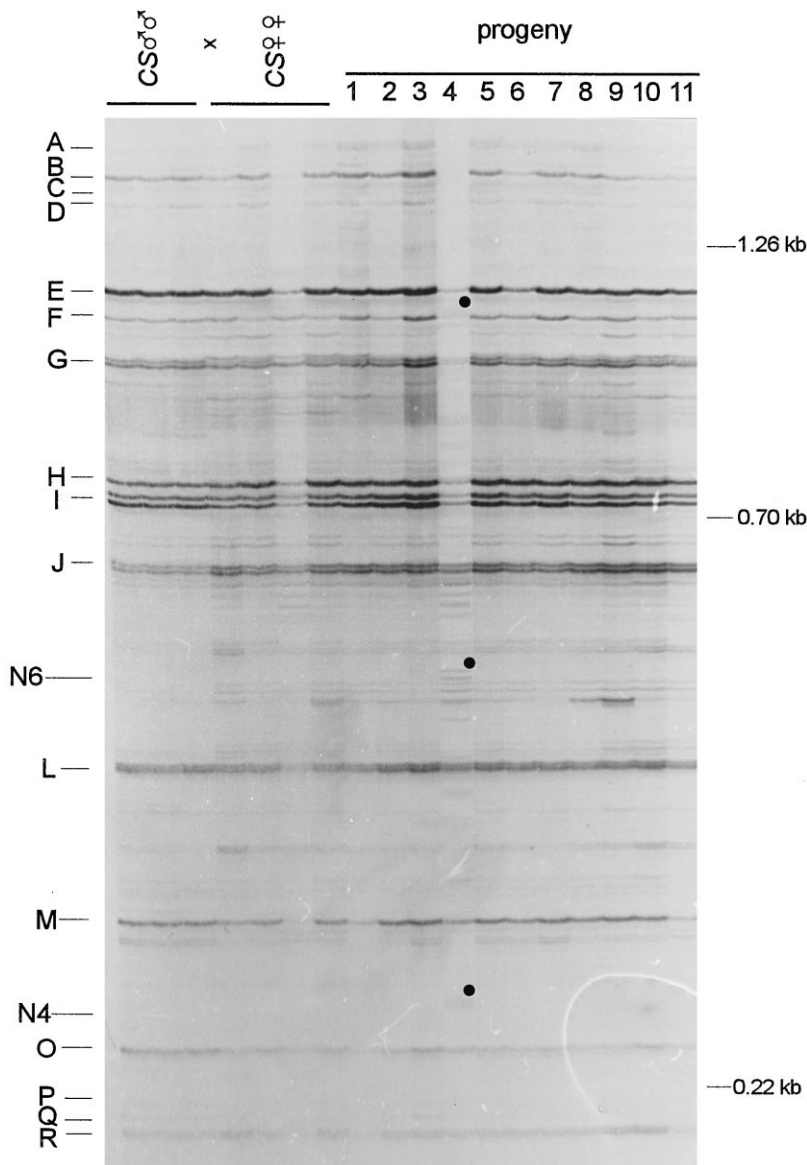


Fig. 3. AP-PCR fingerprints of genomic DNA, using the WB primer, from the progeny (brood 1) of the cross of treated *CS* males with *CS* females. The fingerprints of representative parentals males and females are shown. The new amplified bands in the progeny fingerprints (N4–N6) are indicated on the left, together with the reproducible amplified bands. Changes in the fingerprints are indicated with a black dot (·). Size of the bands are shown on the right.

repair deficient and repair proficient conditions. Even though, some damage was observed in spermatid cells when using *mus-201* parental females (PDF, 0.06 ± 0.11), whereas no alterations were observed using *CS* parental females.

The extent of total genomic damage induced after treatment with 2-AAF can also be estimated as the

relation between the total number of altered bands found in the AP-PCR fingerprints of the total progeny from a cross, and the total number of analysed bands in those individuals. This fraction indicates the total genomic damage induced in all the analysed individuals and is equivalent to the mean PDF, although it does not reflect the dispersion of the data. This index

Table 2

Genomic damage detected by AP-PCR in the progeny flies from crosses of parental females with different repair capabilities

Cross	No. of analyzed individuals	No. of individuals with alterations (%)	Mean alterations per individual \pm SD ^a	Mean PDF \pm SD ^b	No. of analyzed bands ^c	No. of altered bands	TDF ^d (%)
<i>CS</i> ♂♂ \times <i>mus-201</i> ♀♀ ^e							
Brood 1	22	19 (86.4)	4.54 \pm 4.56	0.21 \pm 0.21*	484	100	20.7
Brood 2	11	4 (36.4)	1.36 \pm 2.42	0.06 \pm 0.11	242	15	6.2
<i>CS</i> ♂♂ \times <i>CS</i> ♀♀ ^e							
Brood 1	18	1 (5.5)	0.17 \pm 0.71	0.01 \pm 0.03	342	3	0.9
Brood 2	18	0 (0.0)	0.00	0.00	342	0	0.0

^aThe number of alterations per individual represent the number of altered bands found in the AP-PCR fingerprint of each individual.

^bMean PDF: mean of the progeny damage fraction of the analyzed progeny. The PDF of each individual was calculated as the number of altered bands per individual divided by the number of total amplified bands per individual (see Section 2).

^cTotal number of analysed bands calculated as the number of total amplified bands per individual multiplied by the number of analysed individuals.

^dTDF: total damage fraction calculated as the total number of altered bands divided by the total number of analyzed bands.

^e*CS* males were treated before mating, by adult feeding, with 4 mM of 2-AAF.

* $P < 0.001$ against the brood 1 of the *CS* ♂♂ \times *CS* ♀♀ cross (Kolmogorov–Smirnov test).

is referred as the total damage fraction (TDF) (see Table 2). Altogether, these results clearly show that the *mus-201* repair deficiency is associated with an increase of the genomic damage detected by AP-PCR.

We want to point out that some of the bands were frequently altered in the different analysed individuals from the *mus-201* cross, suggesting that these sequences were preferentially altered by 2-AAF. For instance, the bands K and L and the new bands N1, N2 and N4. In Section 3.4, we propose some explanations for the origin of the new bands.

3.4. Isolation and characterisation of altered fingerprint bands

The different types of genomic alterations found by any PCR-based DNA fingerprinting technique can have their origin in modifications of the primer annealing sequence of the amplified sequences, except for mobility shifts of bands. However, previous studies indicated that changes in the intensity of bands can also correspond to gains or losses of amplified sequences [10]. These studies also suggested that rare new amplified sequences could correspond to major rearrangements (translocations, deletions and inversions).

To investigate the origin of the alterations that we observed in our fingerprinting experiments, we have

cloned and sequenced the K band directly from the acrylamide gel. To confirm that the correct fragment was cloned, the insert was labelled and used as a probe in Southern blot of the original AP-PCR gel. As shown in Fig. 4, the insert identified bands K and L, which indicates that the K–L sequences correspond to a length polymorphism. The polymorphic nature of the K–L bands was confirmed by direct amplification of these sequences by PCR, using in-

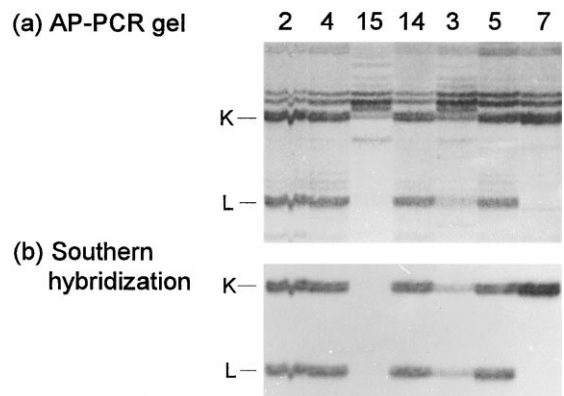


Fig. 4. Cloning confirmation of AP-PCR fingerprinted bands. (a) Section from a DNA fingerprint gel transferred to a nylon membrane and used in Southern blot hybridization (b) with the cloned K sequence as probe. The cloned K sequence hybridized with K and L fingerprinted bands showing the same pattern as in the DNA fingerprint gel.

ternal primers designed after sequencing of the cloned K fragment. Although some individuals of the CS strain showed both K and L alleles, the allele L was specific to the CS strain and the allele K specific to the *mus-201* strain (see Figs. 1 and 2); therefore, the normal offspring from the crosses between these strains should be heterozygous for this locus.

Direct PCR amplification of the K–L sequences, using genomic DNA from the same individuals that were analysed in the AP-PCR experiments, shows the same pattern of amplification found in the AP-PCR fingerprints for this locus. Fig. 5 shows a representative example of the results obtained by direct PCR amplification and compared with AP-PCR amplification, after treatment of spermatozoa with 2-AAF using the parental strain *mus-201*. These results indicate that treatment of spermatozoa with 2-AAF induce alterations in the K–L sequence intrinsic to the *mus-201* DNA repair deficiency. Moreover, these alterations are easily detected by AP-PCR; for instance, the individuals 7 and 10 of the offspring have lost the L allele. Treatment of spermatids also show changes of intensity of the K–L bands in two of the analysed individuals under *mus-201* repair

deficient conditions (data not shown). In contrast, no alterations were detected in this locus using the repair proficient strain. A similar analysis was followed after cloning the D band (data not shown) and we also found a concordance between the AP-PCR and PCR analysis, confirming that the AP-PCR is a suitable technique for detecting damage in anonymous genomic sequences.

New amplified sequences are frequent in our fingerprinting experiments, when we induced damage with 2-AAF and under *mus-201* repair deficient conditions. In treated spermatozoa, the total fraction of damage was 0.21 and from this damage the fraction that corresponds to new bands was 0.09 (which represents the 42.8% of the total damage). To explain this high frequency of new amplified sequences, we suggest that the origin of these new bands could reside in the fact that the genomic sequences modified by 2-AAF have created new primed annealing sites, allowing the amplification of the new observed bands. In addition, the possible breaks induced in the DNA by 2-AAF could contribute to the amplification of new bands by AP-PCR. This explanation is based on the types of DNA alterations produced by 2-AAF [23]. This assumption is compatible with the hypothesis that rare non-induced new amplified sequences by AP-PCR would represent genomic rearrangements [10]. In addition, when a new band is present in the majority of individuals (for instance, band N4 in Fig. 2) we can consider the possibility that these regions are preferentially altered by 2-AAF. Hot spots for DNA adduct formation have been found in studies of the mutation spectrum of 2-AAF [23].

3.5. Microsatellite instability and genomic damage

To determine if the genomic instability found by AP-PCR in the repair deficient strain *mus-201* after treatment with 2-AAF is associated with microsatellite instability, we analysed the DNA of the individuals previously analysed by AP-PCR, carrying out the amplification by PCR of nine microsatellite sequences. The analysis of these microsatellite sequences revealed the possible instability (MIN) as well as the allelic losses of these sequences (LOH) (Fig. 6). The 36 individuals analysed from the nor-

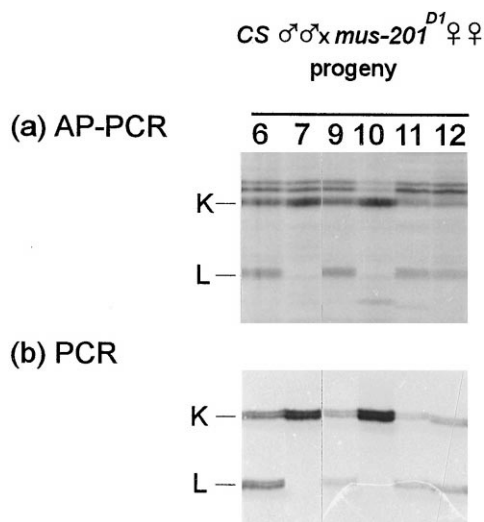


Fig. 5. PCR amplification of the K–L sequences from genomic DNA of flies. (a) Section from a DNA fingerprint gel showing the pattern of K–L bands in the AP-PCR amplification from genomic DNA of some of the progeny showed in Fig. 1. The same pattern of amplification was found by PCR using the specific primers KU and KD (b).

mal DNA repair crosses (CS) did not show alterations in any of the analysed microsatellite sequences. Likewise, no alterations were observed in the progeny from the *mus-201* females after treatment of spermatid cells, either. Therefore, we will refer below to the alterations found in the progeny from the *mus-201* females after treatment of spermatozoa.

We analysed 19 individuals for microsatellite instability from the deficient DNA repair cross (*mus-201*), after treatment of spermatozoa. Microsatellite instability (MIN +) was observed in one of the nine loci tested in five individuals, and loss of heterozygosity (LOH +) was detected in six individuals. The remaining individuals did not show alterations in these microsatellite loci (MIN – /LOH –). The mean PDF, as determined by AP-PCR, in these three

Table 3

Data of microsatellite analysis related to PDF from the progeny flies using the *mus-201* parental females

Alterations in microsatellite sequences ^a	No. of individuals (%)	Mean PDF ± SD
MIN +	5 (26)	0.19
LOH +	6 (32)	0.34*
MIN – /LOH –	10 (53)	0.17

^aAlterations were classified as: MIN +, microsatellite instability at one loci of nine examined; LOH +, loss of heterozygosity at one loci of nine examined; MIN – /LOH –, non-alteration in any of the nine loci examined.

* $P < 0.05$ (Kolmogorov–Smirnov test).

groups of individuals was 0.19, 0.34 and 0.17, respectively (Table 3). The LOH + group had the highest instability index which is significantly different with respect to the index found in the MIN – /LOH – group (Kolmogorov–Smirnov test; $P < 0.055$), however, the MIN + group is not significantly more unstable than the MIN – /LOH – group (Kolmogorov–Smirnov test). These data suggest that the genomic instability detected by AP-PCR in the *mus-201* repair deficient strain is independent of the microsatellite instability, but related to allelic losses.

4. Discussion

In this study, we have used the AP-PCR technique to quantify the degree of genomic damage inherent to the defective *mus-201* repair gene of *D. melanogaster*. Mutants at the *mus-201* locus are typical of the excision-deficient repair mutants in other organisms [24] and this gene is absolutely required in the initial steps of excision repair [6]. The *mus-201* mutants are hypersensitive to UV and to a wide variety of chemical mutagens, but they are relatively insensitive to X-rays and do not interfere with meiotic processes [6,25].

Some authors have reported the response of *mus-201* mutants to induced DNA lesions in *Drosophila*, mainly using the multiple locus SLRL test [15,26,27]. On the other hand, the use of repair mutants in mutagenesis research is rather directed to study the mechanistic mode of action of genotoxins more than

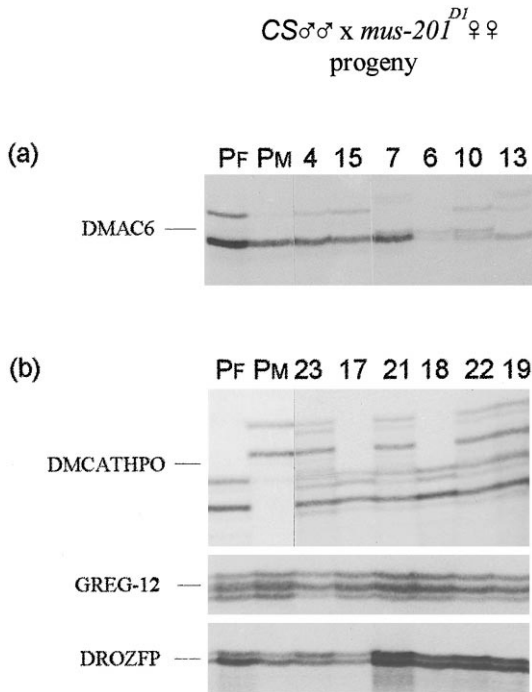


Fig. 6. PCR amplification of microsatellite sequences from genomic DNA of the progeny of *mus-201* females after treatment of spermatozoa with 2-AAF. Representative PCR amplification pattern of parental flies (P_F, parental female; P_M, parental male) is compared with the altered pattern found in the progeny. (a) Microsatellite instability in individuals 7, 6, 10 and 13 at locus DMAC6. (b) Loss of heterozygosity in individuals 17 and 18 at locus DMCATHPO, no changes at loci GREG-12 and DROZFP.

to know the implication of the repair deficiencies in DNA damage. However, our general interest resides in establishing the extent of genomic instability as a consequence of repair deficiencies. Here, we report the data obtained with the *mus-201* mutant of *D. melanogaster*.

Based on the knowledge about the DNA repair activity during germ cell development in *Drosophila* and in the fact that DNA repair activity takes place in the egg after fertilisation [Ref. [28] and references therein], in our studies, we followed the same experimental designs that are currently undertaken in the mutagenicity tests with *Drosophila*. We have studied the genomic damage in postmeiotic male germ cells, which are repair inactive, after introducing these cells in repair active oocytes, which were either proficient or deficient in repair (*CS* and *mus-201*, respectively). The analysis of the DNA fingerprints, obtained by AP-PCR, was performed in the enclosed individuals. These studies were completed with microsatellite instability analysis in the same individuals previously analysed by AP-PCR.

2-AAF treatments were carried out in male germinal cells to amplify the differential spontaneous genomic alterations due to the repair capabilities of the *CS* and *mus-201* strains. The mutagenic effects of 2-AAF are well documented [23]. DNA adducts produced by metabolic 2-AAF derivatives induce frameshift mutations in short direct repeated sequences and base substitutions [29–31]. Furthermore, 2-AAF producing breaks in the DNA has also been reported [23]. Extensive studies have demonstrated that premutagenic DNA adducts produced by 2-AAF are removed by excision repair pathways [23], and some evidences exist about the implication of the mismatch repair system to correct the frameshift mutations produced during the replication of the sequences containing these DNA adducts [23,32].

The amplification of anonymous genomic sequences by AP-PCR has previously been proved useful to detect quantitative and qualitative changes, originated by point mutations and rearrangements in the human genome [10,33,34]. Therefore, it could be expected that spontaneous genomic alterations, as well as alterations induced by 2-AAF, would be detected by AP-PCR, and we used this approach to estimate the contribution of the *mus-201* gene in the stability of the *Drosophila* genome. The observed

alterations of fingerprinted bands obtained from genomic DNA of emerged individuals permitted us to calculate the PDF as an estimate of genomic damage. Under our experimental conditions, the repair activity of the proficient strain removed the majority of adducts produced in spermatozoa by 2-AAF (1% of bands were altered, computed from only one individual with alterations of 18 analysed); however, using the excision repair deficient *mus-201* strain we found a higher relative level of alterations in spermatozoa (21% of bands were altered, computed from 19 individuals of 22 analysed). These results agree with the fact of excision repair being the major pathway to remove 2-AAF-adducts. Furthermore, we show that the AP-PCR technique is sensitive enough to detect genetic alterations induced by 2-AAF in *D. melanogaster*, in contrast with the difficulties reported by other authors in the analysis of the mutagenic effect of 2-AAF in *D. melanogaster* [35]. The small degree of damage found in spermatids, when compared to spermatozoa, could be explained by germinal selection of those highly damaged cells by 2-AAF.

Regarding the types of band alterations observed in the fingerprints, they can be classified into two groups: (I) changes of intensity of bands and new bands, which could be originated by changes in the primer annealing sequences and/or by more complex rearrangements [10], like the behaviour of K–L bands analysed by AP-PCR and PCR in our experiments (see Section 3.4); and (II) changes of mobility of bands (i.e., band G in our experiments; see Fig. 2), that could be originated by small changes in microsatellite sequences [33]; this type of alteration is actually used as an indication of deficient mismatch repair [33,36]. In our results, looking at the damage induced in spermatozoa in the *mus-201* strain, we have estimated that from the total fraction of damage (0.21), the 93.3% (a 0.20 fraction) and the 6.7% (a 0.01 fraction) represent alterations of groups I and II, respectively. Furthermore, in the analysis of nine microsatellite loci the individuals that shown MIN+ only have alterations in one microsatellite locus, but no individuals were found with alterations in more than one microsatellite; this is consistent with the low contribution of this type of lesion to the total damage induced by the 2-AAF and detected by AP-PCR. Altogether, our data indicate that the pre-

mutational lesions prone to be repaired by the excision repair process, persist in the genome when this repair mechanism is altered, and they will be converted into mutations after the replication process and/or by the error-prone repair mechanisms of the cell. In our case, analysing the adducts induced by 2-AAF in *mus-201* repair deficient conditions, we can imply that a fraction of these adducts were processed generating the group I of lesion detected by AP-PCR, while those adducts prone to generate frameshifts were repaired by the error-free mismatch repair mechanism, which is functioning properly in the *mus-201* strain; therefore, alterations of group II are less frequent (the fraction of group II of alterations observed could reflect the saturation of this repair mechanism in our experimental conditions). This hypothesis is in concordance with the fact that AAF adducts are processed by the excision repair mechanism [23] and also recognised by the mismatch repair proteins [32].

The lack of correlation between the PDF detected by AP-PCR and the instability in microsatellite sequences, found in our experiments, agree with the results recently reported by Basik et al. [22] and support the hypothesis that genomic instability, detected as quantitative changes by a PCR-based DNA fingerprinting technique, is independent of the instability arising from DNA mismatch repair defects. Thus, our results indicate that the *mus-201* gene is required for the excision repair process, this function being independent of the mismatch repair process.

As a conclusion, in this work, we have proved that the AP-PCR technique is suitable to analyse genetic damage in *Drosophila*. We applied this method to the analysis of genomic alterations inherent to the *mus-201* repair deficient mutant and we consider that this approach, together with the effort to isolate DNA repair genes, could be applied to other repair-deficient mutants in order to understand their contribution to the stability of the *Drosophila* genome.

Acknowledgements

This research has been supported in part by the Spanish Ministry of Education and Culture (SAF95-0813, CICYT and PB96-1138, DGES) and by the

Generalitat de Catalunya (SGR95-00512). During this work, A. López held a doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Culture.

References

- [1] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, DC, 1995.
- [2] J.B. Boyd, P.V. Harris, J.M. Presley, M. Nagachi, *Drosophila melanogaster*: a model eukaryote for the study of DNA repair, in: E.C. Friedberg, C.A. Bridges (Eds.), Cellular Responses to DNA Damage, Alan R. Liss, New York, 1983, pp. 107–123.
- [3] P.G. de Buendía, Search for DNA repair pathways in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 407 (1998) 67–84.
- [4] R.L. Dusenbery, P.D. Smith, Cellular responses to DNA damage in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 364 (1996) 133–145.
- [5] J.J. Sekelsky, K.C. Burtis, R.S. Hawley, Damage control: the pleiotropy of DNA repair genes in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 148 (1998) 1587–1598.
- [6] J.B. Boyd, R.D. Snyder, P.V. Harris, J.M. Presley, S.F. Boyd, P.D. Smith, Identification of a second locus in *Drosophila melanogaster* required for excision repair, *Genetics* 100 (1982) 239–257.
- [7] J. Welsh, M. McClelland, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 7213–7218.
- [8] J. Welsh, C.H. Petersen, M. McClelland, Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 303–306.
- [9] J. Welsh, M. McClelland, Fingerprinting using arbitrarily primed PCR: application to genetic mapping, population biology, epidemiology, and detection of differentially expressed RNAs, in: K.B. Mullis, F. Ferré, R.A. Gibbs (Eds.), *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhäuser, Boston, 1994, pp. 295–304.
- [10] M.A. Peinado, S. Malkhosyan, A. Velázquez, M. Perucho, Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 10065–10069.
- [11] M. Perucho, J. Welsh, M.A. Peinado, Y. Ionov, M. McClelland, Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed PCR: applications in cancer research, in: P.K. Vogt, I.M. Verma (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 254, Academic Press, New York, 1995, pp. 275–290.
- [12] R. Arribas, G. Capellà, S. Tórtola, L. Masramon, W.E. Grizzle, M. Perucho, M.A. Peinado, Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997) 3230–3240.
- [13] Y. Kubota, A. Shimada, A. Shima, Detection of γ -ray-induced DNA damages in malformed dominant lethal embryos of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using AP-PCR fingerprinting, *Mutat. Res.* 283 (1992) 263–270.

- [14] J. Welsh, N. Rampino, M. McClelland, M. Perucho, Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis, *Mutat. Res.* 338 (1995) 215–229.
- [15] E.W. Vogel, R.L. Dusenbery, P.D. Smith, The relationship between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems: IV. The effects of the excision-defective *mei-9^{L1}* and *mus(2)201^{D1}* mutants on alkylation-induced genetic damage in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 149 (1985) 193–207.
- [16] D.L. Lindsley, G.G. Zimm, *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego, 1992.
- [17] FlyBase: the *Drosophila* database, Available from the flybase.bio.indiana.edu network server and Gopher site and the URL <http://morgan.harvard.edu/>, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 53–56.
- [18] D.B. Roberts, *Drosophila*, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1986, pp. 278–279.
- [19] P.R. England, D.A. Briscoe, R. Frankham, Microsatellite polymorphisms in a wild population of *Drosophila melanogaster*, *Genet. Res. Camb.* 67 (1996) 285–290.
- [20] M.D. Schug, T.F.C. Mackay, C.F. Aquadro, Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Genet.* 15 (1997) 99–102.
- [21] Y. Michalakis, M. Veuille, Length variation of CAG/CAA trinucleotide repeats in natural populations of *Drosophila melanogaster* and its relation to the recombination rate, *Genetics* 143 (1996) 1713–1725.
- [22] M. Basik, D.L. Stoler, K.C. Kontzoglou, M.A. Rodríguez-Bigas, N.J. Petrelli, G.R. Anderson, Genomic instability in sporadic colorectal cancer quantitated by inter-simplified sequence repeat PCR analysis, *Genes, Chromosomes Cancer* 18 (1997) 19–29.
- [23] R.H. Heflich, R.E. Neft, Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites, *Mutat. Res.* 318 (1994) 73–174.
- [24] J.B. Boyd, J.M. Mason, A.H. Yamamoto, R.K. Brodberg, S.S. Banga, K. Sakaguchi, A genetic and molecular analysis of DNA repair in *Drosophila*, *J. Cell Sci.* 6 (1987) 39–60, Suppl.
- [25] R.L. Dusenbery, S.C. McCormick, P.D. Smith, *Drosophila* mutations at the *mei-9* and *mus-(2)201* loci which block excision of thymine dimers also block induction of unscheduled DNA synthesis by methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate, *N*-methyl-*N*-nitrosourea, UV light and X-rays, *Mutat. Res.* 112 (1983) 215–230.
- [26] W. Ferro, Studies on mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*: IX. Modification of genetic damage induced by X-irradiation of spermatozoa in N₂, air or O₂ by 4 autosomal repair-deficient mutants, *Mutat. Res.* 166 (1986) 49–57.
- [27] S. Zimmering, E.D. Thomson, Mutagenesis with ethyl nitrosourea (ENU) in oogonia of repair-deficient *mus(2)201^{D1}* *Drosophila* females, *Mutat. Res.* 192 (1987) 55–58.
- [28] E.W. Vogel, A.T. Natarajan, DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo, *Mutat. Res.* 330 (1995) 183–208.
- [29] R. Bintz, R.P.P. Fuchs, Induction of 2-frameshift mutations within alternating GC sequences by carcinogens that bind to the C8 position of guanine residues: development of a specific mutation assay, *Mol. Gen. Genet.* 221 (1990) 331–338.
- [30] I.O. Hiroaki, H. Kimura, M. Koya, H. Higuchi, T. Kato, *N*-Acetoxy-*N*-acetyl-2-aminofluorene-induced mutation spectrum in a human *hprt* cDNA shuttle vector integrated into mammalian cells, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2245–2250.
- [31] E.W. Vogel, M.J. Nivard, L.A.B. Ballering, H. Bartsch, A. Barbin, J. Nair, M.A. Comendador, L.M. Sierra, I. Aguirrezabalaga, L. Tosal, L. Ehrenberg, R.P.P. Fuchs, R. Janel-Bintz, G. Maenhaut-Michel, R. Montesano, J. Hall, H. Kang, M. Miele, J. Thomale, K. Bender, J. Engelbergs, M.F. Rajewsky, DNA damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implications of structure–activity relationships for cross-species extrapolation, *Mutat. Res.* 113 (1996) 177–218.
- [32] L. Guo-Min, H. Wang, L.J. Romano, Human MutSa specifically binds to DNA containing aminofluorene and acetylaminofluorene adducts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24084–24088.
- [33] Y. Ionov, M.A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, M. Perucho, Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis, *Nature* 363 (1993) 558–561.
- [34] T. Kohno, K. Morishita, H. Takano, D.N. Shapiro, J. Yokota, Homozygous deletion at chromosome 2q33 in human small-cell lung carcinoma identified by arbitrarily primed PCR genomic fingerprinting, *Oncogene* 9 (1994) 103–108.
- [35] E.W. Vogel, J.A. Zijlstra, W.G.H. Blijleven, Mutagenic activity of selected aromatic amines and polycyclic hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 107 (1983) 53–77.
- [36] M. Strand, T.A. Prolla, R.M. Liskay, T.D. Petes, Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair, *Nature* 365 (1993) 274–276.

ARTÍCULO 2

Spontaneous and bleomycin-induced genomic alterations in the progeny of *Drosophila* treated males depends on the *Msh2* status.

DNA fingerprinting analysis

Dna Repair 1: 941-954 (2002)

Germ cells microsatellite instability The effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (*spell*)

A. López, N. Xamena, R. Marcos, A. Velázquez*

Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia,
Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Received 31 July 2001; received in revised form 11 October 2001; accepted 18 October 2001

Abstract

Mismatch repair (MMR) process confers a type of genomic stability that maintains stable single repeated sequences, hence a failure of this process could deviate in cancer development. A characteristic phenotype of MMR-deficient cells is microsatellite instability (MSI) that could be modulated by mutagenic agents. The induction of MSI by the mutagens, bleomycin (BLM), hydrogen peroxide (H₂O₂), 2-acetylaminofluorene (2-AAF) and ethidium bromide (EB) was evaluated *in vivo*, by using a *Drosophila melanogaster*-null mutant of the *msh2* mismatch repair gene (*spell*). Whereas in the germ cells of the *spell* strain, we found microsatellite mutations in the five repeated sequences studied in untreated individuals, no alterations were found in the MMR-proficient strain. On the other hand, the data obtained from the treatment experiments show that BLM and 2-AAF induced a slight mutagenic effect in the MMR-deficient background but not in the normal one. These results indicate that the use of the *Drosophila spell* mutant (MMR-deficient) could be of relevant importance to identify environmental factors involved in carcinogenesis processes through genomic instability. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: DNA mismatch repair; Microsatellite instability; *Drosophila melanogaster*; *spell* mutant; Mutagenesis

1. Introduction

The post-replicative DNA mismatch repair (MMR) system is involved in correcting the errors that take place during DNA replication. It is well documented that loss of MMR increases the mutation rate, being microsatellite instability (MSI) a characteristic of MMR deficiency. Tumour cells of human non-poli-posis colon carcinoma (HNPCC) syndrome display MSI, as a consequence of an inherited mutant allele for genes encoding MMR enzymes, accompanied by a

somatic alteration in the remaining allele [1–3]. Families with HNPCC syndrome also present increased frequencies of cancer development, which indicates the strong association between the lack of proper function of MMR and high risk of cancer [4,5]. In addition, data of MSI are reported in other types of cancer, although, in the majority of cases, mutations in the mismatch repair genes have not yet been identified [6,7]. These findings raise the possibility that factors other than MMR deficiency may also contribute to MSI [8].

In addition to the general assumption that mutation produced by endogenous and exogenous agents are major determinants of human cancer, evidences exist indicating a contribution of environmental fac-

* Corresponding author. Tel.: +34-93-5813111;
fax: +34-93-5812387.
E-mail address: antonia.velazquez@uab.es (A. Velázquez).

tors on MSI. Some chronic inflammation diseases present MSI attributed to the generation of oxygen free radicals overwhelming the MMR system [9,10]. Induction of MSI by oxidative damage in DNA has been demonstrated in *E. coli* [8,11] and in cancer cells [12,13]. It is also reasonable to think that both, MMR deficiency and environmental factors, could interact generating genomic instability, including MSI. It has been reported that MMR recognises several types of damage [14–16], being well known that the loss of MMR causes resistance to the cytotoxic effect of certain mutagens. This would suggest a role of MMR to signal the presence for genomic damage and, thereafter, initiate a sequence of events that promote either repair or apoptosis processes [17–19]. In this context, there are evidences that a MMR-deficient background confers less sensitivity to the toxic effects of alkylant agents [20–23], oxidative damage [19,24–26] or chemotherapeutic agents [27–30]. Nevertheless, the low sensitivity to cytotoxic effects of mutagens in these cells is accompanied by a hypersensitivity to the mutagenic effect of these compounds, compared to the MMR-proficient cells. These evidences raise the possibility of MMR-deficient cells could suffer malignant transformation due to DNA damaging agents.

In order to validate the contribution of chemical mutagens in MSI, under MMR-deficient conditions, an *in vivo* study using the *spell* mutant of *Drosophila melanogaster*, deficient in the *msh2* gene, has been carried out. The effect of bleomycin (BLM), hydrogen peroxide (H_2O_2), 2-acetylaminofluorene (2-AAF), and ethidium bromide (EB) on MSI in germline cells have been analysed. This work is relevant in understanding the possible interaction between two important determinants of carcinogenesis, such as mutagenic agents and MMR deficiencies.

2. Materials and methods

2.1. *Drosophila* stocks

Two chromosome II deficiency strains of *D. melanogaster* were used: *w;Df(2L)TE146(Z)GW7 al dp b l(2)pwn cn/CyO* (abbreviated *Df(2L)GW7/CyO*) and *Df(2L)b80e3/CyO*. These strains were kindly provided by Carlos Flores (Laboratory of Genetics,

University of Wisconsin, Madison). The *spell*^{-/-} flies, deficient in MMR, were obtained by crossing the two deficient stocks [31]. Offspring males of this cross were treated with different mutagens and individually crossed with one virgin offspring female. Furthermore, the *Canton-S* (*CS*) stock, maintained in our laboratory, has been used as a wild-type strain. More details on mutations and specific markers are described in Flybase [32]. The stocks were maintained in standard conditions at 25 °C and 60% of relative humidity.

2.2. Chemicals

The chemicals used were as follows: BLM (CAS no. 11056-06-79) supplied by Almirall Prodesfarma; H_2O_2 (CAS no. 7722-84-1), 30% solution (v/v) supplied by Alco (Montcada i Reixac, Barcelona, Spain); 2-AAF (CAS no. 53-96-3) and EB (CAS no. 1239-45-8) supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA).

BLM and EB were dissolved in double-distilled water, 2-AAF was dissolved in an aqueous solution containing 1% Tween 80 and 3% ethanol, and H_2O_2 was dissolved in K_2HPO_4 15 mM (pH 7.2). Sucrose (5%) was added to all the solutions, to stimulate flies to ingest the product.

2.3. Treatment procedure

The *spell*^{-/-} males (2–3-day-old) (obtained by crossing the deficient stocks, *Df(2L)GW7/CyO* and *DF(2L)b80e3/CyO*) were treated by feeding for 48 h; except for the treatment with 2-AAF that, due to the high toxicity found at 48 h, treatment was carried out for only 24 h. Previous to the treatment, flies were submitted to 3–4 h of starvation and, after that transferred to special glass filter feeding units (1D3, Scott, Mainz, Germany) containing the desired solution of mutagens. Immediately after treatment, the treated *spell*^{-/-} males were mated individually with one *spell*^{-/-} virgin female. They were allowed to lay eggs for 3 days and then the parents were removed and kept at -80 °C. Thereafter, the progeny of about 10 pairs (lines) was collected and the microsatellite loci were analysed both in parental and progeny flies. Using this design, all the analysed progeny comes from treated spermatozoa. The same experimental design was followed when *CS* flies were used in the analysis.

All the chemical solutions were prepared immediately prior to treatment, using the concentrations that reduce the viability about 50%. We used the following concentrations: BLM 10 $\mu\text{g/ml}$, H_2O_2 3%, 2-AAF 1 mM and EB 5 mM. For the H_2O_2 treatment, the solution was changed every 12 h to guarantee the concentration of the product throughout the 48 h.

2.4. Genomic DNA isolation

Parental male and female as well as their offspring were collected for each crossed pair and kept at -80°C . The frozen flies were used for individual genomic DNA extraction, following the method described by Roberts [33]. Finally, the DNA was dissolved in 20–30 μl of double-distilled water.

2.5. Microsatellite analysis

In all, 25 μl of PCR reaction was prepared, using 1 μl of the genomic DNA stock solution ($\sim 50\text{ ng}$ of DNA) in $1 \times$ PCR reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl pH 8.4, 0.01% gelatin), 2.5–4 mM MgCl_2 , 125 μM of each dNTP, 3 μCi of either $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ or $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dCTP}$, 1 U of Taq DNA polymerase and 0.25 μM of each primer. The reaction was performed with a pre-incubation step of 94°C 3 min, followed for 30 cycles of 94°C 30 s, $55\text{--}58^\circ\text{C}$ 30 s and 72°C 1 min, and a final extension step of 72°C 5 min, using a Thermocycler PT-100 (MJ Research, USA). PCR products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gels (2 h at 45 W) and visualised by autoradiography.

The primers used to amplify the microsatellite loci were described by Schug et al. [34] and are as follow: *Dronanos*, 5'-CGCAAGTATTCATTCAACACA-3' and 5'-TGCTGGCGTTGTTTCAT-3'; *Droabdb*, 5'-TTCCAAGTCACACGGACGGG-3' and 5'-GCA-CACCGACAACACAAG-3'; *Dmsgg3*, 5'-TCCAGCA-ATCACAGCAAAC-3' and 5'-TCTTTTGAAATTG-CGGTTGA-3'; *Mam*, 5'-GGCGGCCTACCAGTTTT-CCA-3' and 5'-CCTGTTGCTCCCAGGTTTGC-3'; and *DmtenA*, 5'-CTCTTAGTGCGCAGGGATTC-3' and 5'-GAGTCGCTCAATGGCAGGC-3'.

The criteria used to identify germline mutations were as follows: for any microsatellite, when the parents shown the same microsatellite band, the presence in the offspring of a new band was scored as a

mutagenic event. In the cases where the parents shown two microsatellite bands, the pattern for mutation corresponds to the loss of a parental band together with the presence of a new band in the offspring.

Fisher's exact test, two-tailed, was used for the statistical analysis. The frequency of MSI was estimated from the number of individuals that present changes over the total number of analysed individuals. Alterations for each line was computerised separately and, when more than two individuals showed the same alteration, only one alteration was counted. Exceptionally, if five or more individuals, emerging from the same line, showed the same alteration, we considered it as two alterations. This criteria discards the possibility of overestimating the number of alterations, when some of the offspring came from the same pre-meiotic event.

3. Results and discussion

The main purpose of the present work was to determine whether MSI in MMR-deficient conditions was modulated by chemical mutagens. To carry out the analysis of MSI in *Drosophila*, we chose three di- and two tri-nucleotide repeat loci that were previously described [34]. We analysed five microsatellite loci according to the recommendations of the National Cancer Institute for the determination of MSI in colorectal cancer [35,36].

3.1. Spontaneous germline MSI in a mismatch repair-deficient strain compared with a control strain

Data obtained from the control experiments, carried out at the same time as the treatment experiments, allowed us to compare the degree of stability of the microsatellite sequences depending on the MMR genetic background. The total number of F1 flies analysed for each locus came from 30 lines established from the *spell* stock, and 10 lines of *CS*. The analysis was carried out with about 10 flies per line. The 30 *spell* lines correspond to the sum of all the concurrent control lines set up for each type of treated line. For each microsatellite locus, the analysis of F1 control flies were computed together, except for the *DmtenA* locus, where significant differences were

Table 1
Spontaneous microsatellite instability in germline cells of *CS* and *spell* strains^a

Microsatellite loci	<i>CS</i> ^b	<i>spell</i> ^{-/-}
<i>DmtenA</i> (AT) ₁₄	0/99 (0.00)	10/148 (6.75) ^c
<i>Droabdb</i> (AC) ₁₉	0/100 (0.00)	6/353 (1.70) ^d
<i>Dronanos</i> (AT) ₁₈	0/100 (0.00)	16/276 (5.80) ^d
<i>Mam</i> (CAG) ₈	0/99 (0.00)	21/273 (7.69) ^d
<i>Dmsgg3</i> (CAG) ₁₁	0/99 (0.00)	6/277 (2.17) ^d

^a The frequency of instability, at each locus, was calculated from the number of individuals displaying alterations over the total number of analysed individuals. Frequency value in percent is in parenthesis.

^b MSI data of individuals analysed from the control of the bleomycin treatment.

^c MSI data of individuals analysed from the control of the bleomycin and ethidium bromide treatment.

^d MSI data of individuals analysed from the controls of the different treatments carried out.

found between sets of controls. To calculate the frequency of microsatellite alterations, corrections for those mutational outcomes that could have a common origin were introduced (see Section 2).

As shown in Table 1, and as it has been described before, an obvious consequence of the MMR deficiency is the MSI phenotype. Under our experimental conditions, when MMR processes were defective, in the first generation we already found alterations in the five microsatellite sequences studied, whereas no alterations were found in the MMR-proficient background (Table 1). In our control experiment using the *CS* flies, the size of the sample is not big enough to calculate a spontaneous mutation rate at microsatellite loci; however, in previous studies reported in the literature an average rate of 6×10^{-6} changes per generation has been described [37,38]. From the control experiments carried out with *spell* flies, and according with others studies about MSI, we observe that the instability of repeated sequences depend on this locus (see Table 1). We have calculated the average microsatellite mutation rate in the *msh2*-null mutant, being of 4×10^{-2} changes per locus per generation. Previous studies have shown a high degree of MSI in mismatch repair-deficient background in yeast, *Drosophila*, mice and human cells [31,39–44]. In addition, the MSI frequency reported in vivo, analysing either somatic or germ cells, has the same order of magnitude as our observations [31,44]. In

MMR cells, the accumulation of MSI is believed to occur due to a failure in correcting replication errors taking place during normal replication processes [35,45]; and, hence, similar mechanisms generating MSI in somatic and germline cells maybe expected [46,47].

As far as we know, our results with *Drosophila*, together with the previous reported by Flores and Engels [31], are the unique experimental observations described about MSI in germ cells, under MMR deficiency. In the course of characterisation of the *spell* flies, these authors reported microsatellite alterations arising during 10–12 generations. Here we show that, analysing approximately the same number of individuals by locus that in the Flores and Engels experiments, one generation is enough to see the great effect of the mutated *msh2* gene on the microsatellite stability in germ cells. Therefore, the studies carried out with the *Drosophila spell* mutant, offer a unique possibility to obtain information about the mutation rate on microsatellite loci in the germline under MMR deficiency. Moreover, to include heterozygous individuals in the analysis could be of special relevance, due to the fact that most cases of HNPCC are caused by an inherited mutant allele of the MMR genes. In this context, Flores and Engels [31] data suggest that a single *spell* allele could be enough to produce some degree of MSI.

3.2. Effect of chemical mutagens in MSI

Induction of microsatellite mutations by the agents BLM and H₂O₂, known to produce reactive oxygen radicals, was evaluated. Table 2 indicates that BLM did not produce alteration in the repeated sequences analysed under MMR-proficient conditions (*CS* strain). The effect of BLM under MMR deficiency (*spell* strain) is not conclusive, since only alterations in the locus *Droabdb* were observed ($P = 0.03$ and $P = 0.007$, respect to the concurrent control and total control, respectively). This marginal effect could be considered as an induction of low MSI [35], although more microsatellite loci should be studied to confirm this assumption. In addition, treatment of *spell* flies with H₂O₂ had no mutagenic effect in the two repeated sequences analysed. Recently, several authors have reported that oxidative damage produces MSI in bacteria and human cells [11–13]; moreover, mice and

Table 2
Microsatellite instability in *CS* and *spell* strains after treatment of adult males with different mutagens^a

Strain	Treatment		Microsatellite loci				
			<i>DmtenA</i> (AT) ₁₄	<i>Droabdb</i> (AC) ₁₉	<i>Dronanos</i> (AT) ₁₈	<i>Mam</i> (CAG) ₈	<i>Dmsgg3</i> (CAG) ₁₁
<i>CS</i>	BLM	Control	0/99 (0.00)	0/100 (0.00)	0/100 (0.00)	0/99 (0.00)	0/99 (0.00)
		10 µg/ml	0/80 (0.00)	0/97 (0.00)	0/97 (0.00)	0/89 (0.00)	0/75 (0.00)
<i>spell</i> ^{-/-}	BLM	Control	10/148 (6.75)	4/198 (2.02)	14/197 (7.11)	16/195 (8.20)	3/195 (1.54)
		10 µg/ml	4/104 (3.85)	8/104 (7.70) ^{b,c}	2/105 (1.90)	8/102 (7.84)	1/93 (1.97)
	H ₂ O ₂	Control	0/98 (0.00)	1/87 (1.15)	ND	ND	ND
		3%	2/91 (2.20)	1/76 (1.32)	ND	ND	ND
	2-AAF	Control	0/79 (0.00)	1/68 (1.50)	2/79 (2.53)	5/78 (6.41)	3/82 (3.66)
		1 mM	7/100 (7.00) ^b	0/91 (0.00)	5/100 (5.00)	9/100 (9.00)	0/99 (0.00)
	EB	Control	10/148 (6.75)	4/198 (2.02)	14/197 (7.11)	16/195 (8.20)	3/195 (1.54)
		5 mM	4/98 (4.08)	0/100 (0.00)	ND	ND	ND
	Total control ^d	–	–	6/353 (1.70)	16/276 (5.80)	21/273 (7.69)	6/277 (2.17)

^a The frequency of instability, at each locus, was calculated from the number of individuals displaying alterations over the total number of analysed individuals. Frequency value in percent is in parenthesis.

^b $P < 0.05$ relative to the concurrent control (Fisher's exact test, two-tailed).

^c $P < 0.05$ relative to the total control (Fisher's exact test, two-tailed).

^d MSI pooled data of individuals analysed from the controls of the different treatments. For the microsatellite *DmtenA* this data is not shown due to the significant difference between these controls.

human MMR-deficient cells are prone to the mutagenic effect of oxidative stress, including frameshift mutations in repeated sequences [19,26]. The lack of effect of BLM and H₂O₂ in MSI found in our experiments contrast with the emerging information cited above. Most of the former studies were carried out using in vitro systems with selective methods for MSI analysis, which allow to detect lower mutation frequencies than the in vivo system used in our experiments. Therefore, in order to compare the different experiments and evaluate the effect of chemical mutagens in MSI, the experimental conditions should be considered. Likewise, we cannot discard the possibility of oxidative stress producing hypersensitivity to other genetic endpoints different from MSI in MMR-deficient flies. Radiation exposure of mouse embryonic stem cells and treatment of human cells with H₂O₂, both deficient in MMR, has been shown to produce accumulation of oxidative bases [19,26], which could lead to different types of damage.

DNA adducts produced by 2-AAF are well documented [48] and these when are not repaired, can produce frameshift mutations in short repeated sequences [49–51]. Our previous in vivo studies carried out with *Drosophila* show that 2-AAF does not induce either

genomic instability or MSI in MMR-proficient flies [52]. In this report, we extend the analysis of the effect of 2-AAF in MSI using MMR-deficient flies. We found that the treatment with 2-AAF increases significantly the number of alterations in the microsatellite *DmtenA* ($P = 0.043$, respect to the concurrent control), but no alterations were found in the remainder microsatellites analysed. Most of the 2-AAF lesions are mainly repaired by excision repair processes [48], although evidences that mismatch repair proteins recognise this type of DNA adducts has also been reported [16]. In this context, we can hypothesise that, in our experimental conditions, the damage induced by 2-AAF is repaired by the normal excision repair in the *spell* flies, thus, no adducts prone to generate frameshifts during replication persist in the genome.

Finally, the DNA intercalating agent EB shows no effect in altering microsatellite sequences. Thus, although mutagenic effects of EB have been reported ([53] and references therein), its effect in MSI is unknown.

As a summary, this study shows that the *Drosophila spell* mutant, deficient in MMR, could be a valuable system to identify those environmental mutagens that

could interact with defective MMR, in vivo, to produce genomic instability with contribution in human cancer.

Acknowledgements

We thank Carlos Flores (Laboratory of Genetics, University of Wisconsin, Madison) for providing the deficiency *Drosophila* stocks used to generate the *spell*^{-/-} flies, Anna Peran for her technical assistance and Dr. D.J. Roberts (Almirall-Prodesfarma) for supplying the bleomycin. This work has been supported by the Spanish Ministry of Education and Culture (PM99-0067, DGICYT; BOS2000-0329, DGICYT). During this work, A. López held a doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Culture.

References

- [1] F.S. Leach, N.C. Nicolaidis, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L.A. Aaltonen, M. Nystrom, Mutations of a MutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Cell* 75 (1993) 1215–1225.
- [2] C.E. Bronner, S.M. Baker, P.T. Morrison, G. Warren, L.G. Smith, M.K. Lescoe, M. Kane, C. Earabino, J. Lipford, A. Lindblom, P. Tannergard, R.J. Bollog, A.R. Godwin, D.C. Ward, M. Nordenskjold, R. Fishel, R. Kolodner, R.M. Liskay, Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer, *Nature* 368 (1994) 258–261.
- [3] A. Hemminki, P. Peltomaki, J.-P. Mecklin, H. Jarvinen, R. Salovaara, M. Nystrom-Lahti, A. de la Chapelle, L.A. Aaltonen, Loss of the wild type *MLH1* gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Nat. Genet.* 8 (1994) 405–410.
- [4] K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell* 87 (1996) 159–170.
- [5] H.T. Lynch, T. Smyrk, J.F. Lynch, Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management HNPCC (Lynch syndrome), *Int. J. Cancer* 69 (1996) 38–43.
- [6] V.J. Bubb, L.J. Curtis, C. Cunningham, M.G. Dunlop, A.D. Carothers, R.G. Morris, S. White, C.C. Bird, A.H. Wyllie, Microsatellite instability and the role of *hMSH2* in sporadic colorectal cancer, *Oncogen* 12 (1996) 2641–2649.
- [7] S. Senba, F. Konishi, T. Okamoto, H. Kashiwagi, K. Kanazawa, M. Miyaki, M. Konishi, T. Tsukamoto, Clinicopathologic and genetic features of non-familial colorectal carcinomas with DNA replication errors, *Cancer* 82 (1998) 279–285.
- [8] A.L. Jackson, R. Chen, L.A. Loeb, Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 12468–12473.
- [9] T.A. Brentnall, R. Chen, J.G. Lee, M.B. Kimmey, M.P. Bronner, R.C. Haggitt, K.V. Kowdley, L.M. Hecker, D.R. Byrd, Microsatellite instability and *K-ras* mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis, *Cancer Res.* 55 (1995) 4264–4267.
- [10] T.A. Brentnall, D.A. Crispin, M.P. Bronner, S.P. Cherian, M. Hueffed, P.S. Rabinovitch, C.E. Rubin, R.C. Haggitt, C.R. Boland, Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis, *Cancer Res.* 56 (1996) 1237–1240.
- [11] A.L. Jackson, L.A. Loeb, Microsatellite instability induced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.* 447 (2000) 187–198.
- [12] S. Zienolddiny, D. Ryberg, A. Haugen, Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines, *Carcinogenesis* 21 (2000) 1521–1526.
- [13] S. Zienolddiny, D.H. Svendsrud, D. Ryberg, A.B. Mikalsen, A. Haugen, Nickel(II) induces microsatellite mutations in human lung cancer cell lines, *Mutat. Res.* 452 (2000) 91–100.
- [14] W.Y. Feng, E.H. Lee, J.B. Hays, Recombinogenic processing of UV-light photoproducts in nonreplicating phage DNA by the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system, *Genetics* 129 (1991) 1007–1020.
- [15] P. Karran, M. Bignami, Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage, *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 2933–2940.
- [16] L. Guo-Min, H. Wang, L.J. Romano, Human MutS specifically binds to DNA containing aminofluorene and acetylaminofluorene adducts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24084–24088.
- [17] M.T. Hawn, A. Umar, J.M. Carethers, G. Marra, T.A. Kunkel, C.R. Boland, M. Koi, Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint, *Cancer Res.* 55 (1995) 3721–3725.
- [18] A. Nehmé, R. Baskaran, S. Aebi, D. Fink, S. Nebel, B. Cenni, J.Y. Wang, S.B. Howell, R.D. Christen, Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin, *Cancer Res.* 57 (1997) 3253–3257.
- [19] X. Lin, K. Ramamurthi, M. Mishima, A. Kondo, S.B. Howell, p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide, *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 1222–1229.
- [20] A. Kat, W.G. Thilly, W. Fang, M.J. Longley, G. Li, P. Modrich, An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 6424–6428.
- [21] P. Branch, G. Aquilina, M. Bignami, P. Karran, Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage, *Nature* 362 (1993) 652–654.
- [22] M. Koi, A. Umar, D.P. Chauhan, S.P. Cherian, J.M. Carethers, T.A. Kunkel, C.R. Boland, Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous *hMLH1* mutation, *Cancer Res.* 54 (1994) 4308–4312.
- [23] N. de Wind, M. Dekker, A. Berns, M. Radman, H. de Riele, Inactivation of the mouse *Msh2* gene results in mismatch

- repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination and predisposition to cancer, *Cell* 82 (1995) 321–330.
- [24] I. Mellon, D.K. Rajpal, M. Koi, C.R. Boland, G.N. Champe, Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes, *Science* 272 (1996) 557–560.
- [25] J.A. Fritzell, L. Narayanan, S.M. Baker, C.E. Bronner, S.E. Andrew, T.A. Prolla, A. Bradley, F.R. Jirik, R.M. Liskay, P.M. Glazer, Role of DNA mismatch repair in the cytotoxicity of ionizing radiation, *Cancer Res.* 57 (1997) 5143–5147.
- [26] T.L. de Weese, J.M. Shipman, N.A. Larrier, N.M. Buckley, L.R. Kidd, J.D. Groopman, R.G. Cutler, H. te Riele, W.G. Nelson, Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective *Msh2* alleles responded abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 11915–11920.
- [27] D.A. Anthony, A.J. McIlwraith, W.M. Gallagher, A.R. Edlin, R. Brown, Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells, *Cancer Res.* 56 (1996) 1374–1381.
- [28] J.T. Drummond, D.A. Anthony, R. Brown, P. Modrich, Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutLa and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 19645–19648.
- [29] D. Fink, S. Nebel, S. Aebi, H. Zheng, B. Cenni, A. Nehme, R.D. Christen, S.B. Howell, The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance, *Cancer Res.* 56 (1996) 4881–4886.
- [30] X. Lin, S.B. Howell, Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin, *Mol. Pharmacol.* 56 (1999) 390–395.
- [31] C. Flores, W. Engels, Microsatellite instability in *Drosophila spellchecker 1* (MutS homolog) mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 2964–2969.
- [32] Flybase, The Flybase database of the *Drosophila* Genome Projects and community literature, *Nucl. Acids Res.* 27 (1999) 85–88 (available from <http://flybase.bio.indiana.edu/>).
- [33] D.B. Roberts, *Drosophila*, A practical Approach, IRLH Press, Oxford, 1986.
- [34] M.D. Schug, K.A. Witterstrand, M.S. Gaudette, R.H. Lim, C.M. Hutter, C.F. Aquadro, The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Ecol.* 7 (1998) 57–70.
- [35] C.R. Boland, S.N. Thibodeau, S.R. Hamilton, D. Sindransly, J.R. Eshleman, R.W. Burt, S.J. Meltzer, M.A. Rodríguez-Bigas, R. Fodde, G.N. Ranzani, S. Srivastava, A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer, *Cancer Res.* 58 (1998) 5248–5257.
- [36] Y. Maehara, S. Oda, K. Sugimachi, The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability, *Mutat. Res.* 461 (2001) 249–263.
- [37] M.D. Schug, T.F.C. Mackay, C.F. Aquadro, Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Genet.* 15 (1997) 99–102.
- [38] C. Schlötterer, R. Ritter, B. Harr, G. Brem, High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates, *Mol. Biol. E* 15 (1998) 1269–1274.
- [39] M. Strand, T.A. Prolla, R.M. Liskay, T.D. Petes, Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair, *Nature* 365 (1993) 274–276.
- [40] E.A. Sia, R.J. Kokoska, M. Dominska, P. Greenwell, T.D. Petes, Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 2851–2858.
- [41] R.D. Kolodner, Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 397–401.
- [42] M. Perucho, Cancer of the microsatellite mutator phenotype, *Biol. Chem.* 377 (1996) 675–684.
- [43] T.A. Prolla, S.M. Baker, A.C. Harris, J.-L. Tsao, X. Yao, C.E. Bronner, B. Zheng, M. Gordon, J. Reneker, N. Arnheim, D. Shibata, A. Bradley, R.M. Liskay, Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1 Pms1, and Pms2 DNA mismatch repair, *Nat. Genet.* 18 (1998) 276–279.
- [44] X. Yao, A.B. Buermeier, L. Narayanan, D. Tran, S.M. Baker, T.A. Prolla, P.M. Glazer, R.M. Liskay, N. Arnheim, Different mutator phenotypes in *Mlh1*-versus *Pms2*-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 6850–6855.
- [45] P. Modrich, R. Lahue, Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 101–133.
- [46] A. di Rienzo, P. Donnelly, C. Toomajian, B. Sisk, A. Hill, M.L. Petzl-Erler, G.K. Haines, D.H. Barch, Heterogeneity of microsatellite mutations within and between loci, and implications for human demographic histories, *Genetics* 148 (1998) 1269–1284.
- [47] R. Sturzeneker, R.A. Bevilacqua, L.A. Haddad, A.J. Simpson, S.D. Pena, Microsatellite instability in tumors as a model to study the process of microsatellite mutations, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 347–352.
- [48] R.F. Heflich, R.E. Neft, Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites, *Mutat. Res.* 318 (1994) 73–114.
- [49] R. Bintz, R.P.P. Fuchs, Induction of 2-frameshift mutations within alternating GC sequences by carcinogens that bind to the C8 position of guanine residues: development of a specific mutation assay, *Mol. Gen. Genet.* 221 (1990) 331–338.
- [50] I.O. Hiroaki, H. Kimura, M. Koya, H. Higuchi, T. Kato, *N*-acetoxy-*N*-acetyl-2-aminofluorene-induced mutation spectrum in a human *hprt* cDNA shuttle vector integrated into mammalian cells, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2245–2250.
- [51] E.W. Vogel, M.J. Nivard, L.A.B. Ballering, H. Bartsch, A. Barbin, J. Nair, M.A. Comendador, L.M. Sierra, I. Aguirrezabalaga, L. Tosal, L. Ehrenberg, R.P.P. Fuchs, R. Janel-Bintz, G. Maenhaut-Michel, R. Montesano, J. Hall, H. Kang, M. Miele, J. Thomale, K. Bender, J. Engelbergs, M.F. Rajewsky, DNA damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implications of structure–activity relation-

- ships for cross-species extrapolation, *Mutat. Res.* 113 (1996) 177–218.
- [52] A. López, N. Xamena, O. Cabré, A. Creus, R. Marcos, A. Velázquez, Analysis of genomic damage in the mutagen-sensitive *mus-201* mutant of *Drosophila melanogaster* by arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting, *Mutat. Res.* 435 (1999) 63–75.
- [53] M.D. Ferrés, P. Alba, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, Induction of male recombination in *Drosophila melanogaster* by chemical treatment, *Mutat. Res.* 126 (1984) 245–250.