

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

PEDECIBA – AREA BIOLOGÍA

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN GENÉTICA

Localización del Daño Genético:

Modulación por la Estructura y Dinámica Nuclear

Pablo Liddle Ríos

Departamento de Genética

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientador: Dr. Gustavo A. Folle

Co-orientadora: Dra. Maria Vittoria Di Tomaso

Tribunal:

Dra. Cristina Mazzella

Dra. Silvia Olivera

Dra. Yanina Panzera

Diciembre 2012

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo Folle y Dra. María Vittoria Di Tomaso por haber aceptado dirigir esta tesis, guiarme durante su desarrollo así como contribuir al análisis crítico de la misma.

A mis compañeros del Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) por el apoyo brindado. A Laura Lafon por sus aportes en el área de procesamiento de imágenes.

Al Dr. Steffen Härtel y sus colaboradores del *Laboratory for Scientific Image Analysis* (Universidad de Chile) por introducirme con dedicación a las metodologías de procesamiento y análisis de imágenes. Al programa de Pasantías regionales para jóvenes investigadores de AMSUD-PASTEUR por su apoyo para la realización de una estadía en dicho laboratorio.

Al Dr. Thomas Cremer y sus colaboradores del Departamento de Genética Humana del *Biozentrum* de la *Ludwig-Maximilians-Universität* (Munich, Alemania) por el entrenamiento en diversas metodologías y en el uso de equipamiento novedoso. Al Dr. Gustavo Folle por brindarme la posibilidad de llevar a cabo estadías en este laboratorio y a la fundación Alexander von Humboldt (*AvH Stiftung*) por haber financiado las mismas así como su extenso apoyo en reactivos.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por permitirme participar del programa.

A las Dras. Cristina Mazzella, Silvia Olivera y Yanina Panzera por haber aceptado realizar la evaluación de esta tesis y contribuir con sus aportes a la misma.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cromatina	1
1.1.1 Heterocromatina y Eucromatina	1
1.1.2 Tipos de Heterocromatina	1
1.1.3 Modificaciones epigenéticas de las histonas y metilación del ADN	2
1.1.4 Arquitectura Nuclear y Territorios Cromosómicos	4
1.2 Replicación de los compartimientos de eu- y heterocromatina	7
1.3 Daño Genético	11
1.3.1 Rupturas de doble cadena en el ADN	11
1.3.2 Bleomicinas	12
1.3.2.1 Estructura molecular	12
1.3.2.2 Mecanismos de inducción de daño en el ADN	13
1.3.3- <i>Foci</i> de γ H2AX	15
1.3.3.1 Características	15
1.3.3.2 Detección de <i>foci</i> de γ H2AX	18
1.3.4 Estructura de la cromatina y daño genético	19
1.3.5 Replicación, transcripción y daño genético	20
1.4 Microscopía Confocal y Análisis de Imágenes	21
1.4.1 Procesamiento de imágenes	22
1.4.1.1 Filtrado	22
1.4.1.2 Deconvolución	23
1.4.2 Colocalización	24
1.4.2.1 Definición de colocalización	24
1.4.2.2 Estimación de la colocalización	24
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo General	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Propagación de los cultivos celulares y tratamiento con Bleomicina	28
4.2 Inmunodetección de γ H2AX y ser5P-ARN Pol II en núcleos interfásicos	28
4.3 Identificación de células en fase S por incorporación de EdU e inmunodetección de γ H2AX y H3K4me ₃ en núcleos interfásicos	28
4.4 Obtención de imágenes por Microscopía Confocal	29
4.5 Procesamiento y análisis de las imágenes	31
4.5.1 Núcleos de CH09 inmunomarcados para γ H2AX/ser5P-ARN Pol II	31
4.5.1.1 Renombramiento de los archivos	32

4.5.1.2	Deconvolución	32
4.5.1.3	Segmentación	32
4.5.1.4	Estimación de Daño y ensayos de Colocalización	35
4.5.2	Núcleos de CHO9 con incorporación de EdU e innumeración de γ H2AX/H3K4me ₃	37
4.5.2.1	Procesamiento	37
4.5.2.2	Clasificación de los núcleos en fases G1/G2, ES y LS	38
4.5.2.3	Evaluación de daño total y cromatina replicante en núcleos control y tratados	39
4.5.2.4	Análisis de Colocalización	39
4.5.2.5	Análisis Estadísticos	42
5.	RESULTADOS	43
5.1	Núcleos de CHO9 inmunomarcados para γ H2AX/ser5P-ARN Pol II	43
5.1.1	Deconvolución, segmentación y determinación de ROI en los <i>stacks</i> de imágenes	43
5.1.2	Determinación de nivel de daño y colocalización entre <i>foci</i> de γ H2AX y <i>foci</i> de ser5P-ARN Pol II	47
5.2	Núcleos de CHO9 con incorporación de EdU e inmunomarcación de γ H2AX/H3K4me ₃	52
5.2.1	Porcentaje de cromatina replicante en regiones de eucromatina en núcleos ES y LS (tratados y controles)	52
5.2.2	Evaluación de daño total y fracción de cromatina replicante en núcleos control y tratados	55
5.2.3	Análisis de colocalización entre cromatina dañada y cromatina replicante	56
5.2.3.1	Cálculo del ICQ	56
5.2.3.2	Determinación de áreas de solapamiento en máscaras binarias	60
5.2.4	Análisis de colocalización entre cromatina dañada y eucromatina	64
5.2.4.1	Cálculo del ICQ	64
5.2.4.2	Determinación de áreas de solapamiento en máscaras binarias	66
6.	DISCUSIÓN	73
6.1	Nivel de daño en núcleos control y tratados con BLM	74
6.2	Relación entre cromatina dañada y cromatina potencialmente activa	76
6.3	Relación entre cromatina dañada y eucromatina	77
6.4	Relación entre cromatina dañada y cromatina replicante	78
7.	CONCLUSIONES	82
8.	PERSPECTIVAS	84
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ABREVIATURAS

AC	Aberración cromosómica
ADNsh	ADN simple hebra
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN Pol II	ARN polimerasa II
BLM	Bleomicina
BrdU	Bromo-2'-deoxiuridina
CDA	<i>Confined Displacement Algorithm</i>
CI	Compartimiento intercromatínico
EC	Eucromatina
EdU	5-etinil-2'-deoxiuridina
ES	Fase S temprana
HC	Heterocromatina
HCC	Heterocromatina constitutiva
HCF	Heterocromatina facultativa
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
HR	Recombinación homóloga
ICA	<i>Intensity Correlation Algorithm</i>
ICCB	Coficiente basado en correlación de intensidad
ICQ	<i>Intensity Correlation Quotient</i>
LS	Fase S tardía
MS	Fase S media
NHEJ	Reparación por reasociación no homóloga
ORC	Complejo de reconocimiento del origen
ORI	Origen de replicación
PDF	<i>Probability density function</i>
PDM	Producto de las diferencias respecto a las medias
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PMT	Fotomultiplicador
pre-IC	Complejo de pre-iniciación
pre-RC	Complejo de pre-replicación
PSF	<i>Point spread function</i>
RDC	Ruptura de doble cadena
RI	Radiación ionizante
RIDGE	<i>Region of increased gene expression</i>
ROI	Región de interés
RSC	Ruptura de simple cadena
RTD	<i>Replication timing domain</i>
Ser2P-ARN Pol II	ARN polimerasa II fosforilada en serina 2
Ser5P-ARN Pol II	ARN polimerasa II fosforilada en serina 5
SNR	Cociente señal-ruido
TC	Territorio cromosómico
TTR	<i>Timing transition región</i>

PUBLICACIONES REALIZADAS EN EL MARCO DEL DESARROLLO DE LA TESIS

Capítulos de libros

1) "Chromatin damage patterns shift according to eu/heterochromatin replication"

Di Tomaso MV, Liddle P, Lafon-Hughes L, Reyes-Ábalos AL, Folle GA

En: "The mechanism of DNA replication" Stuart D (Ed.), Intech, Canada (en prensa)

2) "Nuclear architecture, chromosome aberrations, and genetic damage"

Folle GA, Di Tomaso MV, Lafon-Hughes L, Liddle P

En: "Interphase chromosomes: the biomedical aspects" Yurov Y (Ed.), Springer, Heidelberg (aceptado para publicación)

RESUMEN

Las estructuras de orden superior de la cromatina juegan un rol importante en la regulación de procesos nucleares tales como la transcripción y la replicación del ADN. En este sentido, los estados de la cromatina (eu- y heterocromatina) podrían también incidir en la sensibilidad de las células a clastógenos y/o en los mecanismos de reparación del daño genético inducido. La marcación de núcleos interfásicos de mamíferos con pulsos de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) ha evidenciado que la replicación del ADN es un proceso regulado temporal y espacialmente, siendo la eucromatina (EC) replicada en fase S-temprana (ES) y la heterocromatina (HC) en fase S-tardía (LS). La exposición a agentes inductores de rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN induce la rápida fosforilación de la variante histónica H2AX (generando γ H2AX) en una extensa región (2Mb) flanqueando la lesión, lo que permite su visualización por inmunofluorescencia como *foci* nucleares. La detección directa del daño primario en la cromatina interfásica ha permitido profundizar en el estudio de la sensibilidad de los diferentes dominios cromatínicos al daño inducido y superar las limitaciones asociadas al análisis de aberraciones cromosómicas (AC) en cromosomas mitóticos, el cual refleja el resultado del procesamiento de las lesiones realizado por las células y no el daño genético primario.

Aunque diversos autores han postulado un predominio de γ H2AX en EC, su distribución, cuando el daño genético se induce en regiones de eu- o heterocromatina replicante o en regiones potencialmente activas, no ha sido extensamente explorada. En la presente tesis hemos analizado la distribución del daño primario (*foci* de γ H2AX) inducido por el agente radiomimético bleomicina (BLM, 40 μ g/mL, 30 minutos) en núcleos interfásicos de la línea celular CHO9 en relación al estado de la cromatina (regiones eucromáticas H3K4me₃ positivas), la cromatina replicante (regiones EdU positivas) o potencialmente activa (*foci* de ser5P-ARN polimerasa II). El estudio se basó en la adquisición de imágenes de *z-stacks* por microscopía confocal y la evaluación de colocalización empleando el algoritmo CDA (en el programa SCIAN_Soft/IDL 7.0) o el algoritmo ICA y la determinación de áreas solapantes en máscaras binarias (en el programa Image J).

Por una parte, el análisis de colocalización entre *foci* de γ H2AX y *foci* de ser5P-ARN Pol II indicó la colocalización de ambas señales, sugiriendo que la cromatina potencialmente activa es más susceptible al daño inducido, posiblemente debido a su menor grado de compactación.

Por otra parte, la evaluación de colocalización entre *foci* de γ H2AX y regiones eucromáticas (H3K4me₃ positivas) evidenció un predominio del daño genético en las regiones de EC en todas las fases del ciclo celular, reforzando la hipótesis que postula a las áreas de cromatina decondensada como más susceptibles a la inducción de lesiones en el ADN. Pese a ello, el sesgo hacia regiones eucromáticas de los *foci* de γ H2AX fue diferente dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encontraban las células al ser expuestas a BLM (mayor o menor respecto a G1/G2 en ES y LS, respectivamente). En concordancia, el análisis entre *foci* de γ H2AX y regiones replicantes (EdU positivas) evidenció una colocalización del daño inducido y las regiones replicantes tanto en ES como LS. Estos resultados indican que la replicación de la eu/heterocromatina modula la distribución del daño primario, favoreciendo su localización en las regiones de cromatina en replicación durante el tratamiento con BLM. Este fenómeno podría responder al desenrollamiento local de la cromatina hasta ADN desnudo durante la replicación, incrementando el acceso de las moléculas de BLM al ADN y/o la accesibilidad de quinasas involucradas en la fosforilación de H2AX.

Asimismo, la inspección visual de las imágenes fluorescentes reveló en ambas fases una localización recurrente de los *foci* de γ H2AX en las regiones frontera entre dominios replicantes y no replicantes. Estos hallazgos podrían deberse a: 1) un fenómeno de migración de *foci* hacia factorías o *hubs* de reparación de RDC presentes en subcompartimentos nucleares especializados, ubicados en las fronteras entre dominios replicantes/no-replicantes; 2) una ubicación preferencial de las lesiones inducidas por BLM en las regiones denominadas TTR (*Timing Transitions Regions*), correspondientes a segmentos de ADN localizados entre dominios de replicación temprana y tardía, las cuales han sido postuladas como regiones del genoma particularmente sensibles al daño genético.

Nuestros resultados permiten concluir que si bien la distribución nuclear de los *foci* de γ H2AX inducidos por BLM depende de los estados de la cromatina y la replicación del ADN, podría sumarse a dicha modulación el efecto de las regiones de transición entre replicones tempranos y tardíos y/o la reparación del daño genético en factorías.

1. Introducción

1.1 Cromatina

1.1.1 Heterocromatina y Eucromatina

En eucariotas, el ADN se encuentra empaquetado dentro del núcleo en forma de un complejo nucleoproteico denominado cromatina, el cual es el resultado de la asociación del ADN genómico con proteínas histónicas y no histónicas. El nucleosoma, la unidad de repetición básica de la cromatina consiste en 146 pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de histonas, el cual contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. A este arreglo de nucleosomas regularmente espaciados en el ADN se lo conoce como fibra de 11 nm. Utilizando colorantes básicos para teñir los núcleos celulares, Emil Heitz [1928] advirtió que podían distinguirse dos tipos diferentes de cromatina en las células eucariotas: la eucromatina (EC) y la heterocromatina (HC). Heitz definió la HC como las regiones densas del núcleo que mantenían su condensación durante la interfase, mientras que consideró EC a aquellas regiones nucleares que se decondensaban rápidamente al culminar la mitosis. Estos diferentes tipos de cromatina se encuentran mucho mejor caracterizados actualmente: las regiones de HC presentan una conformación mucho más compacta (definido por la accesibilidad a ADNasa I y enzimas de restricción), replican tardíamente durante la fase S y poseen, en general, muy bajo (o nulo) nivel transcripcional. En contraste, las regiones de EC se encuentran relativamente decondensadas y accesibles a las nucleasas, son ricas en genes activos y replican tempranamente durante la fase S [Cheung & Lau 2005].

1.1.2 Tipos de Heterocromatina

Existen 2 tipos de HC: la HC constitutiva (HCc) y la HC facultativa (HCf). La HCc es un componente habitual de los genomas eucariotas (30% en humanos y *D. melanogaster* y hasta un 90% en ciertos nemátodos) la cual está formada por un tipo particular de ADN, denominado ADN satélite. Este consiste en un gran número de repetidos cortos en tándem, que pueden estar interrumpidos por elementos transponibles. Estas secuencias repetidas son altamente polimórficas presentando poca similitud entre especies. A nivel citológico, la mayoría de la HCc se observa en las regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas [Dillon 2004].

La HCc es estable, conservando sus propiedades heterocromáticas durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos. También se caracteriza por un nivel reducido de recombinación meiótica, tendencia a formar agregados durante la interfase y represión de

genes eucromáticos cuando se encuentran en su cercanía (efecto de variegación por posición). Asimismo, se ha sugerido que la repetición en tándem de las secuencias de ADN satélite puede ser suficiente para dirigir *per se* la formación de HC debido a su capacidad para plegarse sobre sí mismas [Grewal & Jia 2007]. En estas regiones, tanto en humanos como en *D. melanogaster*, se han detectado algunos genes que podrían tener una regulación diferente a los localizados en la EC pues son reprimidos al ser reubicados en un entorno eucromático como consecuencia de reordenamientos cromosómicos [Corradini *et al.* 2007; Dimitri *et al.* 2009].

La HCf se halla constituida por ADN silenciado cuyos genes pueden ser activados durante el desarrollo o en determinados tipos celulares. De esta forma, la HCf se ensambla únicamente cuando es necesario silenciar genes en forma estable pero retiene el potencial para interconvertirse entre HC y EC. Uno de los ejemplos mejor caracterizados de HCf es la inactivación, en forma aleatoria durante una etapa temprana de la embriogénesis, de uno de los cromosomas X en hembras de mamíferos, generándose una región (cuerpo de *Barr*) visiblemente condensada dentro del núcleo. Usando métodos de tinción citológicos, la HCf puede ser indistinguible de la HCc (cromosoma X inactivo) o puede asemejarse a la EC en regiones específicas del núcleo. Los agrupamientos de HCf varían en tamaño y pueden comprender desde cromosomas enteros (X inactivo) hasta unos pocos pares de bases (pb) en promotores de genes silenciados dentro de una región genómica particular [Trojer & Reinberg 2007].

En mamíferos los diferentes tipos de cromatina pueden ser observados en cromosomas metafásicos mediante técnicas de bandeo. A este respecto, el bandeo C permite identificar las regiones de HCc mientras que los bandeos diferenciales (G- ó R-) permiten visualizar las regiones de HCf (bandas G+) y de EC (bandas R+) [Holmquist & Ashley 2006].

1.1.3 Modificaciones epigenéticas de las histonas y metilación del ADN

Las histonas nucleosómicas pueden experimentar una serie de modificaciones post-traduccionales como resultado de procesos de acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, entre otros. Estas modificaciones ocurren generalmente en residuos aminoácidos específicos de sus extremos N-terminales, generando una gran diversidad en la estructura de los nucleosomas. El alto número de combinaciones posibles de cambios postraduccionales permite generar un amplio repertorio de señales para la regulación génica; fenómeno denominado “código de histonas”. El código de histonas influye en las estructuras cromatínicas de orden superior afectando las interacciones entre diferentes histonas y entre histonas y el ADN, ejerciendo un rol importante en la regulación

de procesos nucleares, como la replicación, transcripción, recombinación, reparación del ADN y condensación cromosómica [Kouzarides 2007].

Cada tipo de cromatina está asociada con un conjunto de modificaciones postraduccionales diferentes. Las regiones de EC están enriquecidas en histonas hiperacetiladas mientras que la HC contiene histonas predominantemente hipoacetiladas. Estos procesos de acetilación o desacetilación de histonas ocurren principalmente en las lisinas de sus dominios N-terminal, están mediados por acetil-transferasas y desacetilasas específicas y resultan esenciales para el control de la expresión génica. En ese sentido, cabe subrayar que los complejos activadores de la transcripción suelen poseer subunidades con actividad acetil-transferasa mientras que los complejos represores subunidades con actividad desacetilasa de histonas [Kouzarides 2007].

Por otra parte, la metilación de histonas en sus residuos de lisina resulta también esencial para la regulación de la expresión génica. Este proceso está mediado por metiltransferasas de histonas que tienen una gran especificidad en comparación con las acetiltransferasas y, en general, modifican una única lisina de una histona en particular. Al contrario de lo que ocurre con la acetilación, la metilación de lisinas puede estar asociada con activación o represión transcripcional. Los residuos de lisina pueden ser, mono-, di- o trimetilados generando mayor diversidad funcional en cada sitio de metilación. La trimetilación a nivel de H3K4, H3K36 ó H3K79 es propia de la EC y está casi invariablemente asociada con activación de la transcripción. Por otra parte, la trimetilación de H3K9, H3K27 y H4K20 caracteriza a la HC y está relacionada con represión transcripcional [Bartova *et al.* 2008]. A este respecto, se han utilizado anticuerpos específicos que detectan estas modificaciones epigenéticas para visualizar los dominios eu- o heterocromáticos tanto en núcleos interfásicos como cromosomas mitóticos.

La modificación de histonas mejor estudiada es la metilación de H3K9, catalizada por la metiltransferasa de histonas Suv39h. Esta modificación está implicada no sólo en el silenciamiento de genes sino también en el proceso de heterocromatización al proveer un sitio de unión para la proteína HP1 (*Heterochromatin Protein 1*). HP1 es capaz de unirse tanto a Suv39h como a H3K9 trimetilada reclutando a Suv39h para metilar nucleosomas adyacentes y propagar, de esta forma, la heterocromatización [Grewal & Jia 2007]. Dicha propagación es limitada por elementos frontera que delimitan las regiones de HC y EC, evitando así el silenciamiento de genes eucromáticos.

La transcripción de la mayoría de los genes en eucariotas es realizada por la ARN polimerasa II (ARN Pol II), la cual junto a un gran número de otras proteínas forma la maquinaria responsable de este proceso. La ARN Pol II está formada por dos subunidades

principales, RPB1 y RPB2, y 10 subunidades menores [Kimura *et al.* 2002]. El dominio C-terminal de su subunidad RPB1 comprende múltiples repetidos heptapeptídicos de la secuencia consenso YSPTSPS. Este dominio sufre modificaciones postraduccionales, incluyendo la fosforilación en sus residuos de serina 2 (Ser2P) y serina 5 (Ser5P). Diferentes estados o niveles de fosforilación reflejan etapas y eventos particulares del proceso de transcripción. La ARN Pol II es inicialmente fosforilada en serina 5 lo que posibilita su unión a los promotores de los genes mientras que la forma elongante (activa) está fosforilada también en serina 2. Al final de la transcripción, la fosforilación de la serina 5 es removida mientras que la forma ser2P-ARN Pol II se acumula en el extremo 3' de los genes [Egloff & Murphy 2008]. Estas características permiten diferenciar la cromatina potencialmente activa (rica en ser5P-ARN Pol II) de la cromatina en proceso de transcripción (rica en ser5P-ARN Pol II y ser2P-ARN Pol II).

Otro mecanismo asociado con el silenciamiento epigenético es la metilación del ADN. Este proceso ocurre específicamente en la posición C5 de los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG. Mientras que el ADN de la HCc se encuentra fuertemente metilado, la metilación es más restringida en la HCf, observándose una fuerte metilación sólo en las islas CpG localizadas en las regiones promotoras de los genes. Su efecto de silenciamiento génico está en parte mediado por el reclutamiento de desacetilasas de histonas a través de motivos de unión a ADN metilado presentes en estas proteínas así como por el reforzamiento mutuo entre la metilación de histonas y la metilación del ADN, siendo ambas requeridas para un silenciamiento génico estable y a largo plazo [Cheung & Lau 2005].

1.1.4 Arquitectura Nuclear y Territorios Cromosómicos

Dos niveles extremos de organización de la cromatina han sido verificados en los núcleos celulares de la mayoría de los eucariotas: la fibra de 11 nm nucleosomal y los territorios cromosómicos (TC). Por otra parte, ninguno de los modelos propuestos para explicar niveles de organización de la cromatina de orden superior entre estos dos niveles ha recibido una aceptación general; incluso estudios de espectroscopía electrónica han cuestionado la existencia *in vivo* de la fibra de 30 nm [Fussner *et al.* 2011].

La organización en TC durante la interfase constituye una característica básica de la arquitectura nuclear. El concepto de TC fue acuñado por Theodor Boveri en [1909], quien postuló que cada cromosoma visible durante la mitosis retenía su individualidad durante la interfase y ocupaba una región particular del volumen nuclear. Pese a ello, el concepto de TC perdió vigencia posteriormente pues la evidencia proporcionada por la microscopía electrónica sugería un desenrollamiento de los cromosomas en fibras cromatínicas entremezcladas dentro de los núcleos interfásicos, sin revelar dominios cromosómicos

individuales. De esta forma, fue ampliamente aceptada la idea de que el núcleo celular estaba compuesto de fibras y bucles de cromatina entremezclados semejando “un plato de *spaghetti*” [Cremer & Cremer 2010], concepto difundido en los textos de Biología Celular.

A comienzos de los años ´80 se obtuvieron las primeras evidencias experimentales de la existencia de TC interfásicos en experimentos de microirradiación con láser UV, los cuales permitían inducir daño en regiones definidas del núcleo celular. Los resultados mostraban que el daño no estaba distribuido aleatoriamente en muchos cromosomas sino que estaba limitado a unas pocas regiones, sugiriendo que los cromosomas debían, por tanto, estar organizados en TC [Cremer *et al.* 1982]. Asimismo, se hizo posible la detección de TC individuales en placas metafásicas y núcleos interfásicos con el desarrollo de las técnicas de hibridización *in situ*.

Si bien actualmente la disposición en territorios de los cromosomas interfásicos es aceptada como un principio básico de la organización nuclear en animales y plantas se han propuestos diferentes modelos (al menos parcialmente antagónicos) para explicar la organización interna de cada TC y la relación entre diferentes TC dentro del núcleo interfásico. El modelo TC-CI (Figura 1) plantea que los núcleos están constituidos por 2 componentes principales: los TC y el compartimento intercromatínico (CI) [Cremer & Cremer 2010]. En este modelo, los TC individuales forman una red cromatínica interconectada, la cual se encuentra asociada espacialmente con una segunda red contigua tridimensional, el CI. Los TC se formarían a partir de los denominados dominios de cromatina de orden mayor (CD, *chromatin domain*), los cuales presentan un contenido de ADN del orden de 1Mb. Estos dominios representan unidades estructurales básicas que pueden ser visualizadas durante la fase S como *foci* de replicación luego de la incorporación de análogos de timidina conjugados a fluoróforos.

El concepto de CI implica la existencia de un espacio de canales contiguos, libre de ADN, que comienza en los poros nucleares y se expande como canales y lagunas permeando los dominios cromatínicos entre TC y hacia el interior de cada uno de ellos. El CI es rico en ribonucleoproteínas y alberga *speckles* de *splicing* y una variedad de cuerpos nucleares no cromatínicos (de Cajal, PML, etc.). Estudios recientes de microscopía electrónica y nanoscópicos (por debajo del límite de Abbe) han aportado evidencias que apoyan la existencia del CI así como de una zona de cromatina decondensada (espesor menor a 200 nm) denominada región pericromatínica [Rouquette *et al.* 2010]. Esta región separa el CI de los dominios cromatínicos interiores más condensados y, según el modelo TC-CI, representa el subcompartimento nuclear principal donde ocurren los procesos de transcripción, *splicing* cotranscripcional del ARN y replicación del ADN [Rouquette *et al.* 2010].

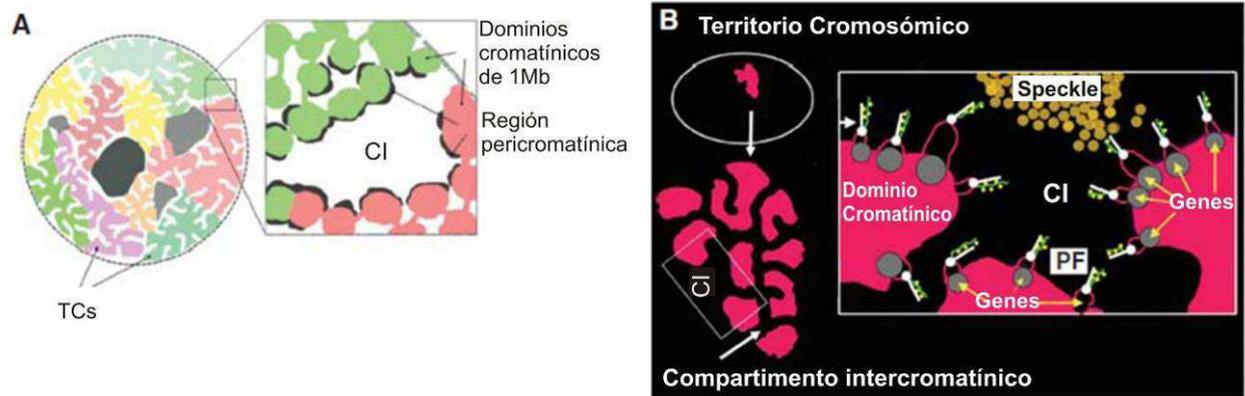


Figura 1. Modelo TC-CI de arquitectura nuclear. (A) Territorios cromosómicos, el compartimento intercromatínico y la región pericromatínica. (B) Esquema hipotético de la arquitectura funcional nuclear de acuerdo a este modelo. Los dominios cromatínicos son considerados los principales constituyentes de cada TC. El CI se expande entre estos dominios como un compartimento nuclear casi libre de ADN, conteniendo *speckles* de *splicing* y cuerpos nucleares. Durante el proceso de transcripción los genes son al menos parcialmente decondensados en la región pericromatínica localizada en la periferia de los dominios, generándose fibras pericromatínicas (PF). Cada PF porta un transcrito naciente (verde) de un gen diferente. Las moléculas de ARN Pol II se simbolizan como puntos blancos en una línea (adaptada de Cremer & Cremer 2010).

Por otra parte, el modelo de la red intercromatínica (ICN, *interchromatin network*) sugiere un entremezclado de las fibras de cromatina mucho mayor que el modelo TC-CI para explicar la región de solapamiento relativamente extensa observada entre TC vecinos [Branco & Pombo 2006]. El mismo predice un entremezclado de las fibras cromatínicas similar en el interior de los TC individuales y entre TC vecinos, sin discriminación entre interior y periferia de los dominios cromatínicos. Este modelo rechaza la existencia del CI y la región pericromatínica como compartimentos nucleares estructural y funcionalmente distintos y postula que las maquinarias necesarias para ejecutar las principales funciones nucleares se pueden formar tanto dentro del espacio intercromatínico presente entre las fibras cromatínicas del interior de los TC como en las zonas fronterizas entre TC vecinos.

Otros modelos enfatizan la importancia funcional de bucles de cromatina gigantes (*giant chromatin loops*) que emanan desde los TC para transportar genes, ubicados ya sea en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas, a sitios remotos del volumen nuclear para su transcripción conjunta en factorías de transcripción pre-ensambladas o hacia un compartimento nuclear represivo lejano [Fraser & Bickmore 2007]. A este fenómeno de convergencia génica a grandes distancias se le denomina *gene kissing* y exigiría frecuentemente cambios de posición a gran escala dentro del núcleo. El modelo TC-CI postula que estos fenómenos serían sumamente infrecuentes. Si bien la existencia de estos bucles ha sido documentada [Hakim *et al.* 2010] no se conoce su frecuencia ni los mecanismos que generan su traslado a gran escala a través del espacio nuclear.

La cromatina nuclear posee una organización radial no aleatoria y específica que parece estar conservada en un amplio rango evolutivo. En esta configuración, la HC y EC forman

dominios particulares separados espacialmente dentro de los núcleos interfásicos [Mistelli 2007]. La HC se halla adosada a la envoltura nuclear, en los cromocentros y alrededor de los nucléolos; mientras que la EC se distribuye en el interior nuclear entre los compartimentos de HC perinuclear y perinucleolar. A este tipo de organización nuclear se la denomina arquitectura nuclear de tipo convencional. Aunque diferentes tipos celulares pueden diferir en alguna medida respecto a esta organización; el patrón descrito anteriormente es casi universal. El mismo está conservado en la evolución, desde los organismos eucariotas unicelulares a los multicelulares [Postberg *et al.* 2005] y también se refleja en el patrón espaciotemporal de la replicación del ADN (ver sección siguiente).

Una explicación posible para la estabilidad a través de la evolución de este tipo de organización puede ser el papel que la disposición espacial de la cromatina juega en la regulación de la transcripción [Fraser & Bickmore 2007]. La lámina nuclear y los bordes de los nucléolos forman los principales compartimentos nucleares represivos. De hecho, algunos genes son reubicados desde la periferia nuclear al interior, cuando se vuelven activos [Lanctôt *et al.* 2007]. No obstante, su reubicamiento hacia la periferia nuclear suprime la transcripción de algunos, aunque no de todos los genes [Reddy *et al.* 2008]. Aunque la mayoría de los genes que se transcriben se localizan en el interior nuclear, estudios recientes han demostrado que las inmediaciones de los poros nucleares pueden constituir también un dominio de intensa transcripción [Akhtar & Gasser 2007].

Recientemente se ha observado una excepción a la organización nuclear convencional. Los núcleos de los bastones de la retina en mamíferos con estilo de vida nocturno muestran un patrón particular, donde la porción central del núcleo está ocupada por una única gran masa de HC mientras toda la EC transcripcionalmente activa se localiza en la periferia. A este tipo de arquitectura nuclear se la denomina invertida y constituye una adaptación, específica de mamíferos a la visión nocturna [Solovei *et al.* 2009].

1.2 Replicación de los compartimentos de eu- y heterocromatina

La replicación del ADN es un proceso estrictamente regulado a nivel espacial y temporal que ocurre durante la fase S del ciclo celular, en el cual diferentes compartimentos genómicos replican a diferentes tiempos. Esta asincronía en la replicación está altamente conservada entre ciclos celulares consecutivos [Woodfine *et al.* 2004, Ryba *et al.* 2010].

La duplicación de la cromatina en mamíferos implica dominios adyacentes de replicones denominados RTD (*Replication Timing Domains*), los cuales comienzan y terminan la replicación de acuerdo a un programa asincrónico predeterminado [Woodfine *et al.* 2004]. Cuando un dominio completa la replicación, otro dominio adyacente inicia la síntesis del

ADN en forma consecutiva. En ratón y humanos la asincronía en la replicación puede funcionar aleatoriamente entre replicones individuales dentro de un RTD y no aleatoriamente entre diferentes RTD, generando un patrón de replicación diferente en cada fase S. Los RTD son estructuras estables de los núcleos interfásicos de mamíferos, replicándose y transcribiéndose en forma coordinada tanto temporal como espacialmente [Labit *et al.* 2008].

El marcado de núcleos interfásicos de mamíferos con pulsos de los análogos de base 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) o 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) ha demostrado la asincronía y la distribución espacial específica de la replicación del ADN. El patrón de replicación de fase S temprana (*early S*, ES) se caracteriza por *foci* de replicación dispersos en el compartimento nuclear interno, con ausencia de *foci* en la periferia o adyacentes a los nucléolos. Este patrón cambia con el avance de la fase S. En fase S media (*middle S*, MS) la mayoría de los *foci* aún se localizan centralmente aunque algunos mapean en la periferia nuclear y alrededor de los nucléolos. Por último, la replicación en fase S tardía (*late S*, LS) solamente ocurre en la región adyacente a la envoltura nuclear, en los cromocentros y alrededor de los nucléolos (Figura 2) [Ma *et al.* 1998].

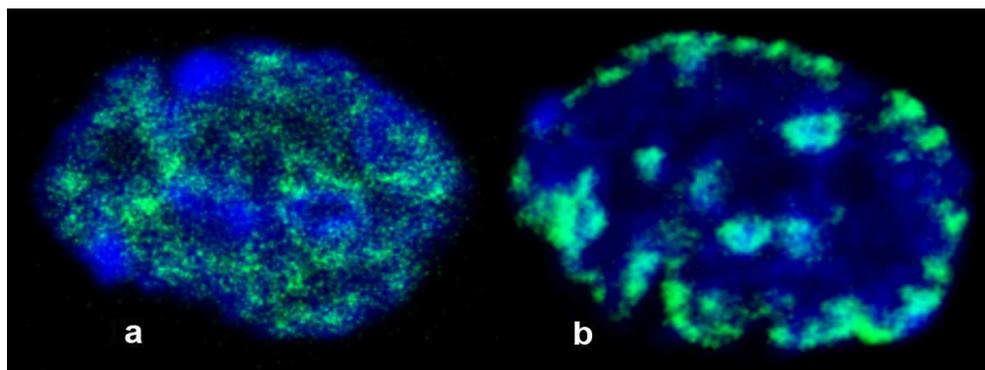


Figura 2. Patrones de replicación de fase S temprana (ES) o tardía (LS) en núcleos de la línea celular CHO9 revelados por incorporación de EdU y posterior detección química con una azida conjugada a AlexaFluor 488 (verde). (a) núcleo en fase ES con replicación del compartimento interno. (b) núcleo en fase LS mostrando la replicación del compartimento periférico, cromocentros y alrededor de los nucléolos (extraída de Di Tomaso *et al.* 2012, en prensa).

En general la cromatina con actividad transcripcional (EC) replica tempranamente (fase ES) mientras que la HCc lo hace tardíamente (fase LS). Por otra parte, la HCf replica tempranamente si sus genes tejido-específicos están siendo expresados y tardíamente si no lo están [Jeon *et al.* 2005]. En eucariotas superiores los *clusters* de replicones de replicación temprana alternan sus actividades de replicación y transcripción. Empleando marcadores fluorescentes se ha observado que en fase ES los *foci* de replicación activos se encuentran transcripcionalmente inactivos y solo reanudan la transcripción luego de finalizada la replicación.

La asincronía en la replicación de la cromatina se establece tempranamente en la fase G1 del ciclo celular, coincidiendo con el anclaje y posicionamiento de segmentos cromosómicos

en lugares específicos dentro del núcleo. Tanto el anclaje como el posicionamiento de los cromosomas resultan centrales en la organización de los compartimentos eu- y heterocromáticos y el establecimiento de la dinámica temporal de replicación y actividad transcripcional [Dimitrova & Gilbert 1999]. Las modificaciones en la organización subnuclear de la cromatina están asociadas con cambios en la dinámica de replicación durante el desarrollo. Por ejemplo, durante las primeras etapas de la diferenciación de células B, ambos alelos transcriptos del *locus* de la cadena pesada de la inmunoglobulina IgH están ubicados centralmente en el núcleo y replican en forma temprana. En etapas de diferenciación avanzadas, en cambio, el *locus* de IgH es reposicionado a la periferia nuclear, para ser reprimido y replicado tardíamente [Zhou *et al.* 2002].

Los *clusters* de replicación se corresponden con bandas de los cromosomas metafásicos. Las bandas C (HCc) replican en LS, la HCf de las bandas G-oscuras se duplica temprana o tardíamente dependiendo de su expresión tejido-específica, mientras que los patrones de replicación temprana caracterizan la EC de las bandas G-claras [Craig & Bickmore 1993]. El análisis en la asincronía de duplicación por PCR cuantitativo de la región frontera entre las bandas G-clara 13q14.3 y G-oscura 13q21.1 en humanos ha mostrado que la región G-clara de la frontera replica tempranamente mientras que la G-oscura replica tardíamente. Sin embargo, un análisis más detallado usando *primers* de PCR espaciados a intervalos de ~150 Kb mostró que el cambio en la dinámica de replicación entre bandas G-claras/G-oscuras ocurre gradualmente desde fases ES-MS a LS sobre una región de 1-2 Mb [Takebayashi *et al.* 2005]. Los segmentos de ADN correspondientes a estas regiones entre dominios de replicación temprana y tardía se denominan TTR (*Timing Transition Regions*) [Méndez 2009].

Se ha mostrado una correlación entre la asincronía en la replicación y modificaciones epigenéticas en la cromatina. Los dominios de replicación temprana se relacionan con modificaciones asociadas con actividad transcripcional (H3K9ac, H3K27ac, H3K4me, H3K36me H3K79me) mientras que las modificaciones epigenéticas represoras (H3K9me, H3K27me and H4K20me) están ligadas a replicación tardía [Pokholok *et al.* 2005].

En mamíferos, diferentes motivos de secuencia discretos o difusos pueden potencialmente actuar como identificación del origen de replicación (ORI, *Origin Replication Identification*), en los cuales un gran número de proteínas se unen formando complejos de replicación. El denominado complejo de pre-replicación (pre-RC, *pre-Replication Complex*) se asocia con orígenes de replicación potenciales en fase G1. Este complejo incluye el complejo de reconocimiento de origen (ORC, *Origin Recognition Complex*), el cual reconoce los orígenes de replicación y las proteínas denominadas MCM [Yang *et al.* 2010].

La accesibilidad de factores de iniciación a orígenes de replicación puede ser regulada por la localización nuclear de estos últimos respecto a los estados de la cromatina. Por ejemplo, el *locus* de α -globina (de replicación temprana) se localiza dentro de una banda G-clara. El reposicionamiento de este *locus* hacia la periferia nuclear heterocromática retrasa el inicio de la replicación al restringirse el acceso de factores de iniciación a su origen de replicación [Smith & Higgs 1999].

En metazoarios, la asincronía en la replicación es controlada durante la fase S por un punto de control (*checkpoint*) del ciclo celular regulado por ATR/CHK1. La transición desde replicación temprana a tardía durante la fase S está acoplada con la activación de este punto de control en fase S-media, el cual inhibe el inicio de replicones tardíos. Se ha reportado que la inhibición de CHK1 genera un encendido más temprano de algunos ORI de encendido tardío. De esta forma, este *checkpoint* juega un rol en la regulación de la asincronía de replicación y la progresión por la fase S [Niida *et al.* 2007]. La metilación del ADN y de histonas podría afectar el momento de replicación a través de la vía de control ATR/CHK1, aunque la relación entre estos procesos aún no se ha dilucidado [Unnikrishnan *et al.* 2010].

Luego de la unión de pre-RC en los ORI, un complejo proteico de preiniciación (*Pre-Initiation Complex*, pre-IC) se ensambla sobre las proteínas MCM, junto con factores requeridos para la unión de la polimerasa de replicación. La asociación a la cromatina de pre-RC y pre-IC es asincrónica, permitiendo la inhibición de pre-RC y la activación de pre-IC por las proteínas de control de ciclo celular CDK (*Cyclin-Dependent Kinases*). Esta regulación permite que la replicación ocurra solamente una vez por ciclo celular, en un momento específico, y asegura que el ciclo celular no pueda avanzar hasta que los controles se hayan cumplido. La finalización de la replicación es necesaria para una condensación cromosómica completa. Mutantes ORC de *Drosophila* incapaces de completar la fase S tienen defectos no solo en la replicación del ADN sino también en la progresión a través del ciclo celular y la condensación cromatínica [Loupart *et al.* 2010].

1.3 Daño Genético

1.3.1 Rupturas de doble cadena en el ADN

La ruptura de doble cadena en el ADN (RDC) es la lesión principal que conduce a la generación de aberraciones cromosómicas (AC), inestabilidad genómica, transformación oncogénica y muerte celular [Obe *et al.* 1992]. Las RDC pueden ser causadas por radicales libres, generados durante el metabolismo oxidativo o creadas como subproductos de procesos celulares normales, como la replicación del ADN, el reordenamiento de genes de inmunoglobulinas y de receptores de células T, en células B y T respectivamente, y la recombinación meiótica en células germinales. También pueden ser causadas por radiaciones ionizantes (RI) y drogas quimioterápicas, incluyendo agentes radiomiméticos como la bleomicina (BLM) e inhibidores de la topoisomerasa II, como el etopósido. Asimismo, pueden generarse este tipo de lesiones cuando las horquillas de replicación se encuentran con otras formas de daño, como modificaciones de bases y uniones cruzadas o durante la reparación de las mismas.

Para prevenir la acumulación de mutaciones que podrían originar la muerte de la célula o producir una proliferación celular descontrolada y el desarrollo de cáncer, se han establecido sistemas de vigilancia del genoma para reparar este daño. Estas vías de respuesta al daño (*DNA Damage Response*; DDR) involucran la integración de procesos de detección del daño, reparación, control del ciclo celular y muerte celular programada. Las células eucariotas han desarrollado dos vías principales para la reparación de las RDC una de las cuales es dependiente y la otra independiente de la presencia de secuencias homólogas para procesar el daño: la reparación por recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR) y la reparación por reasociación no homóloga (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ), respectivamente [resumidos en Goedecke 2007]. La vía de reparación por HR utiliza la cromátida hermana no dañada como molde para reparar las RDC, siendo por ello activa principalmente en fases S y G2. Esta vía implica una manipulación significativa de ambos cromosomas pues ocurren procesos de recorte (*resection*) de hebras en la molécula dañada, invasión de una de las hebras intactas mediada por RAD51, formación de un D-loop, síntesis de ADN y finalmente resolución del intermediario de Holliday. Por otro lado, el mecanismo de NHEJ se basa en la religación de los extremos de ADN rotos realizando la unión de los extremos dañados sin un gran requerimiento de homología de secuencia entre ellos. Al no requerir sinapsis del ADN dañado con una molécula de ADN no dañada propende a la producción de errores en el sitio de reparación, tales como pequeñas inserciones y/o deleciones. Sin embargo, dependiendo del tipo de ruptura, esta vía puede también reparar RDC sin pérdida de nucleótidos. En mamíferos, predomina la vía NHEJ en

todas las fases del ciclo celular aunque es principalmente operativa durante la fase G1 y primeras etapas de fase S.

1.3.2 Bleomicinas

Las BLM son una familia de glicopéptidos aislados originariamente en *Streptomyces verticillus* por Umezawa *et al.* [1966] que presentan una potente actividad antitumoral contra linfomas, cánceres de cabeza y cuello y testículo; siendo un componente importante en protocolos de quimioterapia contra estos tumores. Los miembros de la familia de BLM comparten una misma estructura central (ver sección siguiente) aunque difieren en los azúcares y extremos con cargas positivas que presentan. Las BLM requieren un metal de transición reducido (Fe (II) o Cu (I)), oxígeno y un agente reductor de un electrón para generar una BLM activada. La forma activada puede autodestruirse, oxidar lípidos, hidrolizar enlaces amida en proteínas e iniciar eventos de clivaje químico específicos de secuencia en el ARN y ADN; en el último caso a través de una vía dependiente de radicales libres [Chen & Stubbe 2005].

La BLM puede catalizar la formación de rupturas de simple (RSC) y doble cadena en el ADN, generando un tipo de daño similar al observado por RI. De acuerdo a la secuencia de ADN involucrada, el cociente entre lesiones de simple y doble hebra (RSC/RDC) fluctúa de 6:1 a 20:1. Las RDC generadas son la fuente principal de citotoxicidad de esta droga induciendo diferentes tipos de muerte celular dependiendo de la dosis. A bajas dosis, las células se acumulan en G2/M y sufren una muerte celular mitótica lenta, mientras que a altas dosis la droga puede actuar como una micronucleasa, generando RDC generalizadas y el rápido desenlace de un proceso apoptótico [Tounekti *et al.* 2001].

1.3.2.1 Estructura molecular

Las BLM presentan varios dominios funcionales: el dominio de unión a metales, la región de conexión (*linker*), el extremo bitiazólico y azúcares (disacáridos) (Figura 3). El dominio de unión a metal contiene los ligandos (átomos de nitrógeno, N) involucrados en la formación del complejo octaédrico con los metales de transición. Los grupos amino N3 y N4 del grupo pirimidínico de las BLM parecen definir la especificidad de secuencia de la ruptura en el ADN, uniéndose a los grupos amino N3 y N2 de una guanina en 5' respecto al sitio de ruptura pirimidínico (conocido como la regla 5'-G-Py-3'). Este grupo pirimidínico, interactuando en colaboración con el extremo bitiazólico es responsable de la unión al ADN. La unión puede ocurrir por intercalamiento o por interacciones con el surco menor. Los grupos cargados positivamente del extremo bitiazólico potencian la unión electrostática de la BLM al ADN. La región de conexión es esencial también para un eficiente clivaje de doble cadena mientras que el rol de los azúcares permanece incierto [Chen & Stubbe 2005].

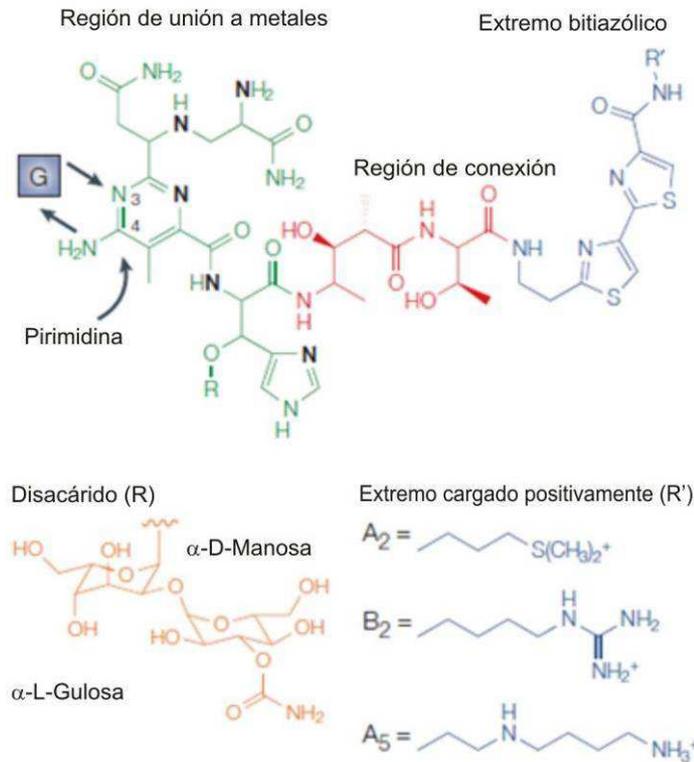


Figura 3. Estructura de las bleomicinas. Se observa el dominio de unión a metales (verde), los átomos de nitrógeno que coordinan el metal (negro), la región de conexión (*linker*, rojo), el extremo bitiazólico (azul) y ejemplos del disacárido (R) y de colas cargadas positivamente (R') (adaptada de Chen & Stubbe 2005).

1.3.2.2 Mecanismos de inducción de daño en el ADN

La BLM activada se forma por la unión de la BLM a Fe (II) ó Cu (I), seguido por la unión del oxígeno y la reducción por un agente reductor. Este intermediario tiene una vida media de pocos minutos y es responsable de iniciar el daño en el ADN. Tanto las RSC como las RDC son iniciadas por la BLM activada la cual, directa o indirectamente, remueve el átomo de hidrogeno 4' del C4' del grupo desoxirribosa de una pirimidina ubicada en dirección 3' respecto a una guanina en el ADN, iniciando el proceso de clivaje de hebra simple. Dependiendo de la disponibilidad de O₂ este intermediario radical 4' puede dividirse en dos vías diferentes: *i)* el intermediario es oxidado a un 4' carbocatión generando, por adición de agua, un sitio abásico oxidado en 4' o *ii)* el intermediario 4' radical reacciona con O₂ formando un radical 4'-peroxi que luego es reducido a 4'- hidroperóxido. Este grupo sufre una serie de transformaciones químicas complejas generando en última instancia un ADN con un *gap* con extremos 3' fosfoglicolato/5' fosfato (3'-PG/5'-P) y una pirimidina propenal (Figura 4).

Diversos autores han postulado que la misma molécula de BLM luego de generar el *gap* en el ADN y ser reactivada, es capaz de generar un segundo clivaje provocando la doble ruptura [Povirk *et al.* 1989]. Empleando resonancia magnética nuclear 2D, Vanderwall *et al.*

[1997] han aportado un modelo para explicar cómo una única molécula de BLM puede efectuar una RDC sin disociarse del ADN. Este modelo implica en primer lugar la unión al ADN, por intercalamiento parcial del extremo bitiazólico, de la BLM en dirección 3' respecto al primer sitio de ruptura. Luego, la molécula de BLM es reposicionada a la segunda hebra por rotación de 180° alrededor del enlace C-C que conecta los dos anillos tiazólicos y una posterior rotación de 117° alrededor del eje perpendicular al anillo bitiazólico. El mecanismo que activa el reposicionamiento de la BLM en el segundo sitio de clivaje y la tasa relativa de este proceso respecto a la disociación del ADN juegan un rol clave en la identificación de *hot spots* para el clivaje de doble ruptura. Resultados posteriores mostraron que múltiples modos de unión de una única molécula de BLM puede llevar al clivaje de doble cadena (no sólo el intercalamiento parcial originalmente propuesto) y además que este tipo de rupturas podrían estar mediadas también por dos moléculas de BLM dependiendo de la estructura y conformación de los sustratos de ADN [Chen *et al.* 2008].

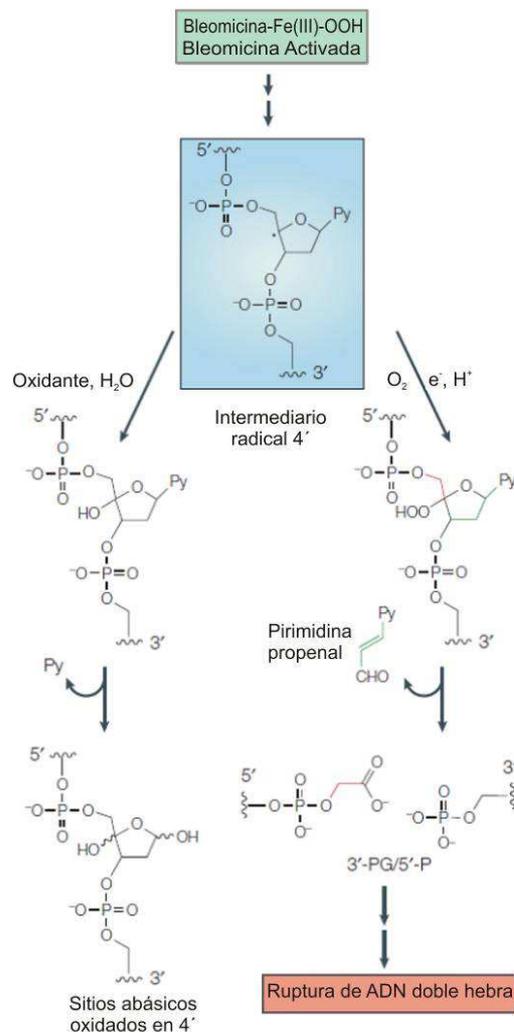


Figura 4. Inducción de daño sobre el ADN por parte de la bleomicina activada. Se observan los posibles destinos del intermediario radical 4' dependiendo de la disponibilidad de O₂ (adaptada de Chen & Stubbe 2005).

1.3.3 Foci de γ H2AX

1.3.3.1 Características

En mamíferos la variante de la histona H2A, denominada H2AX, representa un 2-25% del total de histona H2A dependiendo de la línea celular y del tejido examinado. Esta proteína posee una función específica en la reparación del ADN pues es fosforilada localmente en la vecindad de las RDC, generando la forma denominada γ H2AX. Esta fosforilación ocurre en humanos en el residuo de serina 139 cercano al extremo C-terminal de la molécula. La modificación de H2AX ocurre también en células que sufren fragmentación del ADN por apoptosis así como debido a las RDC que se forman como intermediarios transitorios en los reordenamientos genómicos dentro de las inmunoglobulinas y los genes receptores de células T [Rogakou *et al.* 1998].

Inmediatamente luego de la inducción de una RDC, cientos o incluso miles de moléculas de γ H2AX se originan en su vecindad, precediendo el ensamblado secuencial de proteínas de reparación. La fosforilación de H2AX no se limita a la inmediata vecindad de la RDC sino que se expande en una región extensa de cromatina a su alrededor (~2 Mb de cromatina; 2000 moléculas de γ H2AX) [Rogakou *et al.* 1999]. La presencia de γ H2AX puede detectarse luego de unos minutos en células expuestas a RI, alcanzándose un máximo 10-30 minutos post-irradiación [Rogakou *et al.* 1998]. La modificación de H2AX en respuesta a la inducción de RDC es un mecanismo evolutivamente conservado desde levaduras a humanos que parece ser crítico para modificar la organización de la cromatina a nivel local, en el entorno de la RDC, e incrementar la accesibilidad al ADN de los factores de reparación que colocalizan en los *foci*. La inducción de RDC genera un relajamiento de la estructura cromatínica en la vecindad de las RDC correspondiente a una reducción de 30-40% en la densidad cromatínica [Kruhlak *et al.* 2006]. La decondensación puede llegar hasta la fibra de 11 nm, lo cual coincide con un incremento en la presencia de proteínas no histónicas [Dellaire *et al.* 2009].

Como consecuencia del daño en el ADN se pueden activar tres quinasas de proteínas relacionadas, pertenecientes a la familia de quinasas de tipo fosfatidilinositol-3, para fosforilar a H2AX: DNA-PK, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR (*ATM and Rad3 Related*). Estas quinasas forman parte de un sistema de monitoreo que detecta el daño en el ADN, genera una cascada de señalamiento y recluta enzimas de reparación a los sitios de daño. Diversos estudios han permitido establecer los factores fundamentales en la activación de cada quinasa. ATM y DNA-PK son activadas por RDC mientras que ATR es activada por regiones de ADN simple hebra (ADNsh) que surgen por el bloqueo de horquillas de replicación o durante el procesamiento de lesiones voluminosas [Löbrich *et al.*

2010]. Si bien DNA-PK y ATM tienen un rol solapado en la fosforilación de H2AX dependiente de RDC, la fosforilación de H2AX *in vivo* se encuentra prácticamente ausente en células *Atm*^{-/-} (sin alelos para el gen *Atm*) mientras que es normal en células DNA-PKc^{-/-} (sin alelos para este gen) [Burma *et al.* 2001]. De esta forma, ATM parece ser la principal quinasa asociada con la fosforilación de H2AX bajo condiciones fisiológicas normales, mientras que DNA-PK es responsable de los niveles mínimos de fosforilación de esta proteína observados en células *Atm*^{-/-}. Los mecanismos involucrados en el reconocimiento de las RDC es aún motivo de controversia. Un modelo sugiere que los cambios en la estructura de la cromatina iniciados por la liberación de las restricciones topológicas en el ADN inducida por las RDC son suficientes para activar ATM. Otro modelo sugiere que el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) es esencial en este proceso pues reconoce el ADN dañado, recluta a ATM al sitio de daño e induce la fosforilación por parte de ATM de sus respectivos sustratos. En cualquier caso, la ATM activada fosforila a H2AX facilitando el reclutamiento de MDC1, las ubiquitin-ligasas RNF8 y RNF168, y el mediador 53BP1 [Cann & Deltre 2011]. Estos fenómenos inician el ensamblado en los *foci* de proteínas de señalamiento del daño, control del ciclo celular y reparación del ADN (Figura 5).

A diferencia de lo que ocurre con las rupturas inducidas directamente, las RDC asociadas a estrés replicativo o daño por UV son detectadas por ATR, que tras su activación puede fosforilar a H2AX. ATR es activada por regiones de ADNsh, las cuales pueden originarse en horquillas de replicación bloqueadas o luego de la reparación de lesiones voluminosas durante el pasaje por fase S. La activación de ATR requiere un fragmento considerable de ADNsh no siendo activada por *nicks* de simple hebra o pequeños *gaps*. De esta forma, la fosforilación de H2AX mediada por ATR puede no reflejar necesariamente la presencia de RDC y explicar la presencia de niveles basales de *foci* de γ H2AX en algunos tipos celulares durante fase S en ausencia de tratamientos inductores de daño [Löbrich *et al.* 2010].

Sorprendentemente, el reclutamiento de proteínas de reparación y control del ciclo celular a los sitios de RDC no es dependiente de la generación previa de *foci* de γ H2AX, ya que las células deficientes en H2AX irradiadas con rayos X son capaces de reparar RDC y detener su progresión a través del ciclo celular [Celeste *et al.* 2003]. Esto indica que los *foci* no son indispensables para el reclutamiento inicial de proteínas y las etapas tempranas de reparación y señalización. Sin embargo, los *foci* son necesarios para concentrar y retener las proteínas en la vecindad de las RDC. Esto parece ser importante para la reparación de lesiones persistentes, pues las células deficientes en H2AX son más radiosensibles que las células salvajes y los ratones mutantes para H2AX muestran una disminución de la estabilidad genómica y una susceptibilidad aumentada a carcinógenos y RI [Celeste *et al.* 2003].

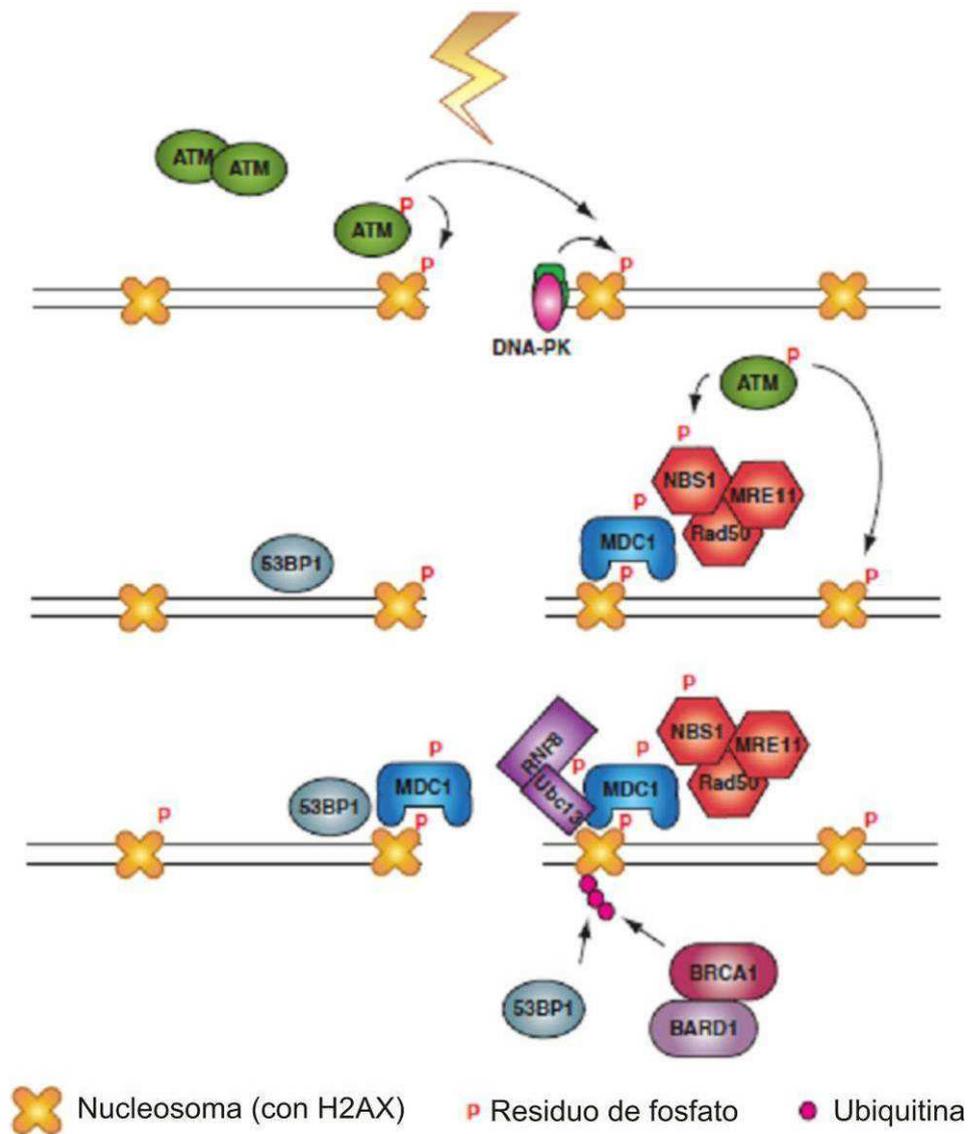


Figura 5. γ H2AX en el señalamiento de la respuesta al daño en el ADN. Luego de la fosforilación inicial de H2AX por ATM o DNA-PK, una reacción de nucleación se inicia con el reclutamiento de MDC1 y posteriormente del complejo MRN para activar nuevamente a ATM. Esto genera un *loop* de retroalimentación que conduce a la fosforilación adicional de H2AX y a las modificaciones cromatínicas requeridas para el reclutamiento de 53BP1. La cascada de activación finaliza con el reclutamiento de RNF8 a la MDC1 fosforilada y la poliubiquitinación de H2AX para reclutar BRCA1/BARD1 (adaptada de Kinner *et al.* 2008).

Luego de la reparación del daño las modificaciones de histonas y los cambios en la cromatina inducidos durante el proceso de reparación deben ser revertidos para que la estructura cromatínica previa al daño sea restablecida. En células de mamíferos, las fosfatasas PP2A y PP4 han sido identificadas como las responsables de remover los fosfatos de γ H2AX, permitiendo la finalización de la señal de daño, aunque no se ha logrado determinar si la desfosforilación ocurre *in situ* o si requiere la remoción previa de γ H2AX de la cromatina [Cann & Delleire 2011].

1.3.3.2 Detección de *foci* de γ H2AX

Puesto que la fosforilación de H2AX se expande una gran distancia (Mb) entorno al sitio de ruptura, las RDC pueden ser evidenciadas como *foci* discretos en núcleos interfásicos o cromosomas mitóticos utilizando anticuerpos específicos marcados con fluoróforos que reconocen el residuo fosforilado de γ H2AX. Esta metodología es altamente sensible, permitiendo detectar RDC cuando existen pocas lesiones en el ADN. Además, se ha observado una relación próxima a 1:1 entre las RDC presentes y el número de *foci* observados [Rogakou *et al.* 1999], lo cual permite cuantificarlas directamente en células individuales mediante el conteo de *foci* por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Un análisis más exhaustivo implica la toma de imágenes por microscopía LASER confocal (ver sección 1.4) y el posterior uso de programas de procesamiento de imágenes para determinar, por ejemplo, su número y localización dentro del núcleo así como su distribución en tamaño e intensidad de fluorescencia.

Esta metodología ha reemplazado los métodos fisicoquímicos tradicionales de cuantificación de RDC basados en la reducción en el tamaño de las moléculas de ADN asociado al daño, como la electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa) o la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Estos métodos no permiten estimar fácilmente el número de RDC y presentan una baja sensibilidad en comparación con las metodologías de detección de γ H2AX [Kinner *et al.* 2008]. Por todo esto, la inmunodetección de γ H2AX utilizando anticuerpos específicos, se ha convertido en un procedimiento estándar para evaluar la inducción y reparación de RDC generadas tanto directa como indirectamente.

Sin embargo, el uso de γ H2AX como indicador de RDC presenta algunos inconvenientes: 1) como ya se ha mencionado, otros tipos de lesiones pueden llevar también a la formación de *foci* [Kinner *et al.* 2008]; 2) se ha reportado que H2AX puede ser fosforilada en forma independiente de la presencia de RDC durante la condensación cromosómica en G2/M, aunque los *foci* asociados a este proceso presentarían un tamaño significativamente menor [McManus & Hendzel 2005]; 3) la cinética de reparación de las RDC y la de formación/desaparición de los *foci* no se corresponden exactamente. El número de *foci* se incrementa gradualmente durante los primeros 30-45 minutos luego de la inducción de daño pese a que los resultados obtenidos por el ensayo cometa o PFGE muestran que en ese lapso una fracción considerable de las RDC ya ha sido reparada. De esta forma, no se ha logrado determinar aún si la ausencia de *foci* visibles se correlaciona exactamente con el fin del proceso de reparación o si ocurre un retraso debido al tiempo adicional necesario para reconstruir totalmente la estructura cromatínica.

1.3.4 Estructura de la cromatina y daño genético

Diversos trabajos han evidenciado que las estructuras de orden superior de la cromatina juegan un rol importante en la regulación de procesos nucleares tales como la transcripción y la replicación del ADN. En este sentido, podemos preguntarnos si la estructura de la cromatina puede también afectar la sensibilidad de las células a agentes clastogénicos y/o los mecanismos de reparación del daño inducido. En otras palabras, cabe preguntarse si dominios cromatínicos estructural y funcionalmente distintos difieren en su sensibilidad a la inducción de RDC y en los mecanismos y eficiencia en la reparación de estas lesiones.

Hasta hace poco tiempo, la sensibilidad de los distintos tipos de cromatina a RI y agentes radiomiméticos se evaluaba a través de la frecuencia de AC inducidas en la HC *versus* la EC en cromosomas mitóticos. Por una parte, se han postulado sensibilidades desiguales de los diferentes tipos de cromatina al daño inducido por clastógenos, afirmándose que las bandas G-claras (EC) exhibirían una mayor sensibilidad que las bandas G-oscuras o bandas C (HCf y HCc, respectivamente) [Folle *et al.* 1998]. En este sentido, se observó que los sitios sensibles a ADNasa I mapeaban preferentemente en bandas G-claras [Folle *et al.* 1997]. Asimismo, Martínez-López *et al.* [2001] observaron una localización predominante de los puntos de ruptura producidos por endonucleasas y RI en cromosomas de CHO en las regiones cromosómicas ricas en histona H4 hiperacetilada (bandas R). Otros autores, utilizando PFGE, determinaron también una sensibilidad mayor a las RI de la EC con respecto a la HC [Löbrich *et al.* 1996; Elia & Bradley 1992]. Sin embargo, utilizando esta misma metodología, Rothkamm & Löbrich [1999] observaron un número similar de RDC en bandas G-claras (Xq26) y G-oscuras (21q21). En concordancia, empleando hibridación *in situ* fluorescente (FISH) multicolor, Puerto *et al.* [2001] no detectaron diferencias en la frecuencia de AC entre la región eucromática (17cen-p53) y la región heterocromática (1cen-1q12) en células irradiadas con rayos γ . Asimismo, Martínez-López *et al.* [2004] irradiando células CHO9 con rayos X determinaron que la frecuencia de AC se correspondía con la longitud de los brazos Xp_e (brazo corto eucromático) y Xq_h (brazo largo predominantemente heterocromático) del cromosoma X. En suma, la evaluación del daño por AC no ha proporcionado una evidencia consistente en cuanto a que las RI u otros clastógenos generen menor número de RDC en la HC que en la EC. Por otra parte, resulta complejo determinar si el número de AC en un dominio cromatínico específico refleja su sensibilidad particular a la inducción inicial de RDC, o por el contrario, depende de la eficiencia de reparación en ese dominio.

La visualización *in situ* de los *foci* de γ H2AX por microscopía de fluorescencia, que permite la detección directa de RDC en la cromatina interfásica, constituye un método eficaz para

comparar la sensibilidad de diferentes dominios cromatínicos al daño inducido. Empleando esta metodología varios autores han postulado una localización preferencial de los *foci* de γ H2AX inducidos en las regiones eucromáticas del genoma, sugiriendo que la HC podría ser refractaria a la formación de *foci* de γ H2AX [Cowell *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007, Falk *et al.* 2008; Karagiannis *et al.* 2007; Vasireddy *et al.* 2010].

Se han planteado diferentes hipótesis para explicar la distribución no homogénea de los *foci* de γ H2AX dentro del núcleo. El alto nivel de condensación o la abundancia de proteínas de unión podrían reducir la accesibilidad de la HC a los agentes químicos que dañan el ADN. Asimismo, la inducción de radicales libres sería menor en la cromatina condensada, debido a su bajo nivel de hidratación, que en la EC [Falk *et al.* 2010]. Además, la HC podría contener una menor proporción de la isoforma H2AX o ser menos accesible a quinasas debido a la compactación o al encubrimiento por proteínas [Cowell *et al.* 2007]. Por otra parte, se ha descrito una ola de desenrollamiento cromatínico que comienza en los sitios de RDC y se esparce a través de la cromatina (por la fosforilación de KAP1 vía ATM), implicando que la localización preferencial de los *foci* de γ H2AX en la cromatina decondensada podría reflejar una reorganización de la misma [Noon *et al.* 2010, Kruhlak *et al.* 2006].

Finalmente, podrían ocurrir migraciones de rango limitado de RDC desde regiones de cromatina compactas hacia dominios de reparación localizados en regiones decondensadas. Usando microirradiación con diferentes tipos de iones para inducir RDC acoplado a un ensayo de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) modificado para detectar conjuntamente estas lesiones y los *foci* de γ H2AX, se observó que la trayectoria lineal de los *foci* de γ H2AX experimentaba un desvío bordeando las regiones heterocromáticas [Jakob *et al.* 2011]. La migración de *foci* de γ H2AX desde el interior a las regiones periféricas de HC parece iniciarse dentro de los 20 minutos post-irradiación y completarse aproximadamente 1 hora luego de la inducción del daño. La decondensación de la HC en los sitios de impacto de iones posiblemente promueve el movimiento de RDC a regiones periféricas de menor densidad cromatínica para su potencial reparación.

1.3.5 Replicación, transcripción y daño genético

Se ha postulado que los procesos de remodelación de la cromatina tales como la síntesis del ADN o la actividad transcripcional podrían modular la localización del daño genético primario. La replicación del ADN implica la generación de RDC transitorias producidas por la topoisomerasa II y el relajamiento de la cromatina para aliviar el estrés de torsión. En este sentido, la cromatina “abierta”, en proceso de replicación, podría constituir un blanco preferencial para los agentes inductores de daño en el ADN. Usando como modelo el

cromosoma X de la línea celular CHO9, Di Tomaso *et al.* [2006; 2010] determinaron la localización de AC producidas por diversos agentes (etopósido, *Alu* I, metilmetano sulfonato y rayos UV-C) en células en fases ES y LS. A pesar de los diferentes tipos de lesiones primarias inducidas por estos agentes (RSC, RDC, alquilación de bases, dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos) las AC mapearon principalmente en Xq_h en células LS (replicación de la HC) y en Xp_e en células ES (cuando replica la EC), sugiriendo que los procesos de remodelación de la cromatina asociados a la síntesis del ADN podrían jugar un rol significativo en la localización del daño.

En relación a la actividad transcripcional, el análisis del mapa del transcriptoma humano ha revelado la existencia de regiones específicas en los cromosomas (5-15 Mb; 10-15% del genoma) donde se agrupan los genes altamente expresados [Caron *et al.* 2001; Versteeg *et al.* 2003]. Estas regiones se denominan RIDGE (*Regions of Increased Gene Expression*), en contraposición a las regiones que contienen bajo número de genes, la mayor parte con bajo nivel de expresión (antiRIDGE). La cromatina en los antiRIDGE se encuentra condensada y se localiza hacia la periferia del núcleo mientras que en los RIDGE presenta una estructura más abierta y una localización preferentemente central [Goetze *et al.* 2007]. Folle *et al.* [2010], mapearon sobre idiogramas de cromosomas humanos (850 bandas) las regiones de cromatina hiperacetilada ($H4^{+a}$), RIDGE, antiRIDGE y los sitios de fractura generados por RI. Observaron una localización preferencial del daño genético en las regiones $H4^{+a}$ y RIDGE; sugiriendo una mayor sensibilidad de la cromatina activa a la inducción de daño por RI. En contraposición, los antiRIDGE resultaron ser comparativamente más resistentes a las RI.

Como se mencionó anteriormente, diversos trabajos han postulado una localización preferencial de los *foci* de γ H2AX inducidos en las regiones eucromáticas del genoma. No obstante, la localización de los *foci* en relación a la estructura de la cromatina cuando el daño genético se induce durante la replicación del ADN no ha sido extensamente analizada.

1.4 Microscopía Confocal y Análisis de Imágenes

Si bien los microscopios de epifluorescencia convencionales resultan adecuados para la toma de imágenes en muestras de poco espesor, proveen una información limitada a nivel axial, pues la luz emitida desde todos los planos de la muestra es recolectada simultáneamente. Esta incapacidad para rechazar la luz fuera de foco imposibilita realizar un adecuado seccionamiento óptico. Para muestras de espesor considerable y/o cuando se requiere información axial es necesario el uso de microscopios de *scanning* de tipo confocal. En estos microscopios la imagen se forma añadiendo información de regiones individuales de la muestra que son excitadas secuencialmente, punto a punto, con luz LASER. Por otra parte, en el camino de la luz emitida hacia el detector (fotomultiplicador o fotodiodo) se

interpone una apertura confocal (diafragma, “*pinhole*”), permitiendo la remoción de luz fuera de foco en cada plano de la imagen. La luz emitida es amplificada por los detectores generando una imagen final constituida por una matriz de elementos gráficos discretos (píxeles). La combinación de selectividad espacial, tanto en la excitación como en la detección, remueve la borrosidad (*blur*) fuera de foco, incrementando la resolución de la imagen (distancia mínima a la cual dos elementos pueden ser observados como objetos separados en la misma) más allá de lo posible por microscopía de epifluorescencia. Además esto permite distinguir señales en el eje z al generar cortes (*slices*) ópticos de fino espesor y la realización de reconstrucciones 3D por métodos computacionales, combinando datos provenientes de lotes (*stacks*) de imágenes [Bolte & Cordelieres 2006; Conchello & Lichtman 2005].

1.4.1 Procesamiento de imágenes

El objetivo principal del procesamiento es reconstruir la distribución de los fluoróforos en la muestra con la mayor fidelidad posible. Esto implica reducir al máximo los errores aleatorios (por ej. el ruido) y sistemáticos [por ej. la distorsión generada por la PSF (*Point Spread Function*; ver más adelante] que son causados durante el proceso de toma de imágenes. Es crucial determinar en cada caso el procesamiento adecuado para el conjunto de imágenes a estudiar en función de las medidas cuantitativas a realizarse *a posteriori* (colocalización, volumen, forma y orientación de objetos, etc.) [Ronneberger *et al.* 2008]. El procesamiento puede abarcar una extensa serie de procedimientos dependiendo de las características del sistema óptico empleado en la toma de imágenes y puede incluir entre otros: corrección de campo “liso” (*Flat Field Correction*), sustracción de *background*, normalización de la intensidad, filtrado y/o deconvolución.

1.4.1.1 Filtrado

Los filtros son una gran familia de transformaciones que cambian los valores de intensidad de cada píxel en base a los valores de intensidad de un grupo de píxeles, por ejemplo, los píxeles vecinos. El grupo más importante de filtros es el de los filtros lineales; un filtro lineal reemplaza cada valor de píxel por un promedio ponderado de los valores de intensidad de píxel de sus píxeles vecinos. El peso adjudicado a cada píxel depende solamente de su posición relativa respecto al píxel considerado y se calcula en base a la PSF del sistema. Además de la familia de filtros lineales, existe un número importante de filtros no lineales, que reemplazan cada valor de intensidad de píxel por una combinación no lineal de los valores de píxel de su vecindad, por ejemplo, para realzar o debilitar ciertas estructuras dentro de la imagen [Ronneberger *et al.* 2008].

1.4.1.2 Deconvolución

La imagen óptica de un objeto en forma de punto no es visualizada como un punto en la imagen formada por el detector sino que muestra una distribución de intensidades en 3D descrita por su PSF. Esta es una característica inherente de los microscopios ópticos como consecuencia de las propiedades físicas de la luz. Como resultado de esto, las imágenes siempre aparecerán “contaminadas” por contribuciones de fuentes de luz que están situadas fuera del punto de interés. Las técnicas de deconvolución aplican métodos computacionales (algoritmos) a partir de la información sobre el proceso de formación y registro de la imagen para reasignar la luz borrosa fuera de foco a su origen de acuerdo a la PSF y de esta forma remover luz proveniente de otros planos en cada uno de los *slices* ópticos.

Estos algoritmos de restauración tienen en cuenta el proceso de formación de la imagen en el *stack* 3D y son generalmente no lineales e iterativos por naturaleza, pues calculan repetidamente una estimación mejorada del objeto real que produce, distorsionada por la PSF del sistema, la imagen observada. La deconvolución cambia fuertemente la información original, por lo que los resultados obtenidos pueden ser muy diferentes dependiendo de cómo ésta se realiza.

Varios factores resultan determinantes respecto al resultado obtenido luego de la deconvolución. Uno de ellos es la PSF (calculada teóricamente o medida experimentalmente). Otro factor es el propio algoritmo de deconvolución a emplear, pues cada algoritmo se basa en diferentes suposiciones respecto a las propiedades de los datos y los elementos de la imagen. Finalmente, el tercer factor es la selección de los parámetros que controlan el algoritmo de deconvolución. La selección de los parámetros críticos depende del tipo de algoritmo a utilizar aunque en la mayoría de los casos son determinantes dos aspectos: el número de iteraciones y las variables que afectan el “suavizado” (*smoothness*) de los resultados. Si el número de iteraciones es demasiado grande, la deconvolución puede introducir artefactos como bordes super-angulosos (*over-sharpened*) y falsas estructuras, ausentes en la imagen original, además de amplificar el ruido existente en los datos. Algunos algoritmos imponen restricciones para el “suavizado” de los resultados, donde no son aceptados elementos que no sean suficientemente “suaves” en relación a gradientes de intensidad y contornos; siendo en estos casos menos crítico el número de iteraciones. Un análisis más exhaustivo de las complejas metodologías de deconvolución y sus parámetros más importantes puede hallarse en Sibarita 2005, Conchello & Lichtman 2005, Ronneberger *et al.* 2008.

1.4.2 Colocalización

1.4.2.1 Definición de colocalización

Podemos definir la colocalización como la tendencia de señales fluorescentes provenientes de diferentes marcadores a coexistir en el mismo conjunto de píxeles dentro una imagen digital [Ronneberger *et al.* 2008]. Es decir, la superposición de las distribuciones espaciales dentro de las imágenes recolectadas en los diferentes canales de detección mostrará un nivel de correlación mayor que el esperado por solapamiento aleatorio. Biológicamente, la colocalización indica la presencia de diferentes moléculas, organelos, células o tejidos en una misma ubicación física. Si bien puede implicar la unión de dos o más moléculas diferentes a la misma estructura celular; no indica necesariamente que dos proteínas estén de hecho interactuando [Zinchuk *et al.* 2007].

La confiabilidad de los experimentos de colocalización depende íntimamente de la calidad de las imágenes a analizar; considerándose que sólo las imágenes obtenidas por microscopía confocal tienen la suficiente calidad para ser sometidas a este tipo de ensayos. Asimismo, deben utilizarse secciones ópticas cercanas al límite de resolución del sistema óptico, es decir, con un adecuado tamaño de píxel y de salto entre los cortes en z (*step size*). De hecho, podría observarse colocalización adquiriendo imágenes a baja resolución mientras que la adquisición al límite de resolución del sistema podría revelar una separación visible de las marcas. La mayoría de los investigadores considera beneficioso someter las imágenes a filtros y/o algoritmos de deconvolución previo a los ensayos de colocalización. Estos procesos disminuirán el *background*, especialmente significativo para imágenes de bajo contraste o intensidad de fluorescencia, el cual puede influir en los valores de los coeficientes de colocalización (en general produciendo su sobreestimación). Por otra parte, el filtrado y la deconvolución pueden generar artefactos si no son usados adecuadamente, pudiendo también alterar los resultados obtenidos.

1.4.2.2 Estimación de la colocalización

Los métodos de análisis de colocalización más simples implican el conteo de los píxeles donde se considera que hay colocalización y su comparación con el número total de píxeles de la imagen. Por ejemplo, en imágenes multicanal verde/rojo se estima el número de píxeles “amarillos”, producto del solapamiento entre ambos canales. Sin embargo, su presencia depende fuertemente de la intensidad de señal relativa en cada canal; obteniéndose una representación confiable de la colocalización en el caso infrecuente donde ambas imágenes exhiban niveles de intensidad similares. Por otra parte, se han desarrollado algoritmos especializados en el análisis de colocalización cuantitativa, ya sea en programas comerciales o de *software* libre.

Estos algoritmos implican una aproximación estadística global empleando coeficientes basados en correlación de intensidad (*Intensity Correlation Coefficient-Based*, ICCB) o una aproximación basada en objetos. Las herramientas de ICCB utilizan procedimientos estadísticos para evaluar la relación entre los valores de intensidad de fluorescencia de dos canales en cada píxel de una imagen multicanal, a través de coeficientes de correlación que miden la fuerza de la relación lineal entre estas variables. El coeficiente de correlación de Pearson fue el primero en ser utilizado para medir colocalización en muestras biológicas a partir de imágenes fluorescentes de dos canales [Manders *et al.* 1993]. Este coeficiente es una medida de la covarianza entre dos señales y presenta una utilidad limitada, restringida a muestras que presenten un nivel similar de intensidad de fluorescencia en cada canal de detección. Además, su valor es fuertemente afectado por la presencia de proporciones significativa de píxeles con bajas intensidades dentro de la imagen, en particular una correlación negativa fuerte es difícil de observar en imágenes no procesadas. El coeficiente de Pearson ha servido de base para el desarrollo de otros coeficientes de colocalización aplicables cuando los fluorocromos analizados difieren en sus niveles de intensidad de fluorescencia dentro de la muestra [resumidos en Zinchuk *et al.* 2007; Bolte & Cordelières 2006; Ronneberger *et al.* 2008].

La principal desventaja de los métodos de ICCB es que no permiten realizar una exploración espacial de las señales colocalizadas pues para el análisis consideran cada píxel de la imagen en forma semejante, sin discriminar si forma parte (o no) de una estructura particular. De esta forma, proporcionan una estimación global de la colocalización al estar basados únicamente en el análisis de la coincidencia de píxeles individuales.

Un método usado frecuentemente para medir colocalización implica la identificación manual de estructuras, el trazado de un vector a través de las mismas y la posterior determinación de sus curvas de intensidad de fluorescencia en cada canal a lo largo del vector en imágenes 2D. Mediante esta metodología, los perfiles de intensidad de fluorescencia se evalúan en los sucesivos planos del *stack* de imágenes donde los dos elementos están presentes. Se considera que hay colocalización cuando la distancia de solapamiento entre las curvas de intensidad de fluorescencia al 50% de su máximo de intensidad es mayor que la resolución de los objetivos utilizados en la adquisición de imágenes. Aunque esta técnica es potente para estimar colocalización, demanda un tiempo considerable y puede ser aplicada solamente a un número limitado de estructuras, al ser necesario cambiar continuamente la posición del vector.

Otras estrategias de colocalización cuantitativa involucran su estimación local en base a la previa identificación y delineación de objetos dentro de cada imagen, área del procesamiento de imágenes conocida como segmentación (ver sección 4.5.1.c). Luego de la

identificación de estructuras por procesos de segmentación pueden aplicarse métodos de ICCB para calcular coeficientes de correlación (restringidos ahora a objetos de la imagen y no a toda la imagen) o métodos de colocación basados en elementos, es decir, que evalúan la coincidencia de estructuras discretas. En este último caso pueden compararse, por ejemplo, la posición en 3D de los centros de intensidad o de los centroides (centros geométricos) de cada elemento en ambos canales de la imagen y determinar si su distancia está por encima (no colocan) o por debajo (colocan) del límite de resolución del sistema [resumidos en Bolte *et al.* 2006].

2. Hipótesis

El daño genético inducido por BLM en núcleos interfásicos de células CHO9 predomina en regiones eucromáticas, potencialmente activas o en fase de replicación.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar la distribución del daño genético primario en núcleos interfásicos de la línea celular CHO9 en relación al estado de la cromatina (eu/heterocromatina), la replicación y la transcripción del ADN.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar la localización de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM en núcleos interfásicos de CHO9 en relación a regiones de cromatina potencialmente activas.
- 2) Analizar la localización de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM a nivel de la eu- y heterocromatina en núcleos interfásicos de CHO9 en fase de replicación (fases S temprana y tardía) o en ausencia de este proceso (fases G1/G2).

4. Materiales y Métodos

4.1. Propagación de los cultivos celulares y tratamiento con Bleomicina

Se realizaron cultivos en monocapa de la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO9) en medio de cultivo HAM-F12 (PAA) sobre cubreobjetos estériles de 18x18 mm ó 15x15 mm en *multiwells* de 6 ó 12 pocillos. Los medios de cultivo se suplementaron con suero fetal bovino (PAA) al 10% (v/v), glutamina (200 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (125 µg/mL). Los cultivos asincrónicos se mantuvieron en estufa a 37° C y 5% de CO₂ hasta ser tratados con el agente radiomimético BLM (40 µg/mL en PBS 1X, 30 min) o sólo con PBS 1X (controles). Finalizado el tiempo de tratamiento, los cultivos control y tratados se lavaron con PBS 1X (2 x 5 min) e incubaron con medio de cultivo fresco y suero fetal bovino durante 45 minutos para permitir la formación de *foci* de γ H2AX.

4.2 Inmunodetección de γ H2AX y ser5P-ARN Pol II en núcleos interfásicos

Las monocapas celulares se lavaron con PBS 1X (3 x 3 min) y posteriormente fijaron en paraformaldehído (2% en PBS 1X, 5 min). Tras nuevos lavados con PBS 1X (3 x 3 min) las células fueron permeabilizadas en 0,5% de Tritón X-100/PBS 1X por 15 minutos. A continuación, fueron lavadas en PBS 1X (3 x 3 min) y en PBT (0.15% BSA + 0.1% Tween 20 en PBS 1X) se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas por 15-20 minutos. Luego de lavar en PBS 1X (1 x 3 min) se procedió a la incubación simultánea (45-60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente) con un anticuerpo anti- γ H2AX desarrollado en ratón (Abcam, 1:400 en PBT) y un anticuerpo anti-(ser5P-ARN Pol II) desarrollado en conejo (Abcam, 1:1000 en PBT). Luego de lavados (3 x 3 min) en PBS 1X, las muestras se incubaron (45-60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente) con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado a Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:200 en PBS 1X) y anti-conejo conjugado a AlexaFluor 488 (banco de anticuerpos del IIBCE, 1:500 en PBS 1X) para detectar γ H2AX y ser5P-ARN Pol II respectivamente. Luego de lavar los preparados en PBS 1X (3 x 3 min) se contratiñeron con DAPI (1,5 µg/mL, Sigma-Aldrich) por 15 min. Finalmente los preparados fueron montados con Vectashield (Vector Laboratories) y sellados con esmalte.

4.3 Identificación de células en fase S por incorporación de EdU e inmunodetección de γ H2AX y H3K4me₃ en núcleos interfásicos

Las células en proceso de replicación se identificaron utilizando el *kit Click-iT EdU Imaging* (Invitrogen) el cual incorpora un nucleósido análogo a la timidina (EdU) durante la síntesis del ADN. La detección de este compuesto se basa en una reacción química covalente, catalizada por cobre, entre un grupo azida (presente en el colorante AlexaFluor) y un grupo

alquino (presente en el EdU). Comparado a la incorporación de BrdU, este método posee la ventaja de no ser necesario desnaturalizar el ADN (con HCL por ejemplo) para la detección del análogo de base nitrogenada. Se evita de esta manera la alteración de la integridad del ADN o de sitios de reconocimiento de antígenos que se intente detectar junto a EdU.

En los cultivos controles, o durante la exposición a BLM en los cultivos tratados, se agregó EdU diluido en HAM-F12 (concentración final: 10 μ M) para identificar las células que se encontraban en fase S al momento de inducción del daño. La detección del EdU incorporado se realizó como un paso adicional en la técnica de inmunodetección de γ H2AX, entre el bloqueo en PBT y la incubación con anticuerpos primarios. Para su detección se preparó el siguiente *mix* de reacción (para volumen final: 250 μ L): 215 μ L del buffer de reacción 1X *Click-iT*; 10 μ L de CuSO₄; 0,6 μ L de azida*AlexaFluor488 y 25 μ L del aditivo de buffer de reacción (2,5 μ l de vitamina C en 22,5 μ L de agua deionizada).

Los cubreobjetos fueron incubados con el mix de reacción por 30-45 min a RT en oscuridad, lavados en PBS 1X (3 x 3 min) y bloqueados nuevamente en PBT por 15-20 min previamente a la incubación con los anticuerpos primarios. Se realizó la inmunodetección conjunta de *foci* de γ H2AX y H3K4me₃ empleando los anticuerpos anti- γ H2AX desarrollado en ratón (Abcam, 1:400 en PBT) y anti-H3K4me₃ desarrollado en conejo (Abcam, 1:500 en PBT). Se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios: anti-ratón conjugado a Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:200 en PBS 1X) y anti-conejo conjugado a AlexaFluor 594 (Molecular Probes, 1:300) para detectar en forma respectiva a γ H2AX y H3K4me₃.

4.4 Obtención de imágenes por Microscopía Confocal

El uso de ajustes (*settings*) de adquisición apropiados resulta crítico para la obtención de imágenes de las cuales se pretende extraer información a nivel cuantitativo. Esto implica realizar un muestreo (*sampling*) adecuado de la muestra en x-y-z, maximizar el cociente señal-ruido (*Signal to Noise Ratio*, SNR) y utilizar todo el rango dinámico de valores de intensidad disponible [Brown 2007; North 2006; Ronneberger *et al.* 2008]. En este sentido, la potencia e intensidad de incidencia sobre la muestra de los LASER, la ganancia de cada uno de los fotomultiplicadores (PMT) y los valores de *offset* fueron ajustados de forma tal de emplear en la recolección de imágenes todo el rango dinámico (0-255) que poseen los detectores (8-bit) de los equipos confocales utilizados. Por otra parte, se procuró maximizar el SNR, complementando las intensidades de iluminación empleadas con velocidades de escaneo moderadas y la realización de varios pasos de adquisición y promedio (*averaging*) sobre la misma imagen. Por otra parte, las restricciones impuestas por el riesgo de *photobleaching* y tiempos de adquisición elevados llevaron a un compromiso entre estos factores.

Se evitó el recorte (*clipping*) o la saturación, que ocurre cuando la magnitud de la señal excede el rango dinámico disponible y aparecen píxeles con valores de intensidad fuera de rango a los cuales se les asignan erróneamente el valor mínimo o máximo de la escala (0 ó 255, respectivamente). Para ello, se utilizaron las tablas de color disponibles en los programas de adquisición de imágenes, donde los valores de intensidad extremos se evidencian en colores diferenciales. Los parámetros de adquisición se ajustaron de forma tal de captar pocos o ninguno de los valores extremos en los canales de detección.

Para la obtención de imágenes en los preparados donde se realizó la inmunodetección de γ H2AX/ser5P-ARN Pol II se utilizó un microscopio LASER confocal Olympus BX-61 FV300 (equipo institucional del IIBCE) y su software asociado Olympus Fluoview Version 4.3. Este equipo permitió la excitación secuencial de las muestras con LASER de 405, 488 y 543 nm. Se utilizaron filtros manuales de 430-460 nm, > 510 nm y 560-600 nm para recolectar la emisión de fluorescencia en azul (DAPI), verde (ser5P-ARN Pol II) y rojo (*foci* de γ H2AX), respectivamente. En cada uno de los preparados se escanearon campos al azar empleando un objetivo de inmersión en aceite 100X/NA:1,35, obteniéndose *stacks* de imágenes con un *step size* entre planos de 300 nm. El formato de cada imagen fue de 1024x1024 píxeles y el escaneo se realizó en modo *slow* sin zoom digital. El tamaño de voxel (píxel en x-y-z) empleado fue de $\Delta x/\Delta y/\Delta z = 70/70/300$ nm y el número total de planos por *stack* fue de 20-37 dependiendo del espesor de los núcleos escaneados.

En el caso de los preparados donde se realizó la detección química del EdU incorporado y la inmunodetección de γ H2AX/H3K4me₃ se utilizó un microscopio LASER confocal Leica SP5 TCS II (*AG Humangenetik, Biozentrum Ludwig-Maximilians-Universität, Munich*) y su *software* asociado LAS AF. Este equipo permitió excitar secuencialmente las muestras con LASER de Diodo 405 nm, línea 488 nm de Argón multilínea (458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm), HeNe 561 nm y HeNe 594 nm. La emisión fue recolectada a través de canales espectrales de detección con los siguientes intervalos para los respectivos canales: PMT1: 422-485 nm (DAPI), PMT2: 496-539 nm (EdU), PMT3: 563-593 nm (*foci* de γ H2AX), PMT4: 605-636 nm (H3K4me₃). Para el LASER de 488 nm se utilizó una potencia del 20%; mientras que la intensidad de incidencia de cada LASER sobre la muestra (controlada a través de AOTF, *Acousto-Optic Tunable Filters*) fue de: 19% (LASER 405 nm); 20% (LASER 488 nm); 15-17% (LASER 561 nm) y 20% (láser 594 nm). La ganancia de cada PMT se ajustó entre 550-900 V y el *offset* menor a -1% en valor absoluto.

En cada uno de los preparados se escanearon células individuales o grupos de 2 ó 3 células empleando un objetivo de inmersión en aceite 63X/NA:1,40. De acuerdo al teorema de muestreo de Nyquist para poder resolver dos puntos correctamente el tamaño de voxel

aplicado debe ser igual al límite de la resolución entre dos puntos dividido por 2,3. Por otra parte, para imágenes a utilizar en análisis cuantitativo, se considera que un sobremuestreo moderado (usar un tamaño de voxel algo menor al necesario) es aceptable. Tomando en cuenta estos factores, se utilizó un zoom digital de 9,65 obteniéndose imágenes con tamaño de voxel 49,9 nm x 49,9 nm x 300 nm (x, y, z respectivamente). El tamaño de *pinhole* empleado fue de 95,3 μm (1 unidad de Airy), diámetro que proporciona un buen compromiso entre el rechazo de luz fuera de foco y una intensidad adecuada de señal recolectada.

Se tomaron imágenes con un formato de 512 x 512 píxeles (tamaño total: 25,5 μm x 25,5 μm) a una velocidad de escaneo de 700 ó 1000 Hz. Se utilizó un *line average* de 3, es decir, cada píxel fue escaneado 3 veces tomándose el valor promedio como valor final de intensidad para cada uno de los píxeles. Se realizaron *stacks* de imágenes en z usando un *step size* de 300 nm entre planos. Dependiendo del espesor de los núcleos escaneados se obtuvieron *stacks* de 20-33 planos. Los *stacks* de imágenes obtenidos fueron guardados en formato .tif para su posterior procesamiento.

5 Procesamiento y análisis de las imágenes

4.5.1 Núcleos de CH09 inmunomarcados para $\gamma\text{H2AX/ser5P-ARN Pol II}$

Stacks de imágenes procedentes de 3 experimentos realizados en el Departamento de Genética del IIBCE en idénticas condiciones experimentales se procesaron y analizaron en el SCIAN-Lab, Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Steffen Härtel. Se consideraron 6 *stacks* en total por experimento (4 *stacks* de cultivos tratados con BLM y 2 *stacks* de cultivos control en dos experimentos; 3 *stacks* de imágenes de cultivos tratados con BLM y 3 *stacks* de imágenes de cultivos control en un experimento).

En primer lugar, los *stacks* de imágenes fueron deconvolucionados usando los programas *Huygens Professional* y *Huygens Scripting* (*Scientific Volume Imaging*, Hilversum, Holanda; www.svi.nl). Las imágenes una vez deconvolucionadas fueron segmentadas de forma manual empleando las metodologías de procesamiento de imágenes implementadas y desarrolladas en el SCIAN-Lab (*software*: SCIAN_Soft) en la plataforma IDL 7.0 (Interactive Data Language, ITT, Co, USA). Finalmente, las imágenes segmentadas fueron utilizadas como base para realizar los ensayos de colocalización utilizando el algoritmo CDA (*Confined Displacement Algorithm*) presente en dicho *software* [Ramírez *et al.* 2010].

Para todos los *stacks* de imágenes se procedió en forma similar. En cada caso: *i*) cada imagen individual en formato .tif fue renombrada según la nomenclatura exigida en los programas subsiguientes; *ii*) se deconvolucionaron empleando los *softwares* *Huygens*

Professional y *Huygens Scripting*, iii) se segmentaron manualmente y iv) se realizaron los ensayos de colocalización empleando el programa *SCIAN_Soft* en IDL 7.0.

4.5.1.1 Renombramiento de los archivos

Tanto el *Huygens Scripting* como el IDL7.0/*SCIAN_Soft* requieren un formato determinado en el nombre de los archivos de entrada. Por ello, primeramente se utilizó el programa *File Renamer Basic* para renombrar cada uno de los archivos de imágenes originales tomadas en el microscopio confocal. Utilizando este programa el nombre de los archivos fue cambiado al tipo "id_t000_ch00_z000" exigido por el IDL7.0/*SCIAN_Soft*. En este contexto cada "t" se corresponde con el conjunto de planos en el eje z de cada *stack* de imágenes tomado en los diferentes canales de fluorescencia (ch00 a ch02).

4.5.1.2 Deconvolución

Para realizar la deconvolución de las imágenes se utilizó en primer lugar el programa *Huygens Professional*, el cual posee una interfase visual que permite ajustar los parámetros de deconvolución (*background*, SNR, número y tipo de iteración) para cada *stack* de imágenes en cada uno de los canales de detección (ch00-verde: *foci* de ser5P-ARN Pol II, ch01-rojo: *foci* de γ H2AX y ch02-azul: DAPI). Para ejecutar el algoritmo se estimó, a partir de las propias imágenes, el rango de probables SNR a utilizar como un dato de entrada, determinando manualmente los valores de intensidad de píxel en zonas de señal y de *background*. Debido a que una estimación muy alta del SNR puede generar un contraste muy alto en los resultados, perdiéndose los objetos de baja intensidad y, por otra parte, una estimación muy baja puede causar una insuficiente remoción del *blur*, se realizaron diferentes ensayos de deconvolución en el rango de SNR posibles para determinar el valor óptimo de este parámetro a partir de los resultados obtenidos. Para cada canal de detección se ensayaron valores de SNR de 8, 10 y 12; el *background* estimado por canal fue de 0; se utilizó el modo de iteración "high Q" y los siguientes criterios de *stop* del algoritmo: alcanzar un número de iteraciones de 60 como máximo o un "quality change threshold" de 0,1.

Luego de fijados los parámetros de deconvolución en el *Huygens Professional* se utilizó el programa *Huygens Scripting*, el cual permite la deconvolución masiva de todos los *stacks* de imágenes en forma sistemática. Para ello, se emplearon en forma secuencial dos *scripts*, la parte 1 que genera archivos .ics y la parte 2 que genera archivos con formato .tiff los cuales son los archivos de entrada para el IDL7.0/*SCIAN_Soft*.

4.5.1.3 Segmentación

Para distinguir los objetos de interés (que contienen información biológica relevante) de aquellos que representan *background*, se realizó la segmentación de las imágenes

aplicando umbrales (*thresholds*) de intensidad y diversos filtros. En una situación óptima, los píxeles que contienen sólo ruido presentan intensidades más bajas que los píxeles que están contenidos en estructuras. Por ello, como primer paso en la identificación de estos píxeles “estructurales” se aplicaron umbrales en cada imagen a partir del histograma de las intensidades de sus píxeles, donde todos los píxeles que presentaban valores de intensidad superior al umbral fueron considerados píxeles estructurales. De esta forma quedaron definidas dos áreas principales dentro de la imagen, regiones donde estructura (y un cierto ruido) estaban presentes y regiones que sólo presentaban ruido. Asimismo, para definir con mayor precisión tanto los límites (bordes) de cada objeto como estructuras presentes dentro de los objetos se aplicaron filtros Laplacianos y posteriormente umbrales de intensidad. Estos filtros calculan las derivadas primera o segunda de los valores de intensidad (es decir los gradientes de intensidad) en la imagen. Su valor será cero (o cercano a cero) dentro de las zonas de estructura o *background* pero cambiará abruptamente a un valor mayor a cero en las regiones de transición estructura-estructura o en los bordes.

Asimismo, se investigaron las relaciones topológicas entre píxeles adyacentes mediante un análisis de conectividad. En este caso, se inspecciona en forma sistemática la inmediata vecindad de cada píxel, considerándose que todos los píxeles adyacentes que superan el umbral de intensidad límite forman parte de una misma estructura. A su vez, si un píxel posee al menos un píxel vecino por debajo del umbral de intensidad es considerado parte del borde de la estructura. Estos procesos generaron como salida en la interfase visual imágenes binarias (máscaras) representando las estructuras individualizadas, donde cada píxel aparece de color blanco o negro de acuerdo a su definición como parte de un objeto o del fondo, respectivamente.

Por otra parte, la utilización de umbrales en el canal ch02 (DAPI) fue la base para definir las regiones de interés (ROI, *Regions Of Interest*) en cada una de las imágenes. El delimitar ROI en cada *stack* de imágenes resultó imprescindible para poder utilizar al final del proceso el algoritmo de colocalización del IDL7.0/SCIAN_Soft. La lista de filtros empleados fue la siguiente (combinados en diferentes *clusters* según el canal):

First Deviation_ Genera el patrón de intensidades de las derivadas segundas de cada uno de los píxeles en relación a sus píxeles vecinos para un radio de píxel determinado (parámetro que se establece de acuerdo a la naturaleza de la estructura biológica estudiada).

Fill Remove_ Puede rellenar huecos de pequeño tamaño (en número de píxeles) contenidos dentro de objetos (solución de continuidad) y eliminar objetos de un tamaño de píxel menor a un valor determinado presente fuera de objetos.

*Logical Filter*_ Implica la combinación por intermedio de operaciones lógicas (AND, OR, etc.) del resultado de dos *clusters* cualesquiera generando un nuevo resultado en la salida de un tercer *cluster*. Por ejemplo, AND genera como resultado el conjunto intersección de los dos *clusters* mientras que OR genera como resultado el conjunto unión de los mismos.

*Touch Border*_ Elimina los objetos que se encuentran incompletos por hallarse en un borde de la imagen.

Por otro lado, el grupo de trabajo del SCIAN-Lab generó un filtro específico (*plugin* en el IDL7.0/SCIAN_Soft), no existente en la versión original, para solucionar diferencias de iluminación en las imágenes del canal de DAPI (ch02, láser UV) generadas en el equipo confocal del IIBCE (*plugin* denominado DapiLiddle). Este filtro permitió, mediante el escalamiento de los máximos de intensidad de fluorescencia presente en cada núcleo, simular una iluminación homogénea para el canal de DAPI en todo el campo.

La combinación particular de filtros empleada en cada canal para cada uno de los *clusters* así como los valores de los parámetros utilizados en cada uno de ellos fue la siguiente:

Canal	Cluster	Filtro	
Ch 00 (AlexaFluor 488, ser5P-ARN Pol II)	Cluster 0	Threshold	Valores de intensidad: 255 (máximo) 38 (mínimo)
	Cluster 1	First Deviation	Radio de píxel =2
		Threshold	Valores de intensidad: 125 (máximo) 10 (mínimo)
		Fill Remove	Eliminar objetos de tamaño de píxel ≤ 2
	Cluster 2	Logical Filter	AND entre cluster 0_ch00 y cluster 1_ch00
	Cluster 3	Logical Filter	AND entre cluster 2_ch00 y cluster 0_ch02
Ch 01 (Cy3, foci de γ H2AX)	Cluster 0	Threshold	Valores de intensidad: 255 (máximo) 32 (mínimo)
	Cluster 1	First Deviation	Radio de píxel =3
		Threshold	Valores de intensidad: 255 (máximo) 14 (mínimo)
		Fill Remove	Eliminar objetos de tamaño de píxel ≤ 7
	Cluster 2	Logical Filter	AND entre cluster 0_ch01 y cluster 1_ch01
	Cluster 3	Logical Filter	AND entre cluster 2_ch01 y cluster 0_ch02

Ch 02 (DAPI, tinción del núcleo)	Cluster 0 **	<i>DapiLiddle</i>	escalamiento en x=1 escalamiento en y=5
		<i>Threshold</i>	Valores de intensidad: 300 (máximo) 25 (mínimo)
		<i>Fill Remove</i>	Rellenar huecos de tamaño de píxel ≤ 2000 Eliminar objetos de tamaño de píxel ≤ 500
		<i>TouchBorder</i>	-

** La salida del *cluster 0* del canal ch02 (DAPI) fue utilizada como base para definir las ROI (ver sección resultados).

4.5.1.4 Estimación de Daño y ensayos de Colocalización

Una vez obtenidas las máscaras binarias finales correspondientes a cada canal se realizaron los ensayos de cuantificación de colocalización entre los canales ch00 (ser5P-ARN Pol II) y ch01 (*foci* de γ H2AX) en los planos provenientes de núcleos tratados con BLM empleando el algoritmo CDA presente en el IDL 7.0/Scian_Soft en las ROI generadas en base al canal ch02 (DAPI).

Este algoritmo se basa en una modificación de los coeficientes de colocalización de Manders M1 y M2 [Ramírez *et al.* 2010] y permite calcular en planos x-y diferentes coeficientes de colocalización, que hacen posible discriminar entre colocalización, anticlocalización o localización aleatoria según un criterio estadístico. En nuestro caso, se consideraron para evaluar la existencia de colocalización los porcentajes de “ROI intersección en ROI_0” (siendo ROI_0 los píxeles positivos en el canal ch00 de ser5P-ARN Pol II) y de “ROI intersección en ROI_1” (siendo ROI_1 los píxeles positivos en el canal ch01 de *foci* de γ H2AX). En ambos casos “ROI intersección” ($ROI_0 \cap ROI_1$) es el conjunto de los píxeles de solapamiento entre ambos canales.

O sea, el porcentaje de “ROI intersección en ROI_0” es:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para ch00 y ch01}}{\text{píxeles positivos para ch00}} \times 100$$

y el porcentaje de “ROI intersección en ROI_1” es:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para ch00 y ch01}}{\text{píxeles positivos para ch01}} \times 100$$

Estos valores no son dependientes de los valores de intensidad de señal, sino sólo de la presencia o ausencia de señal en cada píxel de las máscaras binarias finales.

Para obtener los escenarios aleatorios de colocación con sus valores respectivos de coeficientes, la máscara de uno de los canales fue desplazada en relación a la máscara del otro canal en las ROI predefinidas; generándose entonces PDF (*Probability Density Functions*) para los indicadores de colocación bajo condiciones de solapamiento aleatorio. De esta forma, pudieron compararse los valores calculados a partir de las imágenes originales (denominados valores iniciales) con los valores aleatorios (*random*) provenientes de las PDF generadas para determinar si los valores iniciales eran estadísticamente significativos en términos de valor-p.

Para cada uno de los 11 *stacks* de imágenes correspondientes a núcleos tratados con BLM se realizó el ensayo de colocación entre las ROI de los canales ch00 (ser5P-ARN Pol II) y ch01 (*foci* de γ H2AX) en tres planos (el plano z de mayor intensidad y dos planos intermedios, uno superior y otro inferior). Para cada plano analizado se obtuvieron tablas y gráficos mostrando el valor inicial, el valor aleatorio central de la PDF y el intervalo con un nivel de confianza del 95% del valor aleatorio tanto de (a) el porcentaje de “ROI intersección en ROI_0” como (b) el porcentaje de “ROI intersección en ROI_1”. La ubicación del valor inicial de (a) o (b) respecto al intervalo de confianza del valor aleatorio de la PDF permitió decidir en cada plano entre los tres escenarios posibles: anticolocación, colocación o relación no significativa entre la localización de ambas señales (localización aleatoria). (a) y (b) conducen indistintamente a un mismo resultado en relación a los escenarios posibles.

Por otra parte, como una medida estadística global para estimar la existencia de colocación se comparó, mediante test de t, el total de valores iniciales con el total de valores aleatorios obtenidos en los planos analizados, tanto dándoles un peso relativo similar como ponderados según el número de ROI presentes en cada plano.

Asimismo, como salida del CDA se obtuvo en cada plano analizado el número de píxeles totales “dañados” dentro de las ROI, es decir, el número de píxeles positivos en la máscara final de ch01 (*foci* de γ H2AX). Para evaluar si existían diferencias significativas en el nivel de daño entre núcleos control y tratados con BLM, se comparó mediante test de t el número promedio de píxeles dañados por ROI (núcleo) entre los planos (n=7) que poseían núcleos control y los planos (n=11) con núcleos tratados.

4.5.2 Núcleos de CHO9 con incorporación de EdU e inmunomarcación de γ H2AX/ H3K4me₃

Se consideraron *stacks* de imágenes procedentes de 2 experimentos desarrollados en idénticas condiciones experimentales en el AG Humangenetik, Biozentrum, Ludwig-Maximilians-Universität (Munich). Las series en z en formato .tif correspondientes a núcleos control (n=72) y tratados con BLM (n=159) obtenidas con el microscopio confocal Leica SP5 TCS II fueron preprocesadas y analizadas con el *software* libre de procesamiento de imágenes Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

4.5.2.1 Procesamiento

En primer lugar se realizó la corrección de una posible aberración cromática en z (desfasaje en z entre diferentes canales) empleando el *plugin StackGroom/zShiftCorrector* a partir del *scanning* en z de bolillas (*beads*) multicolores fluorescentes. Los valores de desfasaje entre diferentes canales obtenidos para un *step size* de 300 nm fueron: DAPI=0; AlexaFluor488=3; Cy3=3, AlexaFluor596=3. Estos valores son siempre números enteros positivos que representan las secciones (planos en z) a ser eliminadas desde el comienzo del *stack* (plano z1). De esta forma, el *plugin* generó nuevos *stacks* de imágenes eliminando los planos z1, z2 y z3 en los canales de AlexaFluor488, Cy3 y AlexaFluor596 y los reemplazó por 3 planos en “negro” al final del *stack*, con el consiguiente desplazamiento relativo de estos canales respecto al canal de DAPI.

En cada canal de los nuevos *stacks* se ajustó el brillo/contraste de forma tal de eliminar las señales de *background* extranucleares. Los valores de intensidad mínimos y máximos para cada canal fueron respectivamente: DAPI 25-255; AlexaFluo488 30-220; Cy3 20-225; AlexaFluor596 25-200 (Experimento 1); DAPI 15-255; AlexaFluo488 40-220; Cy3 25-225; AlexaFluor596 30-200 (Experimento 2). Posteriormente, se empleó el filtro *Gaussian blur*, el cual contribuyó también a la remoción del ruido y al suavizado de las señales al reemplazar el valor original de intensidad de cada píxel por un promedio ponderado (aplicando una función Gaussiana) de los valores de intensidad del propio píxel y de sus píxeles vecinos para un radio determinado (valor en píxeles). De acuerdo a la naturaleza de las estructuras biológicas implicadas se empleó para todos los canales de fluorescencia un radio de 0,7.

En las series de *stacks* modificados se realizó un cortado rectangular manual (*crop*) con dos objetivos: por una parte generar *stacks* de célula única (en aquellos que contenían 2 ó 3 células) y por otra parte eliminar extensas áreas en negro circundantes al núcleo. Este proceso implicó una disminución del formato de 512 x 512 píxeles que presentaba originalmente cada *stack*, lo cual permitió aplicar adecuadamente los algoritmos computacionales necesarios (ver más abajo) de acuerdo a la capacidad de memoria RAM

de los equipos utilizados. Finalizada esta etapa se generó un *microstack* (8 planos consecutivos) a partir de cada *stack* conteniendo las zonas medias y centrales del núcleo empleando el *plugin Stacks-Reducing*.

A partir de los *microstacks* se generaron máscaras (imágenes binarias) para cada uno de los canales empleando umbrales de intensidad (*thresholds*). Como se mencionó anteriormente, una imagen binaria es una imagen digital que tiene solamente dos valores posibles para cada píxel, donde uno de los valores representa los objetos de la imagen mientras que el otro representa el fondo de la misma. Se utilizaron los colores blanco y negro para representar los objetos y el fondo respectivamente. Los valores de umbral de intensidad empleados en cada canal fueron: DAPI 35; AlexaFluo488 15 (para ES) 25 (para LS); Cy3 25; AlexaFluo596 25 (Experimento 1). DAPI 35; AlexaFluo488 25 (para ES) 35 (para LS); Cy3 30; AlexaFluo596 30 (Experimento 2).

4.5.2.2 Clasificación de los núcleos en fases G1/G2, ES y LS

Se discriminaron los núcleos a analizar en replicantes (fase S) o no replicantes (fases G1/G2) por la presencia o ausencia de marcación con EdU respectivamente. A su vez, los núcleos replicantes se discriminaron en ES y LS por la observación visual de los patrones de replicación según su localización en regiones centrales o bien en cromocentros y regiones periféricas del núcleo (eu- o heterocromatina, respectivamente).

La validez de este criterio de clasificación se confirmó mediante el cálculo del porcentaje de cromatina replicante que se localizaba en regiones de EC (área H3K4me₃+ ∩ área EdU+) respecto al total de cromatina replicante (área EdU+). O sea:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para H3K4me}_3 \text{ y EdU}}{\text{número total de píxeles positivos para EdU}}$$

El total de núcleos control y tratados con BLM analizados se detalla en la Tabla 1.

	Experimento 1	Experimento 2	Totales por Fase
BLM_G1/G2	23	35	58
BLM_ES	12	30	42
BLM_LS	26	33	59
BLM_Totales por experimento	61	98	159
C_G1/G2	15	17	32
C_ES	11	11	22
C_LS	4	14	18
C_Totales por experimento	30	42	72

Tabla 1.- Total de núcleos control y tratados con bleomicina analizados, discriminados por experimento y fase del ciclo celular. **BLM:** núcleos tratados con bleomicina. **C:** núcleos control. **G1/G2:** núcleos en fases G1 ó G2. **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía.

4.5.2.3 Evaluación de daño total y cromatina replicante en núcleos control y tratados

Utilizando las máscaras binarias se compararon los núcleos control y tratados en términos de área nuclear total dañada (% de área γ H2AX+ en área DAPI+) y de fracción de cromatina replicante (% de área EdU+ en área DAPI+).

4.5.2.4 Análisis de Colocalización

Utilizando los *microstacks* de célula única se evaluó la colocalización entre:

- (i) cromatina dañada (*foci* de γ H2AX) y cromatina replicante (regiones EdU positivas)
- (ii) cromatina dañada (*foci* de γ H2AX) y EC (regiones H3K4me₃ positivas)

En concordancia con Ronneberger *et al.* [2008] se consideró la colocalización de dos señales fluorescentes en una imagen digital como su tendencia a coexistir en el mismo conjunto de píxeles.

Para la evaluación de colocalización se emplearon dos aproximaciones diferentes:

- a) El cálculo del ICQ (*Intensity Correlation Quotient*) empleando el algoritmo ICA (*Intensity Correlation Algorithm*).
- b) El análisis de áreas de píxeles solapantes entre máscaras binarias.

a) Cálculo del ICQ

En cada *microstacks* se seleccionó manualmente una ROI delimitando los núcleos contrateñidos con DAPI para aplicar el algoritmo ICA disponible en Image J. Este algoritmo (desarrollado por Li *et al.* 2004) se basa en lo siguiente: si dos fluorocromos colocalizan sus valores de intensidad en un píxel determinado tenderán a estar ambos por encima del valor medio o bien por debajo del mismo. Para estimar la colocalización, el algoritmo ICA utiliza los valores de PDM (producto de las diferencias respecto a las medias) para cada píxel de la imagen.

$PDM = (A_i - a) \cdot (B_i - b)$ donde A_i y B_i son las intensidades en cada canal para cada píxel i que compone la imagen mientras que a y b son las medias aritméticas de intensidad en cada canal para la imagen completa. Para la estimación cuantitativa de la colocalización se determina el ICQ. El ICQ es la proporción de píxeles donde el PDM es positivo respecto al número total de píxeles considerados (valores entre 0 y 1) al cual se le resta 0.5 (para generar valores entre -0.5 y +0.5).

Usando la aproximación normal para el test de signos se ha determinado que para un número de ROI $n > 5$ son válidos los siguientes intervalos respecto a la interpretación de los valores de ICQ [Li *et al.* 2004]:

-0.05<ICQ<+0.05 (*random*, localización aleatoria de uno respecto al otro)

+0.05<ICQ≤+0.5 (dependencia, colocalización)

-0.05>ICQ≥-0.5 (exclusión, anti-colocalización)

Junto al cálculo del ICQ se obtuvieron como salida del ICA dos tipos de *stacks* de imágenes denominados:

+ve PDMs only, el cual muestra los píxeles de la imagen que presentan un PDM+ en dos *stacks* de imágenes diferentes (en el primer *stack* se visualizan los píxeles donde ambos valores son positivos; mientras que en el segundo se visualizan los píxeles donde ambos valores son negativos).

PDM image, el cual muestra simultáneamente en cada plano del *stack* en colores diferentes los píxeles con valores de PDM positivo donde ambos valores de píxel son positivos; los píxeles con valores de PDM positivo donde ambos valores de píxel son negativos y los valores con PDM negativos (amarillo, marrón, y celeste respectivamente).

Para evaluar la colocalización entre cromatina dañada y cromatina replicante, se calculó el ICQ entre las señales de γ H2AX y EdU en las ROI de los núcleos tratados en fases ES (n=42) y LS (n=59). En cada *microstack* se calculó el ICQ trazando ROI de forma tal que el núcleo quedara comprendido dentro de la ROI en todos los planos. Asimismo, en un plano particular de cada *microstack* se delimitaron ROI manuales específicas para ese plano y se determinó su ICQ particular para verificar si existía una diferencia significativa respecto al valor obtenido para todo el *microstack*. Por otra parte, en una fracción de núcleos ES (n=15) y LS (n=15) se determinaron los ICQ en 4 planos individuales del *stack* dibujando ROI que no incluían el/los nucléolo(s) que los núcleos poseían. El valor promedio obtenido fue comparado con el valor obtenido para todo el *microstack* para determinar si la presencia de nucléolos (áreas doble negativas de tamaño considerable) ejercían un efecto (sesgo) significativo sobre los valores de ICQ calculados.

Análogamente, para evaluar la colocalización entre *foci* de γ H2AX y el compartimento eucromático, se calculó el ICQ entre las señales de γ H2AX y H3K4me₃ en las ROI de los núcleos tratados en fases ES (n=42), LS (n=59) y G1/G2 (n=58). En cada *microstack* se calculó el ICQ trazando ROI de forma tal que el núcleo quedara comprendido dentro de la ROI en todos los planos. Asimismo, en un plano particular de cada *microstack* se delimitaron ROI manuales específicas para ese plano y se determinó su ICQ particular para verificar si existía una diferencia significativa respecto al valor obtenido para todo el *microstack*.

b) Análisis de áreas de solapamiento en máscaras binarias

Como un enfoque alternativo para explorar si existía una tendencia hacia la localización de los *foci* en los dominios de replicación, se utilizaron las máscaras binarias para determinar en cada núcleo ES y LS las siguientes proporciones:

(a) Proporción de regiones replicantes dañadas (área γ H2AX+ \cap área EdU+) en el total de cromatina dañada (área γ H2AX+). O sea:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para EdU y } \gamma\text{H2AX}}{\text{número total de píxeles positivos para } \gamma\text{H2AX}}$$

(b) Proporción de cromatina replicante (área EdU+) en el núcleo (área DAPI+). O sea:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para EdU}}{\text{número total de píxeles positivos para DAPI}}$$

Para analizar la relación γ H2AX *versus* EdU se calculó posteriormente en cada núcleo el cociente (a):(b) y la media aritmética de los cocientes para cada población celular. Si la marcación de γ H2AX se distribuye aleatoriamente en el núcleo respecto a las zonas replicantes se observarán cocientes en el entorno de 1. Valores significativamente mayores o menores que 1 indicarán una tendencia a colocalizar o anticlocalizar respectivamente. En este sentido, para un valor X del cociente diremos que « γ H2AX mapea X veces más de lo esperado por azar en las zonas replicantes».

Asimismo, para analizar si existía una tendencia hacia la localización de los *foci* en la EC, se utilizaron las máscaras binarias para determinar en cada núcleo en G1/G2, ES y LS las siguientes proporciones:

(a) Proporción de EC dañada (área γ H2AX+ \cap área H3K4me₃+) en el total de cromatina dañada (área γ H2AX+). O sea:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para H3K4me}_3 \text{ y } \gamma\text{H2AX}}{\text{número total de píxeles positivos para } \gamma\text{H2AX}}$$

(b) Proporción de EC dañada (área H3K4me₃+) en el núcleo (área DAPI+). O sea:

$$\frac{\text{número de píxeles positivos para H3K4me}_3}{\text{número total de píxeles positivos para DAPI}}$$

Para analizar la relación γ H2AX *versus* H3K4me₃ se calculó posteriormente en cada núcleo el cociente (a):(b) y la media aritmética de los cocientes para cada población celular. Si la marcación de γ H2AX se distribuye aleatoriamente en el núcleo respecto a las zonas de EC se observarán cocientes en el entorno de 1. Valores significativamente mayores o menores que 1 indicarán una tendencia a colocalizar o anticlocalizar, respectivamente. En este

sentido, para un valor X del cociente diremos que « γ H2AX mapea X veces más de lo esperado por azar en las regiones de EC».

4.5.2.5 Análisis Estadísticos

Se utilizó el programa estadístico SPSS (versión PASW Statistics 18) para determinar (con un nivel de confianza del 95%) si:

- 1) la fracción de cromatina replicante que se ubicaba en regiones de EC difería entre los núcleos clasificados como ES y LS (test de t para muestras independientes).
- 2) el porcentaje de área nuclear dañada y de regiones de cromatina replicante difería entre las células control y las células tratadas con BLM (test de t para muestras independientes).
- 3) el nivel de daño entre las diferentes fases del ciclo celular en células tratadas era similar (ANOVA de un factor).
- 4) las medias aritméticas de los cocientes de las relaciones γ H2AX *versus* EdU y γ H2AX *versus* H3K4me₃ en cada fase (G1/G2, ES y LS) diferían entre los dos experimentos realizados (test de t para muestras independientes).
- 5) las medias aritméticas de los cocientes de la relación γ H2AX *versus* EdU diferían entre las fases ES y LS (test de t para muestras independientes).
- 6) las medias aritméticas de los cocientes de la relación γ H2AX *versus* H3K4me₃ diferían entre las fases G1/G2, ES y LS (ANOVA de un factor y test *post hoc* para comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni).
- 7) las medias aritméticas de los cocientes γ H2AX *versus* EdU y γ H2AX *versus* H3K4me₃ en cada categoría diferían significativamente de 1 (prueba t para una muestra contra valor de prueba =1).
- 8) los valores promedio de ICQ en los *microstacks* para las relaciones γ H2AX *versus* EdU y γ H2AX *versus* H3K4me₃ diferían entre los dos experimentos realizados (test de t para muestras independientes).
- 9) los valores de ICQ para las relaciones γ H2AX *versus* EdU y γ H2AX *versus* H3K4me₃ en planos individuales diferían respecto a los valores de ICQ obtenidos en los *microstack* correspondientes en cada fase del ciclo celular (test de t para muestras independientes).
- 10) los valores promedio de los ICQ para la relación γ H2AX *versus* EdU en planos individuales, donde se eliminaron los nucléolos de las ROI diferían respecto a los valores de ICQ obtenidos en el *microstack* correspondiente.

5. Resultados

5.1 Núcleos de CHO9 inmunomarcados para γ H2AX/ser5P-ARN Pol II

5.1.1 Deconvolución, segmentación y determinación de ROI en los stacks de imágenes

Se deconvolucionaron y segmentaron un total de 18 *stacks* de imágenes de núcleos control (7 *stacks*) o tratados con BLM (11 *stacks*) procedentes de 3 experimentos para cada canal de fluorescencia en que las imágenes fueron tomadas (ch00-verde: *foci* de ser5P-ARN Pol II, ch01-rojo: *foci* de γ H2AX y ch02-azul: DAPI).

A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos en los sucesivos procesos de deconvolución y segmentación para un plano correspondiente a un *stack* de núcleos control (Figuras 6, 8, 9, 10) y para un plano correspondiente a un *stack* de núcleos tratados (Figuras 7, 8, 9, 10). Para todos los *stacks* de imágenes analizados se procedió en forma análoga empleando los mismos parámetros de deconvolución y secuencia de filtros por canal de fluorescencia.

Imágenes obtenidas luego de la deconvolución

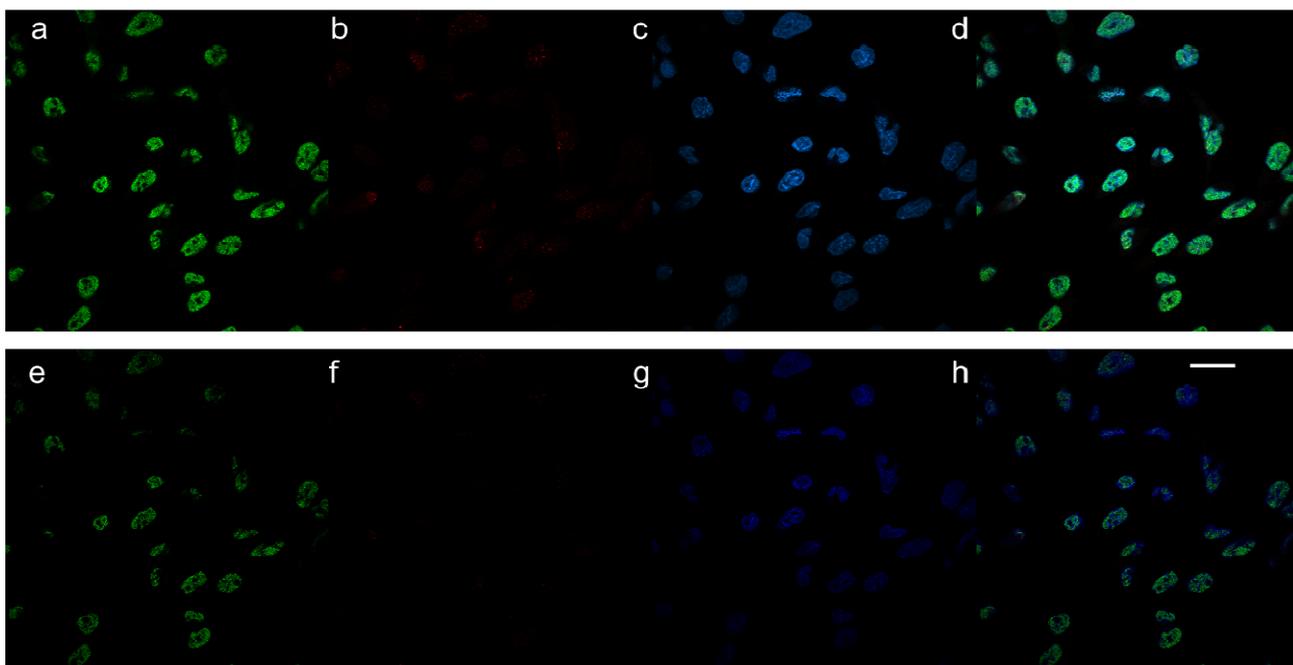


Figura 6.- Imágenes correspondientes a un plano conteniendo núcleos control de CHO9. Los paneles **a-c** ilustran las imágenes originales tomadas en el equipo confocal Olympus BX-61 FV300 del IIBCE mientras que los paneles **e-g** ilustran las correspondientes imágenes deconvolucionadas con el programa *Huygens Scripting* en los canales ch00 (**a** y **e**; verde = *foci* de ser5P-ARN Pol II), ch01 (**b** y **f**; rojo = *foci* de γ H2AX) y ch02 (**c** y **g**; azul = DAPI). Los paneles (**d**) y (**h**) ilustran la superposición de las tres señales de fluorescencia en las imágenes originales y deconvolucionadas respectivamente. Barra = 10 μ m.

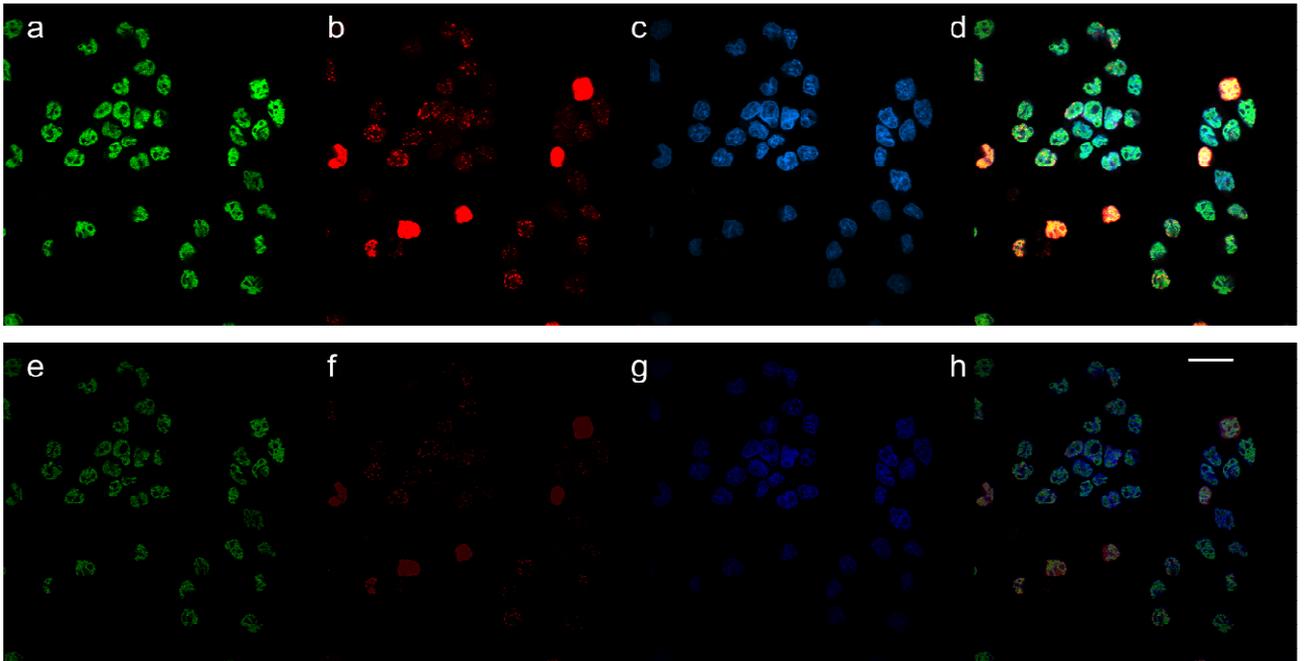


Figura 7.- Imágenes correspondientes a un plano conteniendo núcleos tratados con BLM de CHO9. Los paneles **a-c** ilustran las imágenes originales tomadas en el equipo confocal Olympus BX-61 FV300 del IIBCE mientras que los paneles **e-g** ilustran las correspondientes imágenes deconvolucionadas con el programa *Huygens Scripting* en los canales ch00 (**a** y **e**; verde = *foci* de ser5P-ARN Pol II), ch01 (**b** y **f**; rojo = *foci* de γ H2AX) y ch02 (**c** y **g**; azul = DAPI). Los paneles (**d**) y (**h**) ilustran la superposición de las tres señales de fluorescencia en las imágenes originales y deconvolucionadas respectivamente. Barra = 10 μ m.

Imágenes obtenidas luego de la segmentación

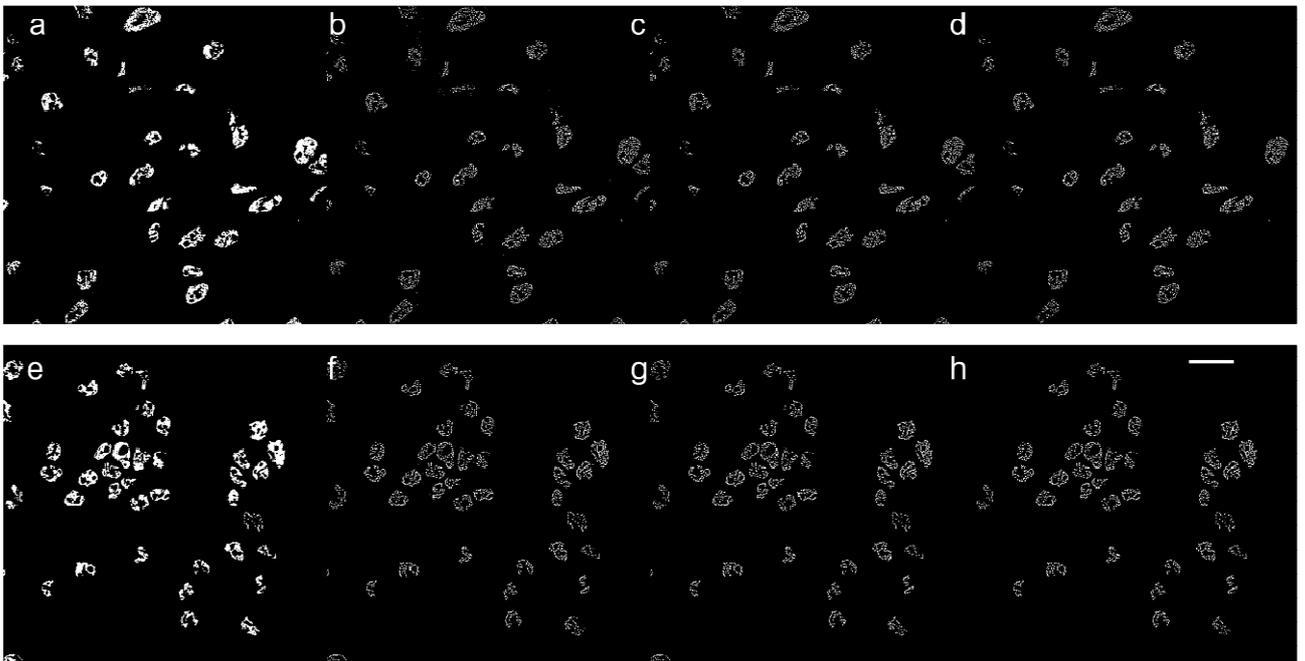


Figura 8.- Imágenes obtenidas luego de realizar la segmentación con el programa *SCIAN_Soft* en IDL 7.0 en el canal ch00 (*foci* de ser5P-ARN Pol II) de planos conteniendo núcleos de CHO9 control (paneles **a-d**) y tratados con BLM (paneles **e-h**). Los paneles (**a**, **e**); (**b**, **f**); (**c**, **g**); y (**d**, **h**) ilustran las imágenes de salida de los *clusters* de segmentación 0, 1, 2 y 3 respectivamente. Barra = 10 μ m.

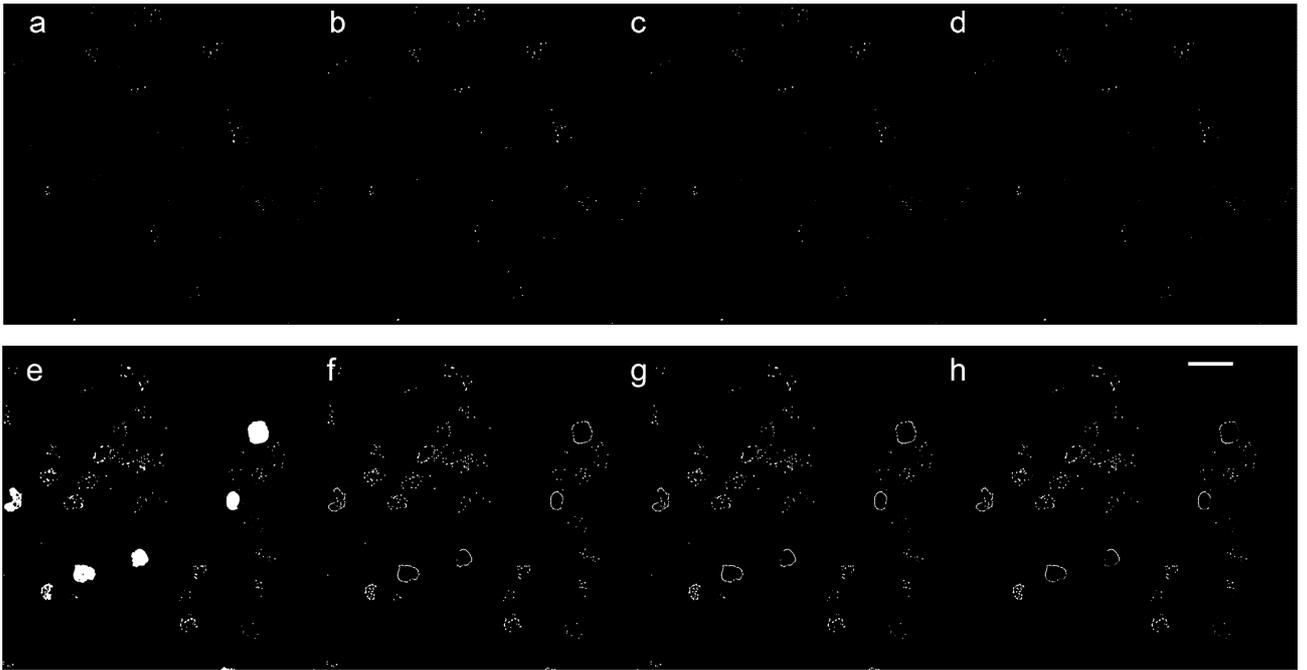


Figura 9.- Imágenes obtenidas luego de realizar la segmentación con el programa SCIAN_Soft en IDL 7.0 en el canal ch01 (*foci* de γ H2AX) de planos conteniendo núcleos de CHO9 control (paneles **a-d**) y tratados con BLM (paneles **e-h**). Los paneles (**a, e**); (**b, f**); (**c, g**); y (**d, h**) ilustran las imágenes de salida de los *clusters* de segmentación 0, 1, 2 y 3 respectivamente. Barra = 10 μ m.

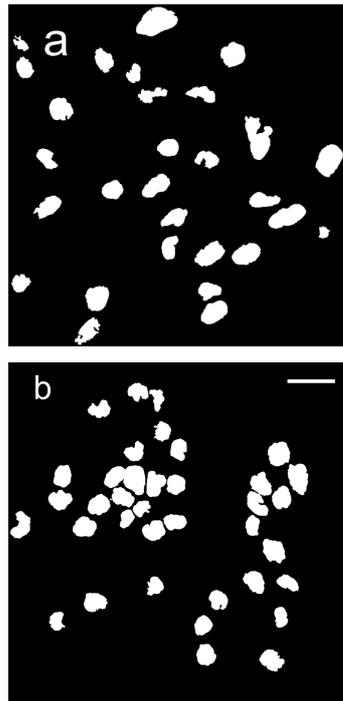


Figura 10.- Imágenes de salida del *cluster* 0 (único *cluster*) obtenidas luego de realizar la segmentación con el programa SCIAN_Soft en IDL 7.0 en el canal ch02 (DAPI) de planos conteniendo núcleos de CHO9 control (panel **a**) y tratados con BLM (panel **b**). Barra = 10 μ m.

Para definir en cada imagen las ROI donde aplicar el algoritmo CDA se utilizó como base la salida del *cluster* 0 del canal ch02 (DAPI). A partir de estas imágenes (Figura 10) se eliminaron manualmente los núcleos que en el canal ch01 presentaban una señal uniforme de γ H2AX en todo el núcleo, obteniéndose nuevas imágenes que contenían únicamente las ROI donde aplicar el CDA, es decir, el conjunto de núcleos que presentaban *foci* de γ H2AX claramente definidos.

Como los núcleos que presentaban *foci* de γ H2AX en toda su extensión no se observaron en los controles (Figura 11) el número de ROI coincidió con el número de núcleos de la salida del *cluster* 0 del canal de DAPI. Por otro lado, en los planos procedentes de *stacks* de núcleos tratados con BLM, la población de núcleos con marcación pan-nuclear de γ H2AX constituyó el 21,4% del total (74 en 345). Por tanto, se analizaron los 271 (79,6%) núcleos (ROI) restantes.

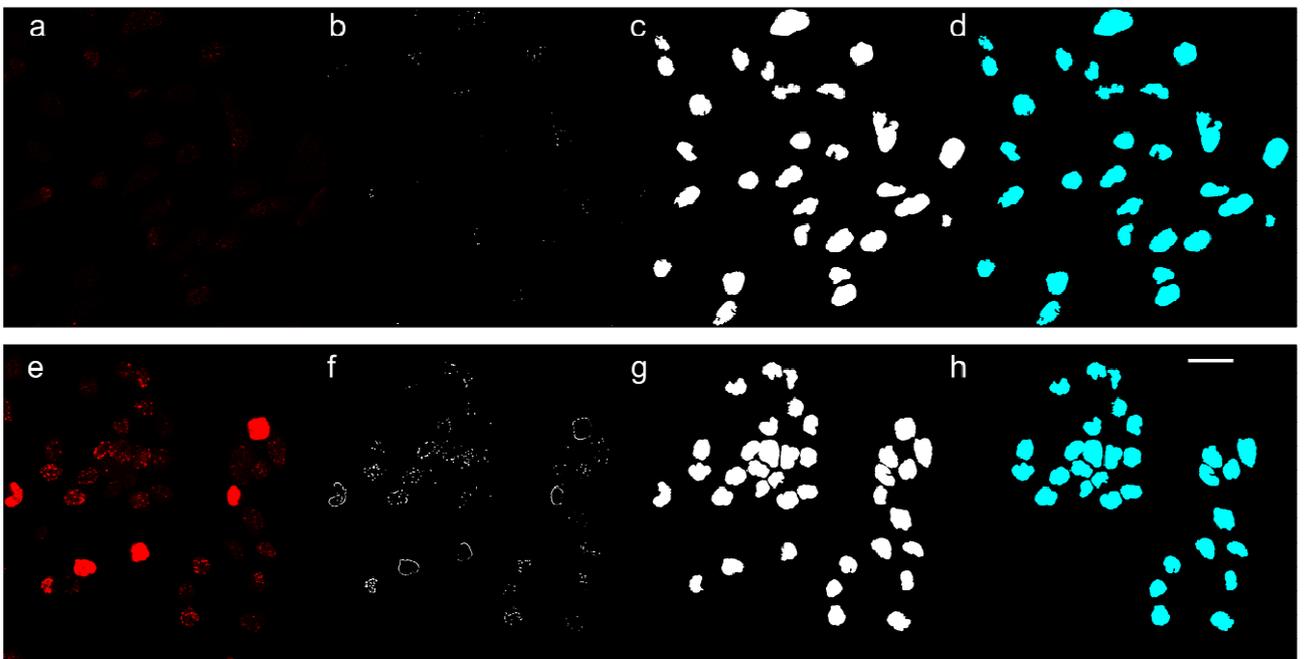


Figura 11.- Determinación de las ROI a analizar con el algoritmo CDA en un plano conteniendo núcleos control (paneles **a-d**) y en un plano conteniendo núcleos tratados con BLM de CHO9 (paneles **e-h**). Los paneles (**a**, **e**) ilustran las imágenes originales tomadas en el equipo confocal del IIBCE en el canal ch01 (*foci* de γ H2AX), los paneles (**b**, **f**) las imágenes salida del *cluster* 3 de ch01 (final de la segmentación); los paneles (**c**) y (**g**) las imágenes salidas del *cluster* 0 de ch02 (imágenes base para determinar las ROI) y los paneles (**d**) y (**h**) las ROI empleadas para ejecutar el algoritmo CDA. Barra = 10 μ m.

5.1.2 Determinación de nivel de daño y colocalización entre foci de γ H2AX y foci de ser5P-ARN Pol II

En tres planos de cada *stack* de imágenes de núcleos control o tratados con BLM se aplicó el algoritmo CDA presente en el IDL 7.0/Scian_Soft entre los canales ch00 (*foci* de ser5P-ARN Pol II) y ch01 (*foci* de γ H2AX) utilizando las ROI generadas a partir del canal ch02 (DAPI). Como salida de este algoritmo se obtuvieron tablas y gráficos que permitieron determinar el nivel de daño en cada plano analizado y, para los 11 *stacks* correspondientes a núcleos tratados con BLM, evaluar la colocalización entre *foci* de ser5P-ARN Pol II y *foci* de γ H2AX.

A modo de ejemplo se muestran las tablas de resultados (Figura 12) y los gráficos obtenidos (Figura 13) luego de aplicar el algoritmo CDA en un plano proveniente de un *stack* de imágenes con núcleos tratados.

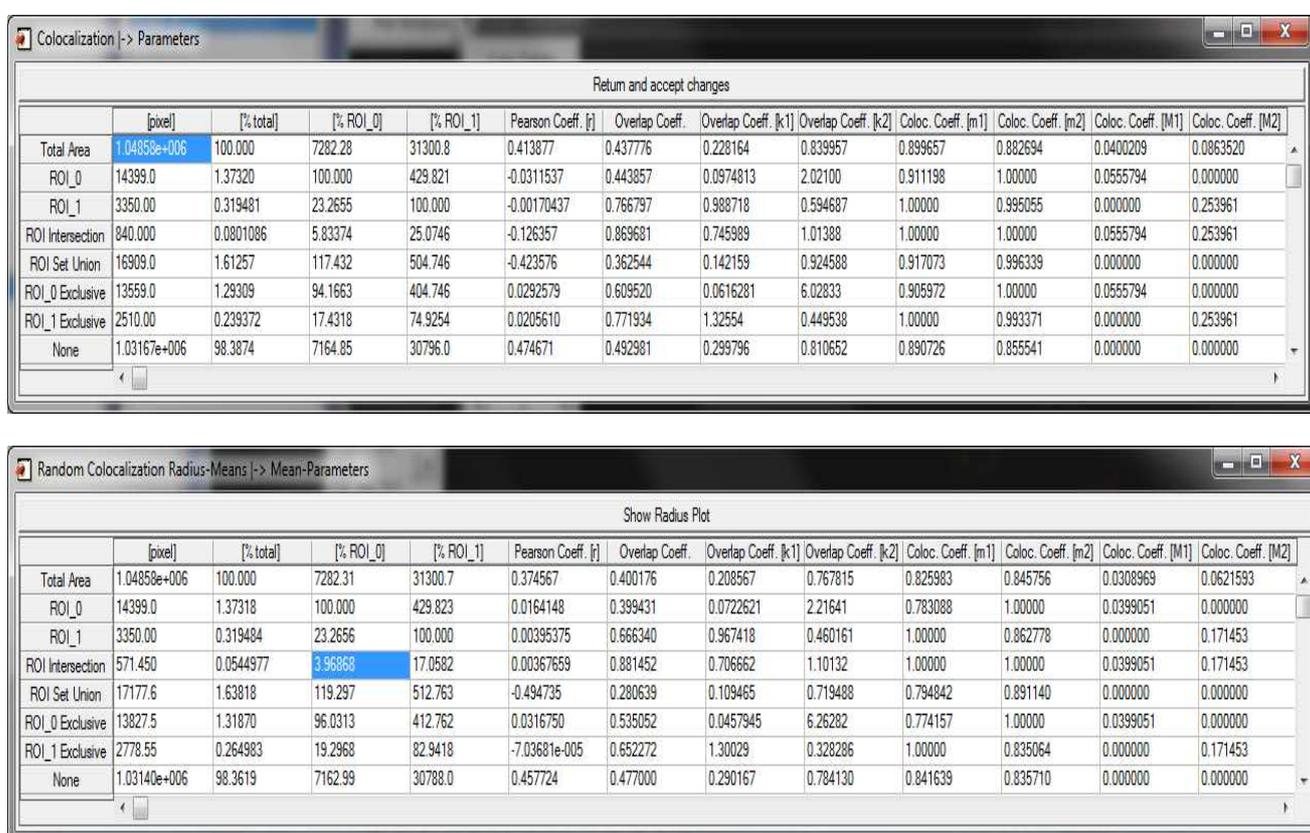


Figura 12.- Tablas de resultados obtenidas luego de aplicar el algoritmo CDA en un plano proveniente de un *stack* de imágenes con núcleos tratados entre los canales ch00 (*foci* de ser5P-ARN Pol II) y ch01 (*foci* de γ H2AX) utilizando las ROI generadas a partir del canal ch02 (DAPI). (**superior**) Tabla de valores iniciales (calculados a partir de las imágenes originales). (**inferior**) Tabla de valores aleatorios (producto del desplazamiento de la máscara de uno de los canales en relación a la máscara del otro canal en las ROI predefinidas). En cada tabla se destacan los valores de: número de píxeles en ROI_1 (número de píxeles “dañados”, primera columna, tercera fila), “ROI intersección en ROI_0” (tercera columna, cuarta fila) y “ROI intersección en ROI_1” (cuarta columna, cuarta fila).

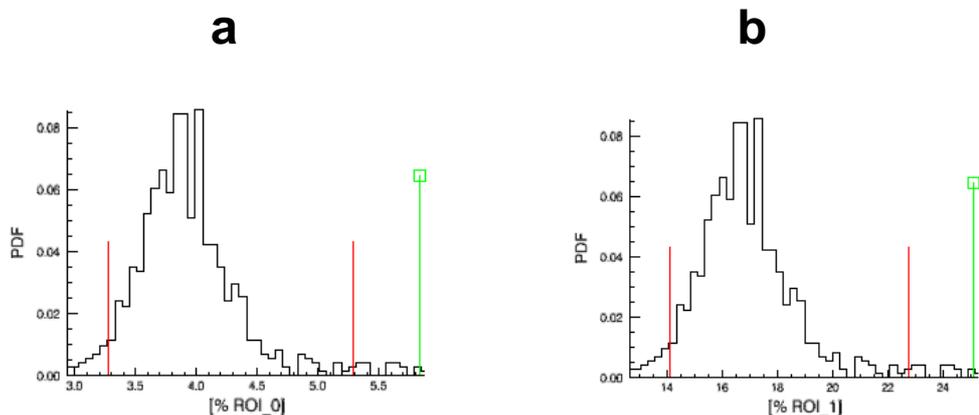


Figura 13.- Gráficos de las PDF (*Probability Density Functions*) generadas bajo condiciones de solapamiento aleatorio luego de aplicar el algoritmo CDA en un plano proveniente de un *stack* de imágenes con núcleos tratados en función de: (a) “ROI intersección en ROI_0” y (b) “ROI intersección en ROI_1”. Se observa en ambos casos el valor inicial (línea verde) y el intervalo de valores aleatorios posibles de la PDF (líneas rojas) con un nivel de confianza del 95%. La ubicación del valor inicial respecto al intervalo de confianza permitió discernir entre los tres escenarios posibles: colocalización (línea verde a la derecha del intervalo); anticlocalización (línea verde a la izquierda del intervalo) o relación no significativa (línea verde dentro del intervalo). Los gráficos (a) y (b) conducen indistintamente a un mismo resultado en relación a los escenarios posibles.

Como se observa en la Tabla 2, la media de los promedios de píxeles “dañados” por ROI en los planos conteniendo células tratadas fue significativamente mayor que en los planos de células control (~ 9 veces; BLM: 89.48; C: 9.68), evidenciando un aumento significativo ($p < 0.001$) de *foci* de γ H2AX debido al tratamiento con BLM.

Stack de imágenes	Categoría	Plano analizado	Número de píxeles “dañados”	Nº de núcleos totales	Nº de ROI por plano	Número promedio de píxeles “dañados” por ROI
Exp_1_stack_1	Tratado	Z17	1846	27	18	102,56
		Z19	1774	27	18	98,56
		Z21	1911	27	18	106,17
Exp_1_stack_2	Tratado	Z13	1839	37	30	61,30
		Z15	1619	37	30	53,97
		Z17	1615	37	30	53,83
Exp_1_stack_3	Tratado	Z11	2249	44	33	68,15
		Z13	2489	44	33	75,42
		Z15	2118	44	33	64,18
Exp_1_stack_4	Control	Z10	159	18	18	8,83
		Z12	177	18	18	9,83
		Z14	229	18	18	12,72
Exp_1_stack_5	Control	Z10	274	35	35	7,83
		Z12	248	35	35	7,09
		Z14	197	35	35	5,63
Exp_1_stack_6	Control	Z10	174	16	16	10,88
		Z12	126	16	16	7,88
		Z14	184	16	16	11,50

Exp_2_stack_1	Tratado	Z13	2485	32	28	88,75
		Z15	2212	32	28	79,00
		Z17	1871	32	28	66,82
Exp_2_stack_2	Tratado	Z11	2744	33	27	101,63
		Z13	2800	33	27	103,70
		Z15	2651	33	27	98,19
Exp_2_stack_3	Tratado	Z12	3512	37	31	113,29
		Z14	3350	37	31	108,06
		Z16	3016	37	31	97,29
Exp_2_stack_4	Tratado	Z16	3262	36	25	130,48
		Z18	3150	36	25	126,00
		Z20	2497	36	25	99,88
Exp_2_stack_5	Control	Z9	383	27	27	14,19
		Z11	322	27	27	11,93
		Z13	260	27	27	9,63
Exp_2_stack_6	Control	Z9	131	28	28	4,68
		Z11	190	28	28	6,79
		Z13	186	28	28	6,64
Exp_3_stack_1	Tratado	Z9	1715	33	21	81,67
		Z11	1464	33	21	69,71
		Z13	1495	33	21	71,19
Exp_3_stack_2	Tratado	Z11	846	29	27	31,33
		Z13	677	29	27	25,07
		Z15	853	29	27	31,59
Exp_3_stack_3	Tratado	Z8	3188	21	17	187,53
		Z10	2600	21	17	152,94
		Z12	2198	21	17	129,29
Exp_3_stack_4	Tratado	Z8	2905	16	14	207,50
		Z10	2207	16	14	157,64
		Z12	1592	16	14	113,71
Exp_3_stack_5	Control	Z8	220	27	27	8,15
		Z10	223	27	27	8,26
		Z12	207	27	27	7,67
Exp_3_stack_6	Control	Z12	700	34	34	20,59
		Z14	458	34	34	13,47
		Z16	326	34	34	9,59

Tabla 2.- Número de píxeles “dañados” (positivos en la máscara final del canal ch01 correspondiente a *foci* de γ H2AX), número de núcleos totales, número de ROI consideradas y número promedio de píxeles “dañados” por ROI en cada plano analizado proveniente de *stacks* de imágenes conteniendo núcleos control o tratados con BLM.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de colocalización entre las señales de ser5P-ARN Pol II y *foci* de γ H2AX en los planos provenientes de núcleos tratados con BLM.

Stack de imágenes	Plano analizado	“ROI intersección en ROI_0” inicial	“ROI intersección en ROI_0” aleatorio	“ROI intersección en ROI_1” inicial	“ROI intersección en ROI_1” aleatorio	Nº de ROI por plano	Resultado de ser5P-ARN Pol II (ch00) versus γH2AX (ch01)
Exp_1_stack_1	Z17	5,90728	4,1225	12,8386	8,95964	18	Colocalizacion
	Z19	6,11111	3,94292	14,8816	9,60170	18	Colocalizacion
	Z21	7,12342	4,16248	15,0706	8,80633	18	Colocalizacion
Exp_1_stack_2	Z13	2,78445	2,51538	9,46166	8,54738	30	Colocalizacion
	Z15	2,81808	2,51738	10,4385	9,32475	30	No significativo
	Z17	3,75996	2,80666	12,5697	9,38276	30	No significativo
Exp_1_stack_3	Z11	4,01438	2,88599	17,8746	12,8503	33	Colocalizacion
	Z13	4,29903	3,22466	17,2358	12,9284	33	Colocalizacion
	Z15	3,92206	3,0889	14,9197	11,7504	33	No significativo
Exp_2_stack_1	Z13	4,22757	3,35644	16,1771	12,8436	28	No significativo
	Z15	4,4391	2,86282	18,3544	11,8370	28	Colocalizacion
	Z17	3,89719	2,38761	17,4238	10,6747	28	Colocalizacion
Exp_2_stack_2	Z11	4,52814	3,5461	15,1604	11,8724	27	No significativo
	Z13	4,34087	3,41326	13,5714	10,6713	27	No significativo
	Z15	5,06314	3,40415	15,5790	10,4744	27	Colocalizacion
Exp_2_stack_3	Z12	5,76149	4,29416	23,6333	17,6144	31	Colocalizacion
	Z14	5,83374	3,96868	25,0746	17,0582	31	Colocalizacion
	Z16	5,89619	4,00752	23,2759	15,8201	31	Colocalizacion
Exp_2_stack_4	Z16	6,62806	4,64336	19,6505	13,7664	25	Colocalizacion
	Z18	6,68395	4,44486	18,8254	12,5190	25	Colocalizacion
	Z20	5,9658	4,03433	18,8626	12,7557	25	Colocalizacion
Exp_3_stack_1	Z9	3,37437	2,72891	17,9009	14,4768	21	No significativo
	Z11	2,84704	2,31319	19,8087	16,0944	21	No significativo
	Z13	3,54593	2,71654	20,2676	15,5270	21	Colocalizacion
Exp_3_stack_2	Z11	0,895866	0,855421	12,8842	12,3025	27	No significativo

	Z13	0,370758	0,562231	5,76071	8,73575	27	No significativo
	Z15	0,645232	0,830421	6,91676	8,90197	27	No significativo
Exp_3_stack_3	Z8	4,74011	3,92329	18,1932	15,0581	17	Colocalizacion
	Z10	3,80426	3,5402	17,4615	16,2495	17	No significativo
	Z12	4,35550	3,89890	16,8335	15,0688	17	No significativo
Exp_3_stack_4	Z7	6,23206	5,45439	20,9294	18,3178	14	No significativo
	Z9	5,03382	4,49845	17,5351	15,6702	14	No significativo
	Z11	5,31954	4,09332	18,0905	13,9204	14	Colocalizacion

Tabla 3.- Porcentajes de: “ROI intersección en ROI_0” inicial, “ROI intersección en ROI_0” aleatorio (valor central), “ROI intersección en ROI_1” inicial, “ROI intersección en ROI_1” aleatorio (valor central), número de ROI consideradas y resultados del ensayo de colocalización entre ser5P-ARN Pol II y *foci* de γ H2AX en cada plano analizado proveniente de *stacks* de imágenes conteniendo núcleos tratados con BLM. La ubicación del valor inicial respecto al intervalo de confianza de los valores aleatorios posibles de “ROI intersección en ROI_0” o “ROI intersección en ROI_1” permitió discernir entre los tres escenarios posibles: colocalización; anticlocalización o relación no significativa.

La comparación de los valores iniciales con los respectivos intervalos de confianza al 95% para los valores aleatorios determinó la colocalización de *foci* de ser5P-ARN Pol II y *foci* de γ H2AX en 18 de los 33 planos analizados (54% del total) y una relación no significativa entre la localización de ambas señales en los 15 planos restantes (localización aleatoria).

Por otra parte, la comparación global mediante test de t en los planos analizados, del total de valores iniciales respecto al total de valores centrales de los intervalos de confianza de los valores aleatorios obtenidos (tanto dándoles un peso relativo similar como ponderado según el número de ROI presentes por plano) reveló un porcentaje de “ROI intersección en ROI_0” inicial (y “ROI intersección en ROI_1” inicial) significativamente superior al porcentaje de “ROI intersección en ROI_0” aleatorio (y “ROI intersección en ROI_1” aleatorio) en ambos casos ($p=0.006$ y $p=0.003$; ponderado por el número de ROI y sin ponderar, respectivamente). Estos resultados indican una tendencia global a la colocalización de los *foci* de ser5P-ARN Pol II y los *foci* de γ H2AX en los núcleos tratados con BLM.

5.2 Núcleos de CHO9 con incorporación de EdU e inmunomarcación de γ H2AX/ H3K4me₃

5.2.1 Porcentaje de cromatina replicante en regiones de eucromatina en núcleos ES y LS (tratados y controles)

El análisis en las máscaras binarias de las áreas de píxeles solapados en los núcleos clasificados como ES y LS evidenció una diferencia significativa en la fracción replicante localizada en regiones de EC (ES 68.5%; LS 24.0%; $p < 0.001$); confirmando la correcta clasificación realizada de los núcleos replicantes en ES y LS en base a la observación de los patrones de replicación nucleares (Tabla 4). Como se observa en las Figuras 14 y 15, la mayoría de las regiones replicantes de núcleos ES mapea en dominios eucromáticos mientras que en núcleos LS las regiones de cromatina replicante localizadas en EC son comparativamente escasas.

	N	área H3K4me ₃ (+) \cap área EdU (+)/ área EdU (+)
ES	64	0.685
LS	77	0.240

Tabla 4.- Determinación de regiones replicantes (EdU positivas) en relación a regiones de EC (H3K4me₃ positivas) utilizando máscaras binarias. Valores promedio agrupados por categoría de la fracción de cromatina replicante localizada en regiones eucromáticas: área H3K4me₃ (+) \cap área EdU (+)/área EdU (+). **ES:** núcleos en fase S-temprana control o tratados con BLM; **LS:** núcleos en fase S-tardía control o tratados con BLM; **n:** número de células analizadas. (+): áreas positivas en máscaras binarias.

Si bien esperamos que la proporción de H3K4me₃ en el total de cromatina replicante sea alta en ES (ICQ altos) y baja en LS (ICQ bajos), no necesariamente el porcentaje de EC que replica será alto en todos los núcleos ES ni el porcentaje de HC replicante será alto en todos los núcleos LS. Células en el comienzo de ES o final de LS, que presentan pocas regiones replicantes, tendrán, respectivamente, un número considerable de píxeles con PDM negativo (favoreciendo ICQ bajos) o con PDM positivo (favoreciendo ICQ altos). Por tanto, debido a la indeterminación de los valores de ICQ en este tipo de núcleos no se utilizó en este caso el algoritmo ICA.

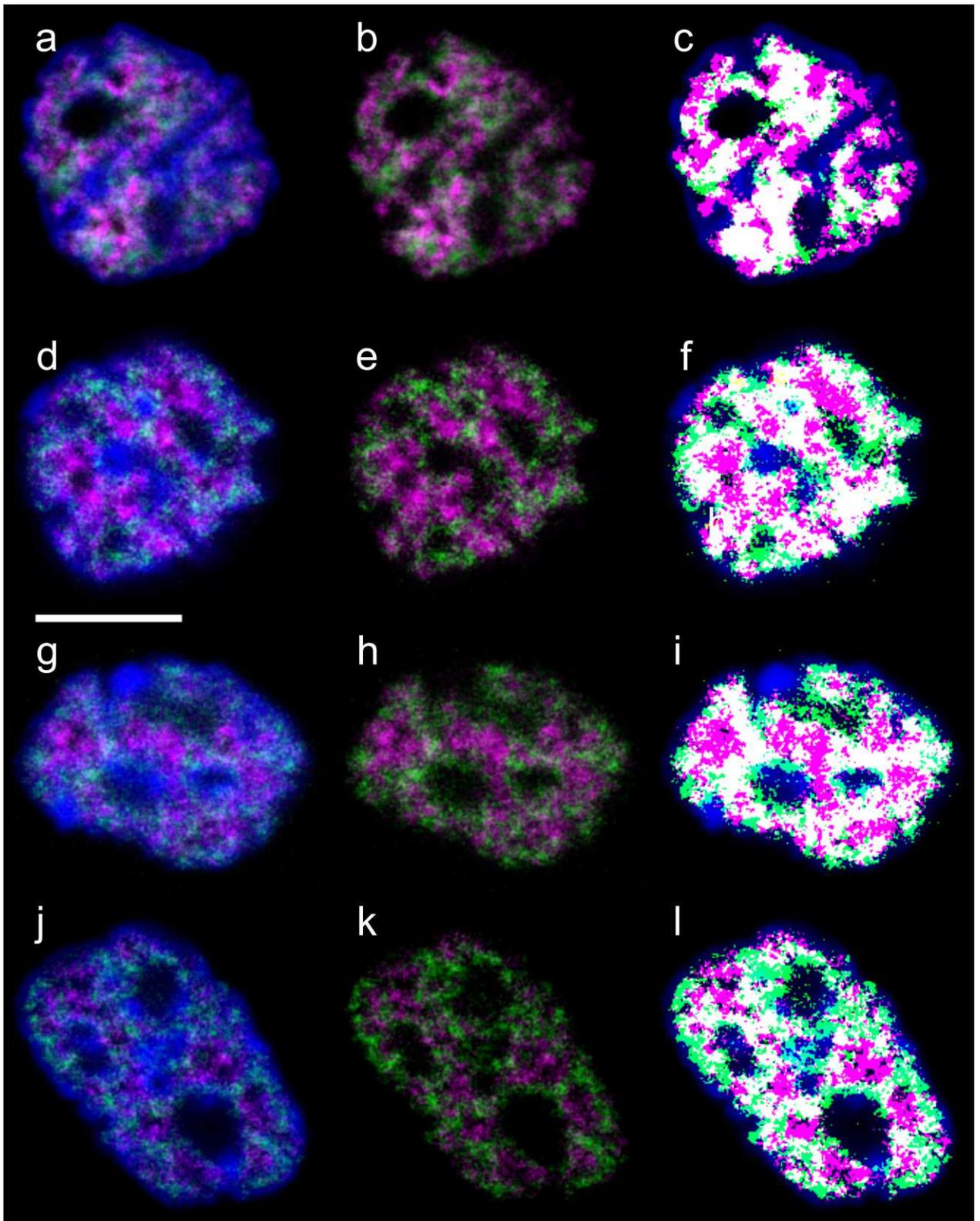


Figura 14.- Distribución de los dominios de replicación en relación a regiones eucromáticas evidenciadas por inmunomarcación (H3K4me₃; magenta) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase **ES** control (**a**) o tratados (**d, g, j**). Los patrones de replicación fueron obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química (azida*Alexa Fluor 488; verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (**a, d, g, j**) y (**b, e, h, k**) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/EdU/H3K4me₃ y EdU/H3K4me₃, respectivamente. Los paneles (c,f,i,l) ilustran las máscaras binarias de los dominios de replicación (verde) y EC (magenta) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En blanco se observan las áreas de solapamiento verde-magenta. Barra = 5 μ m.

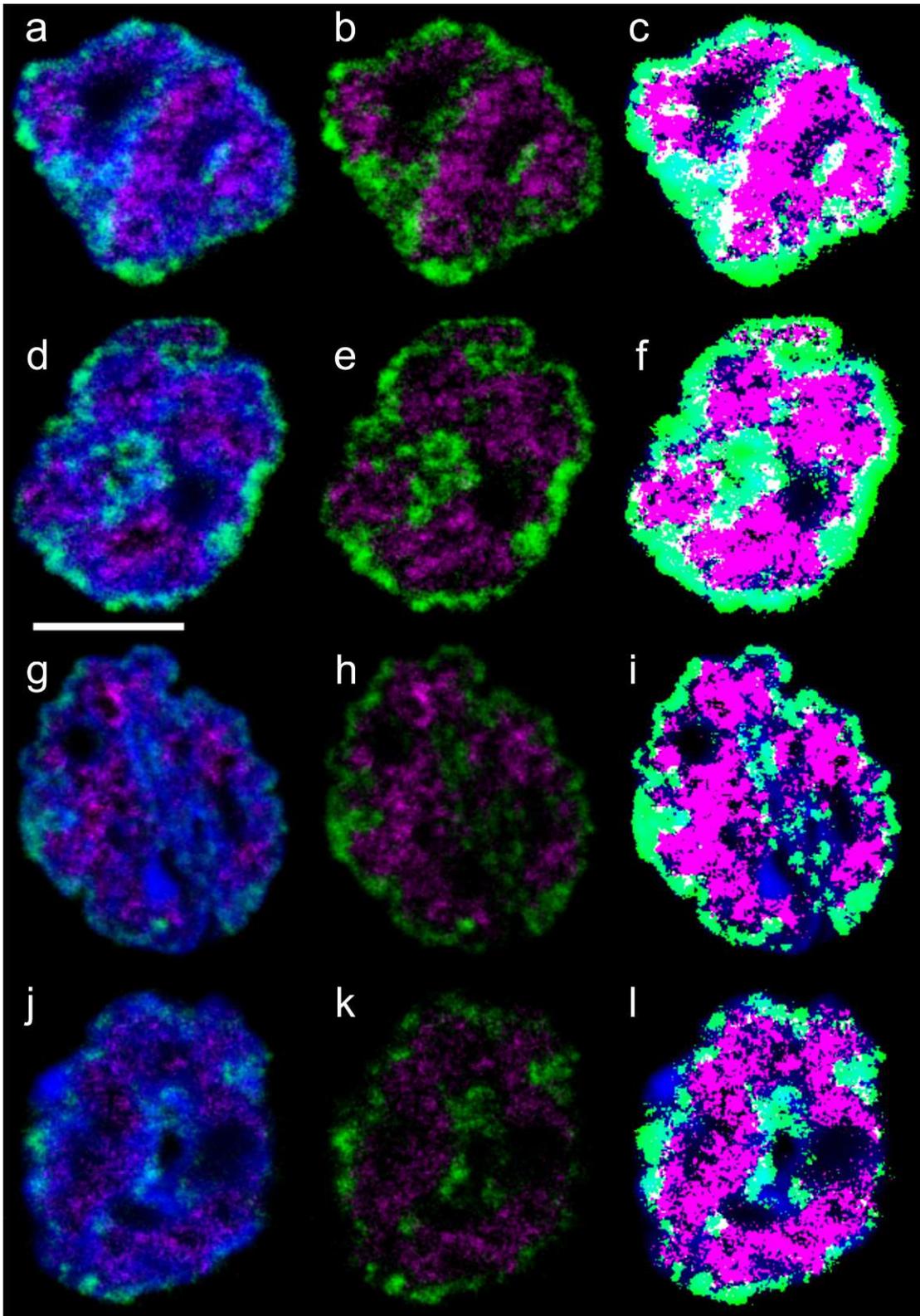


Figura 15.- Distribución de los dominios de replicación en relación a regiones eucromáticas evidenciadas por inmunomarcación (H3K4me₃; magenta) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase **LS** control (**d**) o tratados (**a, g, j**). Los patrones de replicación fueron obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química (azida*Alexa Fluor 488; verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (**a, d, g, j**) y (**b, e, h, k**) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/EdU/H3K4me₃ y EdU/H3K4me₃, respectivamente. Los paneles (**c, f, i, l**) ilustran las máscaras binarias de los dominios de replicación (verde) y EC (magenta) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En blanco se observan las áreas de solapamiento verde-magenta. Barra = 5 μ m.

5.2.2 Evaluación de daño total y fracción de cromatina replicante en núcleos control y tratados

Como se observa en la Tabla 5 y Figuras 16, 19, 20 y 22, el porcentaje de área dañada (área total γ H2AX+ en área total DAPI+) de las células tratadas con BLM fue significativamente mayor que en las células control (~100 veces; BLM: 4.50 %; C: 0.04 %; $p < 0.001$);, siendo el daño basal en los controles despreciable (0.04 %; Figura 16). Asimismo, en la Tabla 5 se observa que las células tratadas presentaron un nivel de daño similar entre las diferentes fases del ciclo celular (ANOVA, $p = 0.94$).

Por otra parte, la proporción de regiones de cromatina replicante fue similar (BLM 22.0 %; C 24.5 %; $p = 0.352$) entre células control y tratadas, indicando que la exposición a BLM (40 $\mu\text{g/mL}$, 30 min) no afectó la dinámica del ciclo celular.

		n	A	B
			área γ H2AX (+)/ área DAPI (+)	área Edu (+)/ área DAPI (+)
C	G1/G2	32	0.00003	-
	ES	22	0.001	0.255
	LS	18	0.0004	0.232
BLM	G1/G2	58	0.044	-
	ES	42	0.043	0.225
	LS	59	0.047	0.217

Tabla 5.- Determinación de la proporción de daño (*foci* de γ H2AX) y cromatina replicante (regiones EdU positivas) utilizando máscaras binarias en células control y tratadas. Valores promedio agrupados por categoría de la proporción de: **(A)** área dañada en área nuclear total: área γ H2AX (+) en área DAPI (+); **(B)** área de cromatina replicante en área nuclear total: área EdU (+) en área DAPI (+). **BLM:** células tratadas con bleomicina; **C:** células control; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **G1/G2:** núcleos en fase G1 ó G2 del ciclo celular; **n:** número de células analizadas; **(+):** áreas positivas en máscaras binarias.

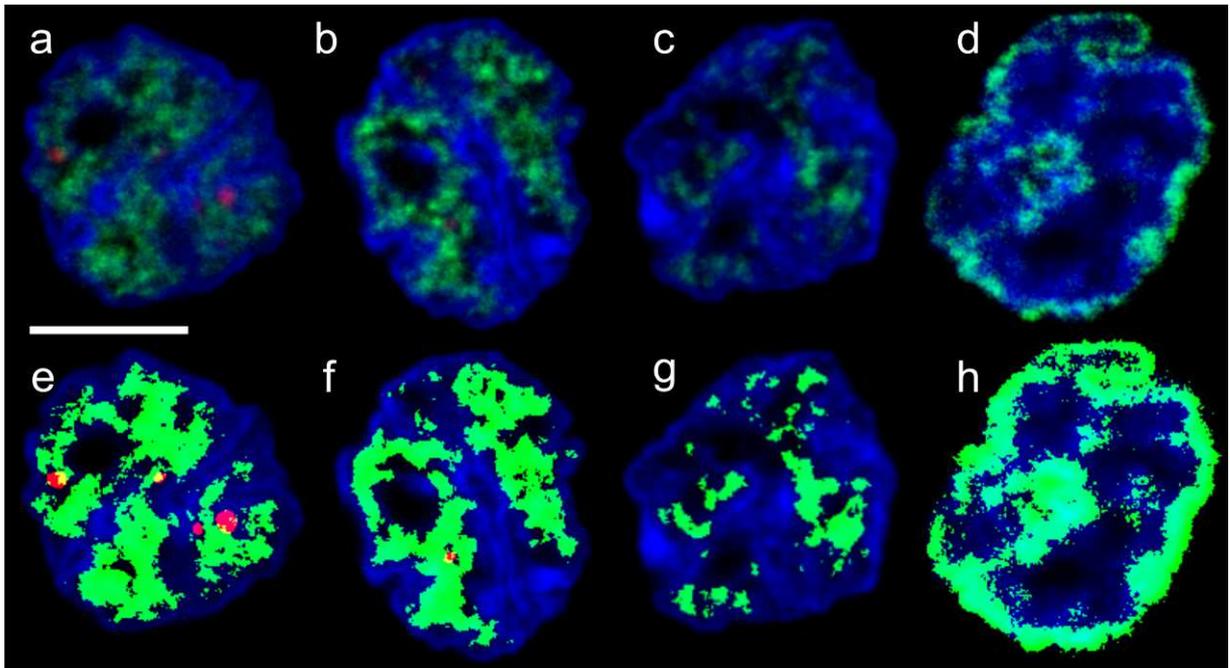


Figura 16.- Distribución de *foci* de γ H2AX evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) y patrones de replicación (obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química con azida*AlexaFluor 488; verde) en planos provenientes de series en z de núcleos control de CHO9 en fases ES (**a-c**) o LS (**d**). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (**a, b, c, d**) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX/EdU. Los paneles (**e, f, g, h**) ilustran las máscaras binarias de *foci* de γ H2AX (rojo) y EdU (verde) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En (**a**) se ilustra un núcleo control en fase ES con el nivel máximo de señal de γ H2AX observado, en (**b**) el nivel promedio de γ H2AX detectado en células ES y (**c, g**) ejemplos de núcleos control con ausencia de *foci* en fases ES y LS, respectivamente. En amarillo se observan las áreas de solapamiento rojo-verde. Barra = 5 μ m.

5.2.3 Análisis de colocalización entre cromatina dañada y cromatina replicante

5.2.3.1 Cálculo del ICQ

Tanto en los núcleos ES como LS (Tabla 6) no se observaron diferencias significativas para las medias de los valores de ICQ entre los dos experimentos realizados (ES $p=0.643$; LS $p=0.805$).

		n	γ H2AX versus EdU
			ICQ <i>microstack</i>
BLM	ES_Exp_1	12	0.122
	ES_Exp_2	30	0.126
	LS_Exp_1	26	0.150
	LS_Exp_2	33	0.152

Tabla 6.- Media de los valores de ICQ (*Intensity Correlation Quotient*) en *microstacks* por experimento y categoría aplicando el algoritmo ICA para analizar la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a cromatina replicante (regiones EdU positivas). **BLM**: células tratadas con bleomicina; **ES**: núcleos en fase S-temprana; **LS**: núcleos en fase S-tardía; **Exp_1**: Experimento 1; **Exp_2**: Experimento 2; **n**: número de células analizadas.

Una vez agrupados ambos experimentos (Tabla 7), los valores de ICQ revelaron una correlación positiva tanto en fases ES (0.125) como LS (0.151) en relación a la distribución del daño (*foci* de γ H2AX) en regiones de cromatina replicante (Edu positivas). Si bien se verificó en ambas fases una disminución de las medias de los valores de ICQ en planos individuales respecto a los valores de ICQ obtenidos en el *microstack* correspondiente ($\sim 0,010$) esta disminución no resultó significativa (ES $p=0.360$; LS $p=0.054$).

		N	γ H2AX versus EdU	
			ICQ <i>microstack</i>	ICQ plano
BLM	ES	42	0.125	0.120
	LS	59	0.151	0.139

Tabla 7.- Medias de los valores de ICQ de *microstacks* y de un plano individual del mismo agrupados por categoría aplicando el algoritmo ICA para analizar la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a cromatina replicante (regiones EdU positivas). **BLM:** células tratadas con bleomicina; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **n:** número de células analizadas.

Como se observa en la Figura 17 los valores de correlación positiva encontrada ($ICQ > 0.050$) tanto en ES como LS se deben al menos parcialmente a la gran proporción de píxeles doble negativos (que generan un PDM positivo) presente en las imágenes de PDM. Es decir, la existencia de regiones de cromatina no replicante que presentan ausencia de *foci* de γ H2AX. Una fracción de los píxeles doble negativos está constituida por nucleólos. Por ello, en un subconjunto de núcleos ES y LS se evaluó el efecto de eliminar estas regiones de las ROI en planos individuales. Los valores promedio de los ICQ para planos individuales donde se eliminaron estas regiones de las ROI (Figura 18) fueron menores que los valores promedio de los *microstacks* correspondientes (0.137 en núcleos LS y 0.117 en núcleos ES, Tabla 8) aunque estas diferencias (ES 0.013; LS 0,021) no fueron significativas (ES $p=0.192$; LS $p=0.224$). De esta forma, si bien la eliminación de los nucleólos disminuyó el ICQ, al descartar un área considerable de píxeles dobles negativos, esta disminución no incidió sobre la interpretación de los valores de ICQ en términos de la estimación de colocalización.

		N	γ H2AX versus EdU	
			ICQ <i>microstack</i>	ICQ plano sin nucleólos
BLM	ES	15	0.130	0.117
	LS	15	0.158	0.137

Tabla 8.- Medias de los valores de ICQ del *microstack* y del promedio de 4 planos individuales del mismo con exclusión de nucleólo(s) obtenidos aplicando el algoritmo ICA para analizar la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a cromatina replicante (regiones EdU positivas). **BLM:** células tratadas con bleomicina; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **n:** número de células analizadas.

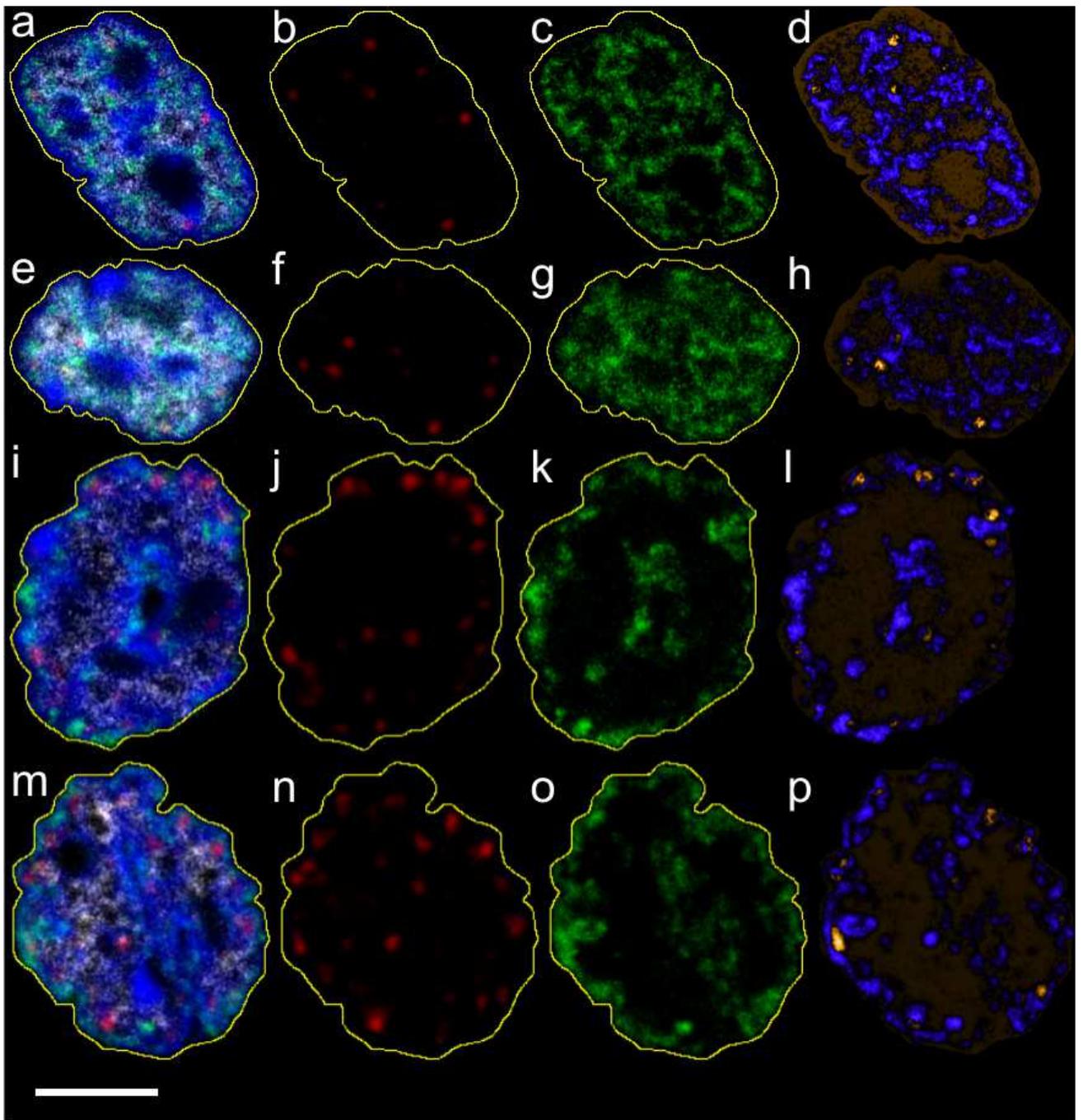


Figura 17.- Distribución de focos de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fases ES (a, e) y LS (i, m) en relación a los dominios de replicación (obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química con azida*Alexa Fluor 488; verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Se observan la imágenes superpuesta de las señales de DAPI/γH2AX/EdU/H3K4me3 (paneles a, e, i, m), donde fueron definidas las ROI (líneas amarillas); las señales de γ H2AX (paneles b, f, j, n) y EdU (paneles c, g, k, o). Los paneles (d, h, l, p) ilustran las imágenes de PDM obtenidas luego de aplicar el ICA entre las señales de γ H2AX y EdU. Barra = 5 μ m.

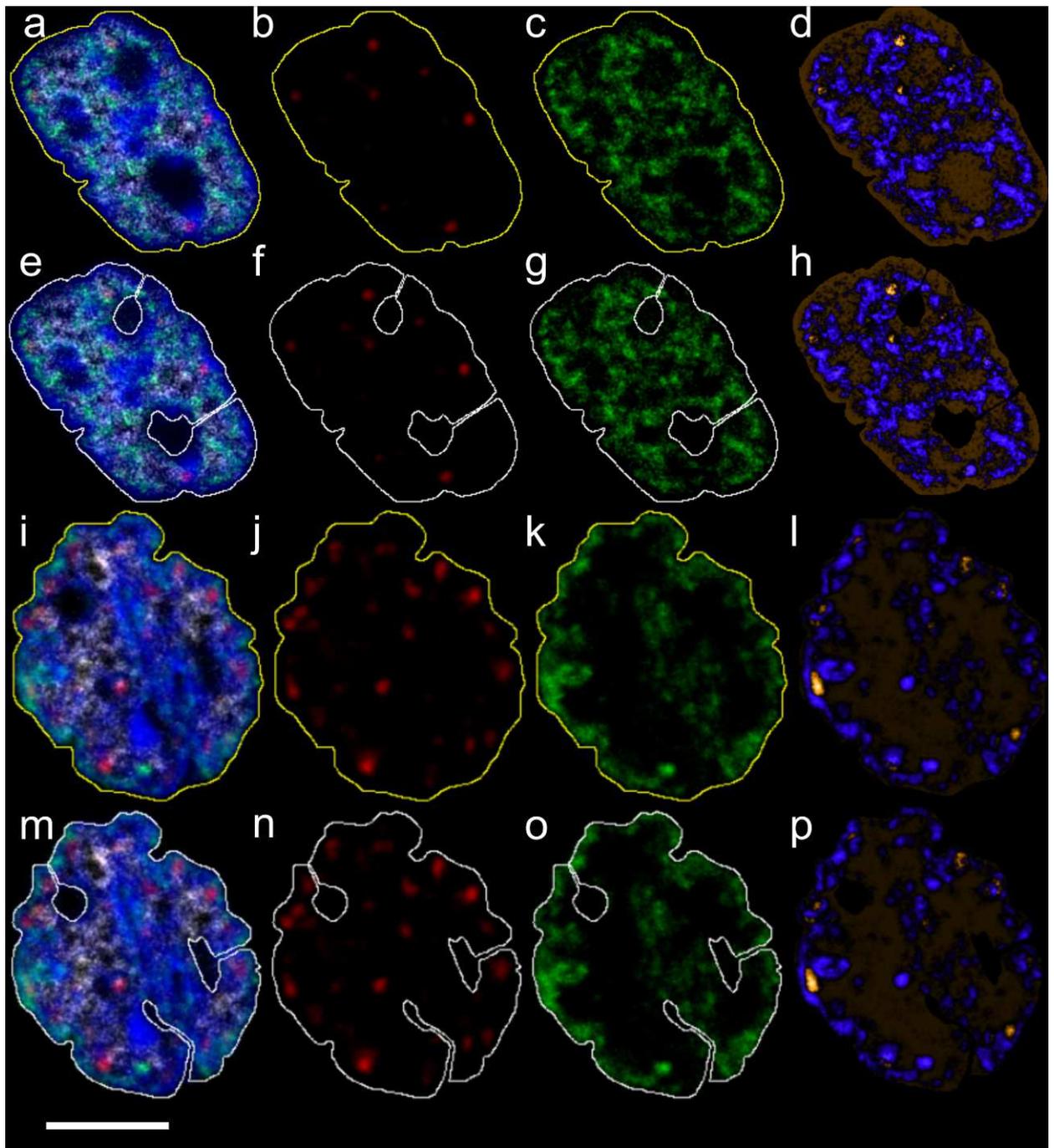


Figura 18.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fases ES (**a, e**) y LS (**i, m**) en relación a los dominios de replicación (obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química con azida*Alexa Fluor 488; verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Para cada núcleo se observan las imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX/EdU/H3K4me₃ donde fueron definidas las ROI conteniendo los nucléolos (líneas amarillas; paneles **a, i**) o sin contenerlos (líneas blancas; paneles **e, m**); las señales de γ H2AX (paneles **b, f, j, n**) y EdU (paneles **c, g, k, o**). Los paneles (**d, h, l, p**) ilustran las imágenes de PDM obtenidas luego de aplicar el ICA entre las señales de γ H2AX y EdU.

5.2.3.2 Determinación de áreas de solapamiento en máscaras binarias

Tanto en núcleos ES como LS (Tabla 9) no se observaron diferencias significativas (ES, $p=0.291$; LS, $p=0.065$) en las medias aritméticas de los cocientes de la relación γ H2AX versus EdU entre los diferentes experimentos.

		n	A	B	Cociente (relación γ H2AX versus EdU)
			área γ H2AX (+) \cap área EdU (+)/ área γ H2AX(+)	área Edu (+) / área DAPI (+)	
BLM	ES_ Exp_1	12	0.314	0.186	1.847
	ES_ Exp_2	30	0.362	0.241	1.585
	LS_ Exp_1	26	0.308	0.181	1.823
	LS_ Exp_2	33	0.336	0.245	1.435

Tabla 9.- Análisis de la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a cromatina replicante (regiones EdU positivas) utilizando máscaras binarias. Valores promedio por experimento y categoría de las proporciones de: (A) área de cromatina replicante dañada en área total dañada: área γ H2AX (+) \cap área EdU (+)/área γ H2AX (+); (B) área de cromatina replicante en área nuclear total: área EdU (+)/área DAPI (+). **Cociente:** Cociente A/B. **BLM:** células tratadas con BLM; ES: núcleos en fase S-temprana; LS: núcleos en fase S-tardía; **Exp_1:** Experimento 1; **Exp_2:** Experimento 2; **n:** número de células analizadas. (+):áreas positivas en máscaras binarias.

Una vez agrupados los núcleos por fase (Tabla 10), el análisis de las áreas de píxeles solapados en las máscaras binarias evidenció, tanto en ES como LS, un predominio del daño en las regiones replicantes (66,0% y 60,6% mayor de lo esperado por azar para ES y LS, respectivamente). Estos valores fueron en ambos casos significativamente diferentes de 1 (ES $p<0.001$; LS $p<0.001$); indicando que el daño en las regiones replicantes fue significativamente mayor que el daño en la cromatina total.

A su vez, no se detectaron diferencias significativas para las medias de los cocientes de la relación γ H2AX versus EdU entre ambas fases ($p=0.688$), revelando un mismo efecto de la replicación sobre la distribución del daño independiente de la fase (ES o LS).

		N	A	B	Cociente (relación γ H2AX versus EdU)
			área γ H2AX (+) \cap área EdU (+)/ área γ H2AX (+)	área Edu (+) / área DAPI (+)	
BLM	ES	42	0.348	0.225	1.660
	LS	59	0.324	0.217	1.606

Tabla 10.- Análisis de la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a cromatina replicante (regiones EdU positivas) utilizando máscaras binarias. Valores promedio agrupados por categoría de las proporciones de: (A) área de cromatina replicante dañada en área total dañada: área γ H2AX (+) \cap área EdU (+)/área γ H2AX (+); (B) área de cromatina replicante en área nuclear total: área EdU (+)/área DAPI (+). **Cociente:** Cociente A/B. **BLM:** células tratadas con BLM; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **n:** número de células analizadas. (+):áreas positivas en máscaras binarias.

Asimismo, la inspección visual de las imágenes fluorescentes multicanal o las máscaras binarias correspondientes en núcleos ES o LS reveló que los resultados obtenidos no se debían a una distribución donde la mayoría de los *foci* de γ H2AX se encontraban dentro de las áreas replicantes y el resto fuera de ellas. Por el contrario, los resultados obtenidos se explican por una localización recurrente de los *foci* de γ H2AX en las interfases entre regiones replicantes y no replicantes (Figuras 19 y 20, flechas).

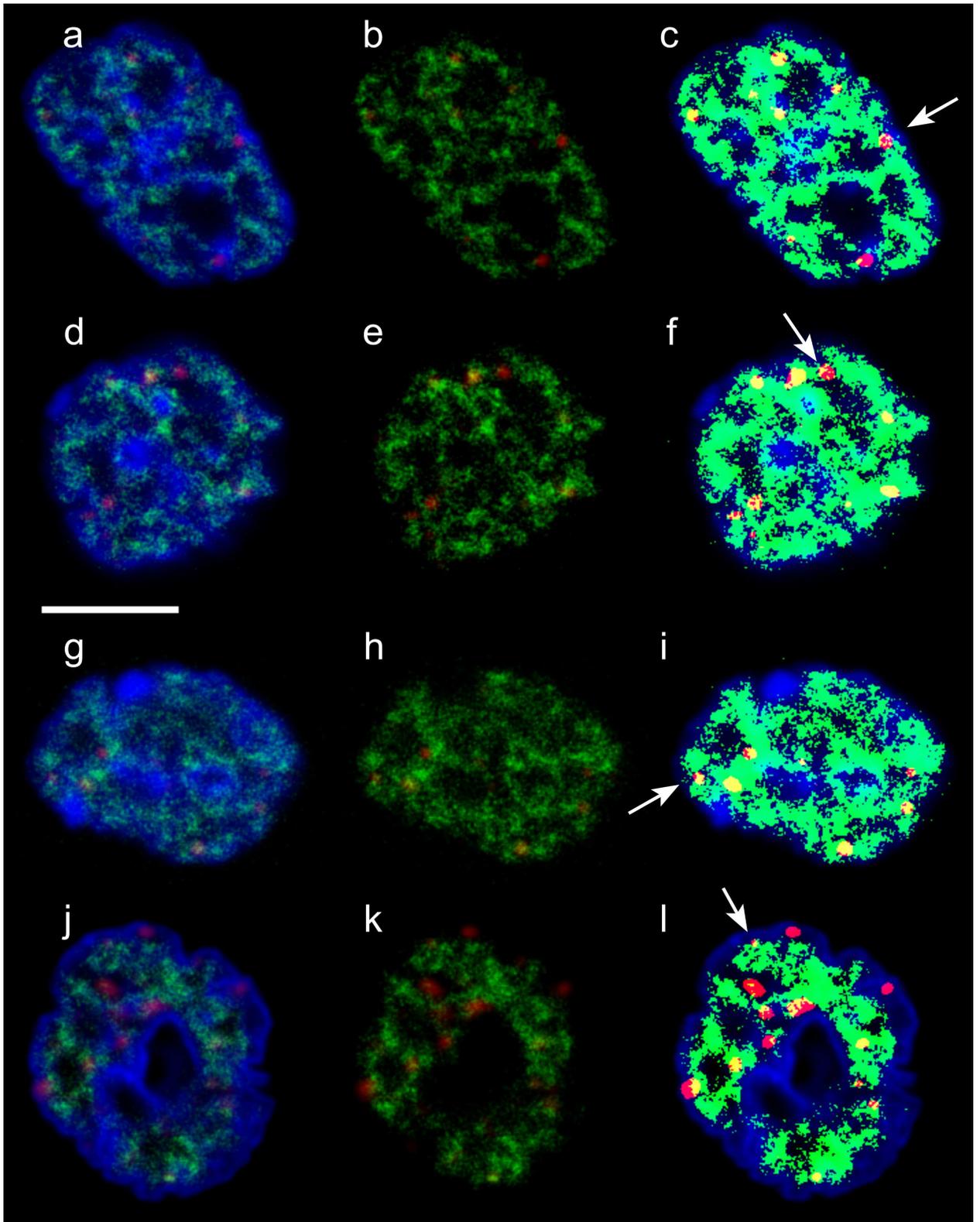


Figura 19.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase ES en relación a los dominios de replicación (obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química con azida*Alexa Fluor 488; verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX/EdU y γ H2AX/EdU, respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran las máscaras binarias de *foci* de γ H2AX (rojo) y EdU (verde) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En amarillo se observan las áreas de solapamiento rojo-verde. Las flechas ejemplifican la localización de *foci* en interfases de dominios replicantes/no-replicantes. Barra = 5 μ m.

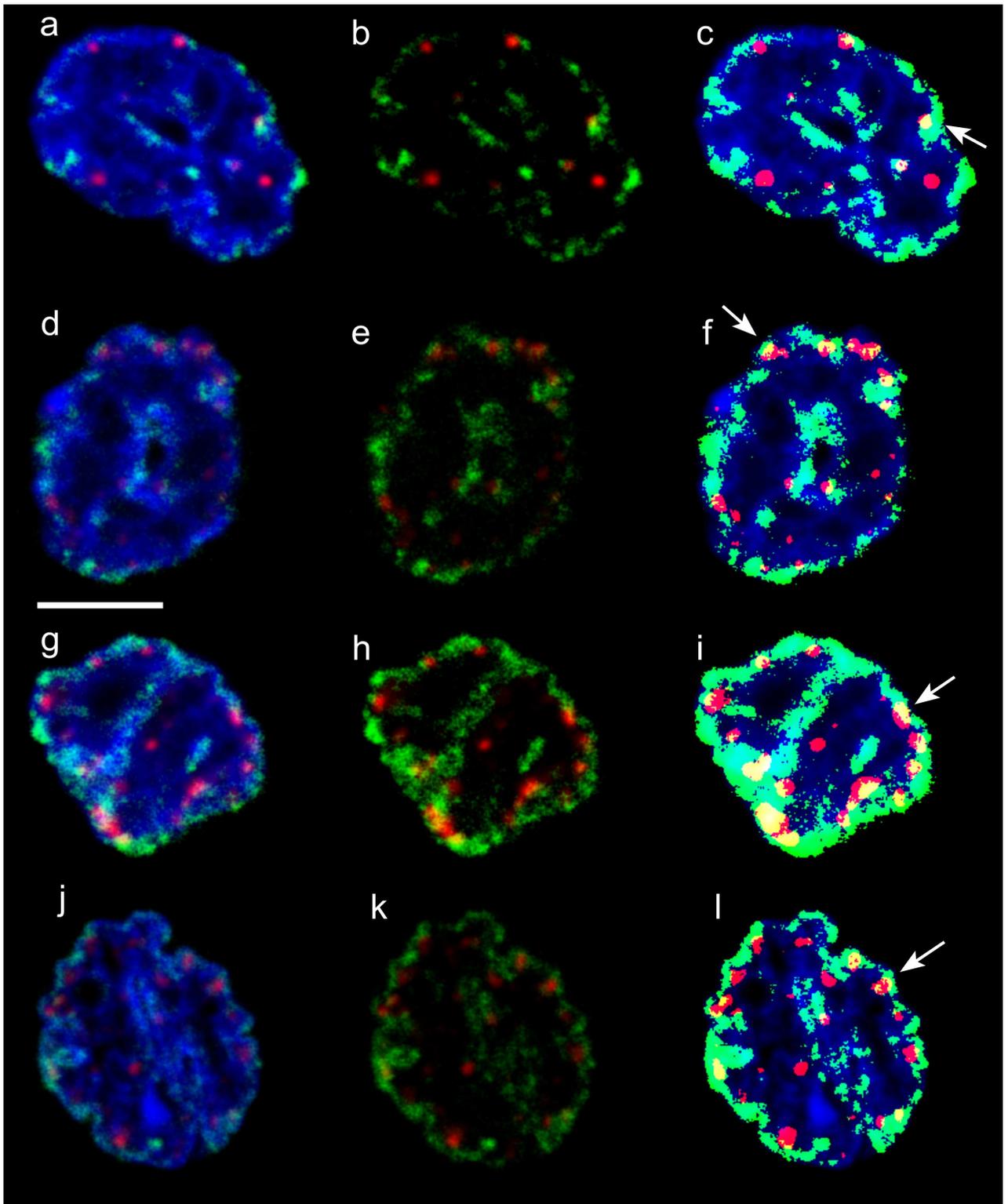


Figura 20.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase LS en relación a los dominios de replicación (obtenidos por incorporación de EdU y posterior detección química con azida*Alexa Fluor 488; verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX /EdU y γ H2AX/EdU, respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran las máscaras binarias de *foci* de γ H2AX (rojo) y EdU (verde) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En amarillo se observan las áreas de solapamiento rojo-verde. Las flechas ejemplifican la localización de *foci* en interfases de dominios replicantes/no-replicantes. Barra = 5 μ m.

5.2.4 Análisis de colocación entre cromatina dañada y eucromatina

5.2.4.1 Cálculo del ICQ

Para todas las fases (G1/G2, ES, LS) se observaron diferencias significativas (G1/G2 $p=0.0002$; ES $p=0.001$; LS $p=0.007$) para las medias de los valores de ICQ entre los experimentos 1 y 2, siendo estos valores menores en el experimento 2 (Tabla 11).

		n	γ H2AX versus H3K4me ₃
			ICQ <i>microstack</i>
BLM	G1/G2_Exp_1	23	0.126
	G1/G2_Exp_2	35	0.100
	ES_Exp_1	12	0.127
	ES_Exp_2	30	0.100
	LS_Exp_1	26	0.113
	LS_Exp_2	33	0.096

Tabla 11.- Media de los valores de ICQ de *microstacks* por experimento y categoría aplicando el algoritmo ICA para analizar la distribución de *foci* de γ H2AX en relación al compartimento eucromático (regiones H3K4me₃ positivas). **BLM:** células tratadas con bleomicina; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **Exp_1:** Experimento 1; **Exp_2:** Experimento 2; **n:** número de células analizadas.

No obstante, en todos los casos los valores de ICQ (Tabla 12, Figura 21) revelaron una correlación positiva entre la distribución de *foci* de γ H2AX y las regiones eucromáticas H3K4me₃ positivas (G1/G2: 0.110; ES: 0.108, LS: 0.103).

		n	γ H2AX versus H3K4me ₃	
			ICQ <i>microstack</i>	ICQ plano
BLM	G1/G2	58	0.110	0.096
	ES	42	0.108	0.101
	LS	59	0.103	0.095

Tabla 12.- Medias de los valores de ICQ de *microstacks* y un plano individual del mismo agrupados por categoría aplicando el algoritmo ICA para analizar la distribución de *foci* de γ H2AX en relación al compartimento eucromático (regiones H3K4me₃ positivas). **BLM:** células tratadas con bleomicina; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **n:** número de células analizadas.

Se verificó en todas las categorías una disminución de las medias de los valores de ICQ en planos individuales respecto a los obtenidos en el *microstack* correspondiente ($-0,010$). Esta disminución resultó significativa para los núcleos en fase G1/G2 ($p=0.016$) mientras que no lo fue para los núcleos en ES ($p=0.187$) y LS ($p=0.051$). No obstante, estas diferencias no alteraron la interpretación de los valores de ICQ respecto a correlación positiva o negativa.

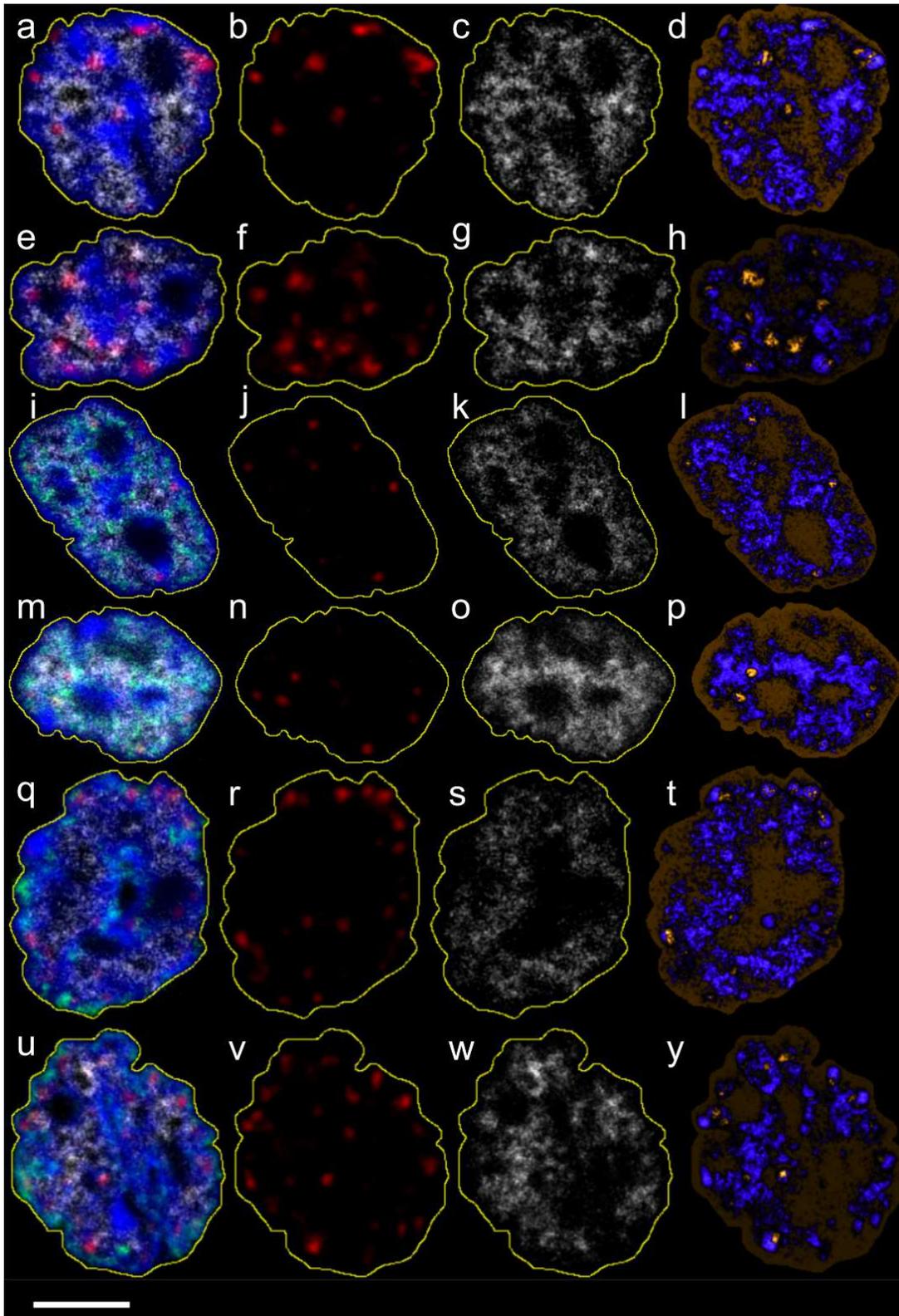


Figura 21.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fases G1/G2 (**a, e**), ES (**i, m**) y LS (**q, u**) en relación a las regiones de EC (detectadas por inmunomarcación con H3K4me₃ y AlexaFluor 596; gris). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Se observan las imágenes superpuestas de DAPI/ γ H2AX/EdU/H3K4me₃ (paneles **a, e, i, m, q, u**), donde fueron definidas las ROI (líneas amarillas); las señales de γ H2AX (paneles **b, f, j, n, r, v**) y H3K4me₃ (paneles **c, g, k, o, s, w**). Los paneles (**d, h, l, p, t, y**) ilustran las imágenes de PDM obtenidas luego de aplicar el ICA entre los canales de detección de γ H2AX y H3K4.

5.2.4.2 Determinación de áreas de solapamiento en máscaras binarias

Para cada una de las fases (G1/G2, ES, LS) no se observaron diferencias significativas (G1/G2 $p=0.219$; ES $p=0.546$; LS $p=0.054$) en las medias aritméticas de los cocientes de la relación γ H2AX versus H3K4me₃ entre los dos experimentos (Tabla 13).

		n	A	B	Cociente
			área γ H2AX (+) \cap área H3K4me ₃ (+)/área γ H2AX (+)	área H3K4me ₃ (+)/área DAPI (+)	(relación γ H2AX versus H3K4me ₃)
BLM	G1/G2_Exp_1	23	0.516	0.387	1.328
	G1/G2_Exp_2	35	0.528	0.444	1.195
	ES_Exp_1	12	0.578	0.402	1.435
	ES_Exp_2	30	0.573	0.419	1.382
	LS_Exp_1	26	0.386	0.384	0.995
	LS_Exp_2	33	0.482	0.428	1.118

Tabla 13.- Análisis de la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a EC (regiones H3K4me₃ positivas) utilizando máscaras binarias. Valores promedio por experimento y categoría de las proporciones de: (A) área de EC dañada en área total dañada: área γ H2AX (+) \cap área H3K4me₃ (+)/área γ H2AX (+); (B) área de EC en área nuclear total: área H3K4me₃ (+)/área DAPI (+). **Cociente:** Cociente A/B. **BLM:** células tratadas con BLM; **G1/G2:** núcleos en fases G1 ó G2; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **Exp_1:** Experimento 1; **Exp_2:** Experimento 2; **n:** número de células analizadas. (+):áreas positivas en máscaras binarias.

Una vez agrupados los núcleos de ambos experimentos (Tabla 14), el análisis de las áreas de píxeles solapados en las máscaras binarias evidenció en todas las fases un predominio del daño en las regiones de EC (39,7%, 24,1% y 6,4 % mayor de lo esperado por azar para G1/G2, ES y LS respectivamente). Este hecho se evidenció en cocientes de la relación γ H2AX versus H3K4me₃ significativamente diferentes de 1 (G1/G2 $p<0.001$; ES $p<0.001$; LS $p=0.038$); indicando que, en todos los casos, el daño en las regiones de EC fue significativamente mayor que el daño en la cromatina total.

		n	A	B	Cociente
			área γ H2AX (+) \cap área H3K4me ₃ (+)/área γ H2AX (+)	área H3K4me ₃ (+)/área DAPI (+)	(relación γ H2AX versus H3K4me ₃)
BLM	G1/G2	58	0.521	0.422	1.241
	ES	42	0.574	0.414	1.397
	LS	59	0.439	0.408	1.064

Tabla 14.- Análisis de la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a EC (regiones H3K4me₃) utilizando máscaras binarias. Valores promedio agrupados por categoría de las proporciones de: (A) área de EC dañada en área total dañada: área γ H2AX (+) \cap área H3K4me₃ (+)/área γ H2AX (+); (B) área de EC en área nuclear total: área H3K4me₃ (+)/área DAPI (+). **Cociente:** Cociente A/B. **BLM:** células tratadas con BLM; **G1/G2:** núcleos en fases G1 ó G2; **ES:** núcleos en fase S-temprana; **LS:** núcleos en fase S-tardía; **n:** número de células analizadas. (+): áreas positivas en máscaras binarias.

No obstante, la comparación de las medias de los cocientes mediante ANOVA de un factor ($p < 0.001$) y test *post hoc* para comparaciones múltiples reveló diferencias significativas entre estos valores para las diferentes fases (Figuras 22-24). En este sentido, el sesgo en la distribución de *foci* de γ H2AX hacia las regiones eucromáticas se incrementó significativamente (39.7%; $p = 0.013$) en los núcleos ES (EC replicando al momento del daño) mientras que disminuyó significativamente (6.4%; $p = 0.001$) en los núcleos LS (HC replicando al momento del daño), en relación al sesgo detectado en los núcleos G1/G2 (24.1%). Estos resultados demuestran que el daño inducido por BLM predominó en regiones eucromáticas, especialmente cuando estas regiones replicaban al momento de la inducción del mismo.

Como se mencionó anteriormente, se observó una localización recurrente de los *foci* de γ H2AX en las interfases entre dominios replicantes y no replicantes (Figuras 19 y 20). Por otra parte, al observar las imágenes que muestran *foci* de γ H2AX, áreas replicantes (EdU+) y H3K4me₃ como marcador de EC se pudo apreciar que, en la mayoría de los casos, el área de los *foci* que no colocalizaba con dominios replicantes mapeaba en regiones eucromáticas (H3K4me₃ positivas) tanto en núcleos ES como LS (Figuras 25 y 26, flechas).

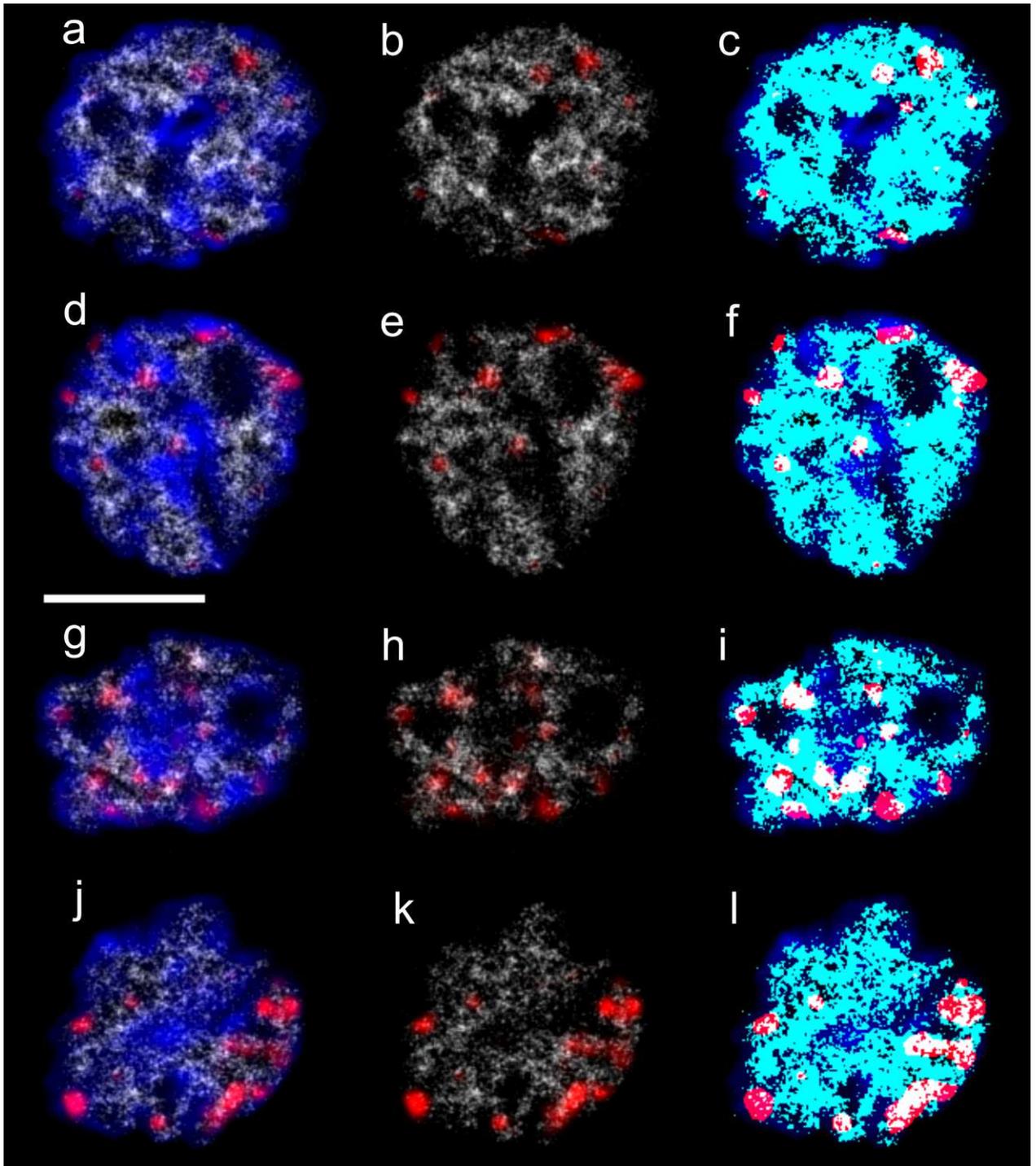


Figura 22.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fases G1/G2 en relación a las regiones de EC (detectadas por inmunomarcación con H3K4me₃ y AlexaFluor 596; gris). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX/H3K4me₃ y γ H2AX /H3K4me₃ respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran las máscaras binarias de los canales rojo (γ H2AX) y cyan (H3K4me₃) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En blanco se observan las áreas de solapamiento rojo-cyan. Barra = 5 μ m.

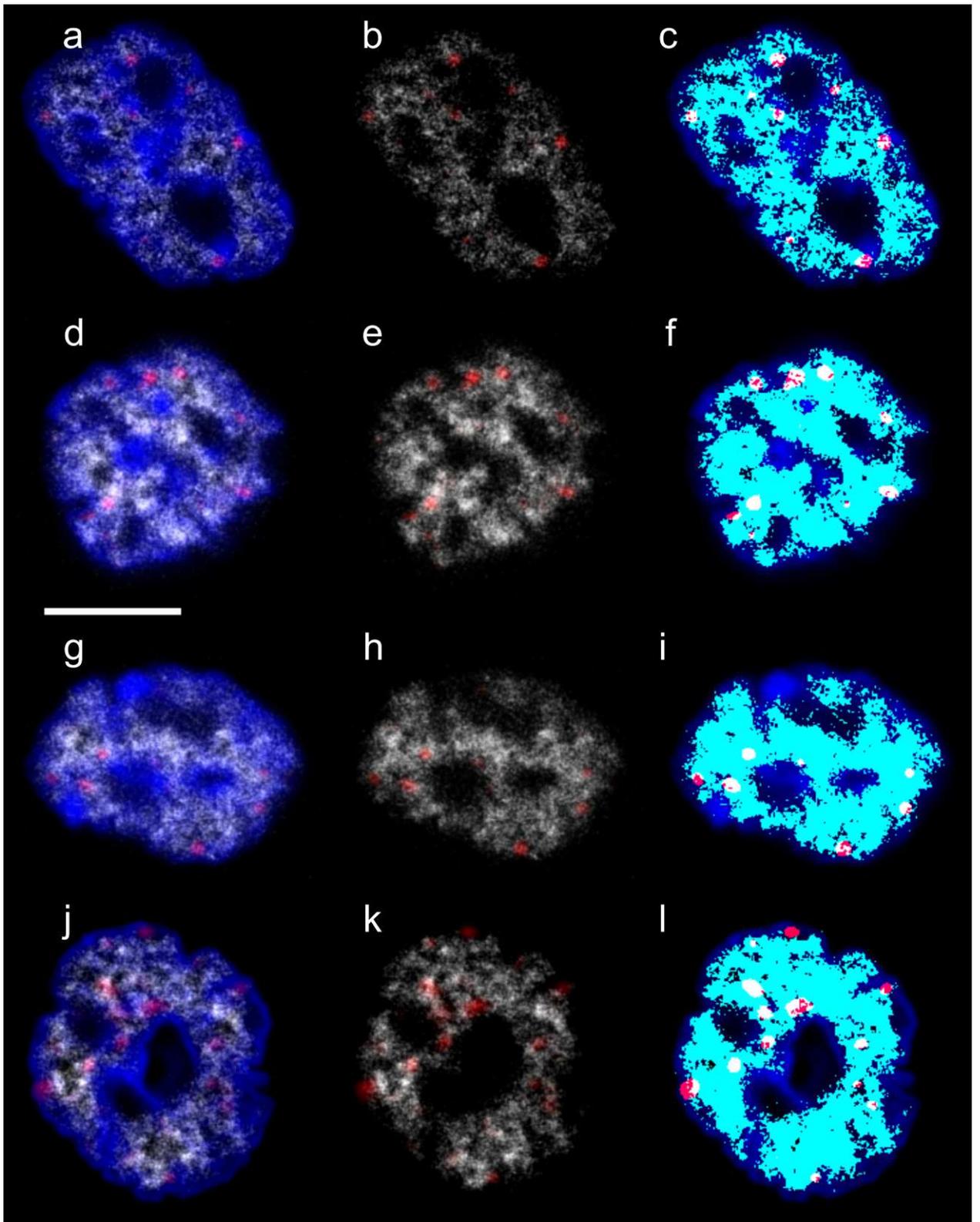


Figura 23.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase ES en relación a las regiones de EC (detectadas por inmunomarcación con H3K4me₃ y AlexaFluor 596; gris). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX/H3K4me₃ y γ H2AX/H3K4me₃ respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran las máscaras binarias de los canales rojo (γ H2AX) y cyan (H3K4me₃) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En blanco se observan las áreas de solapamiento rojo-cyan. Barra = 5 μ m.

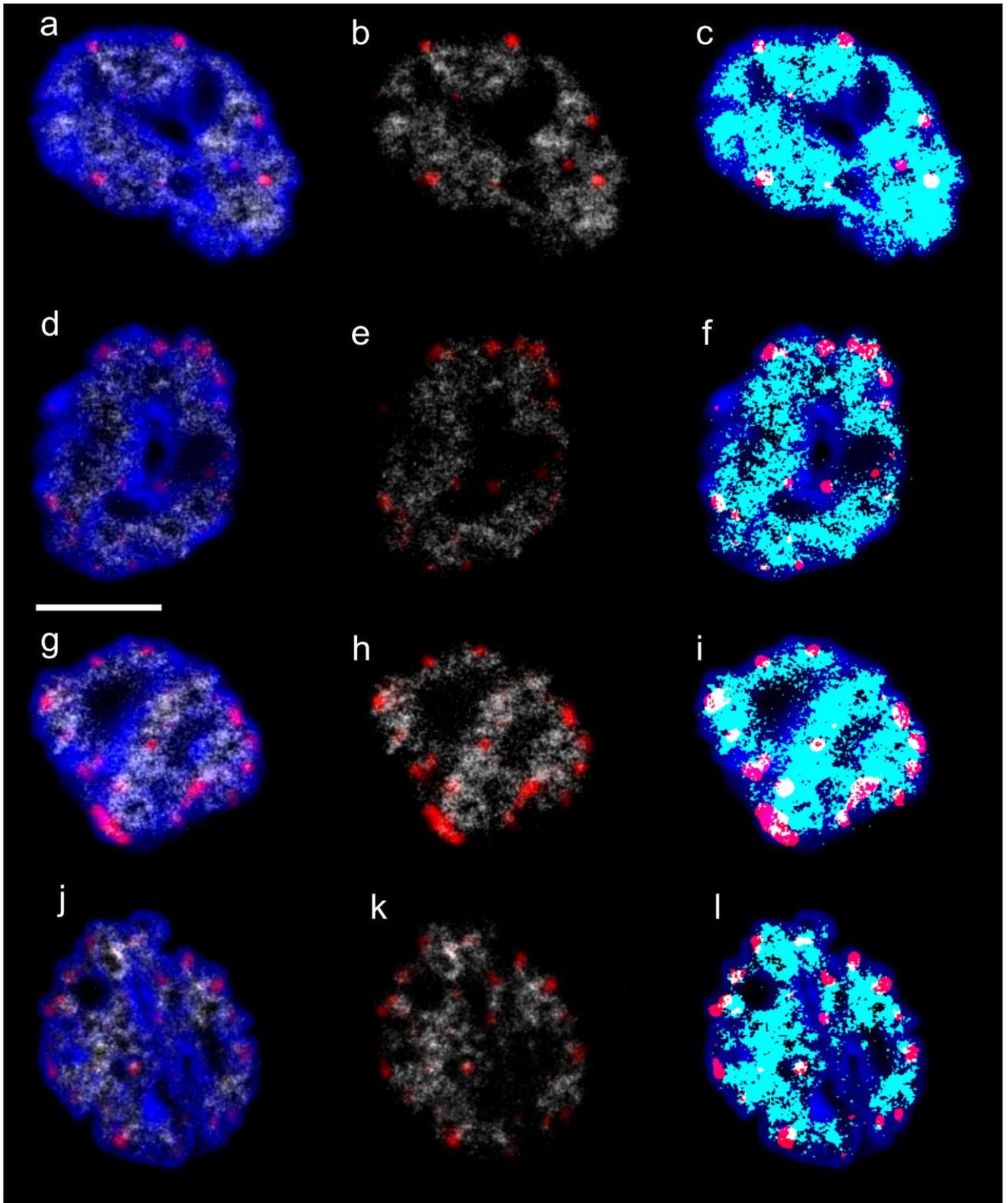


Figura 24.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase LS en relación a las regiones de EC (detectadas por inmunomarcación con H3K4me₃ y AlexaFluor 596; gris). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/ γ H2AX/H3K4me₃ y γ H2AX/H3K4me₃ respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran las máscaras binarias de los canales rojo (γ H2AX) y cyan (H3K4me₃) superpuestas a las respectivas imágenes de DAPI. En blanco se observan las áreas de solapamiento rojo-cyan. Barra = 5 μ m.

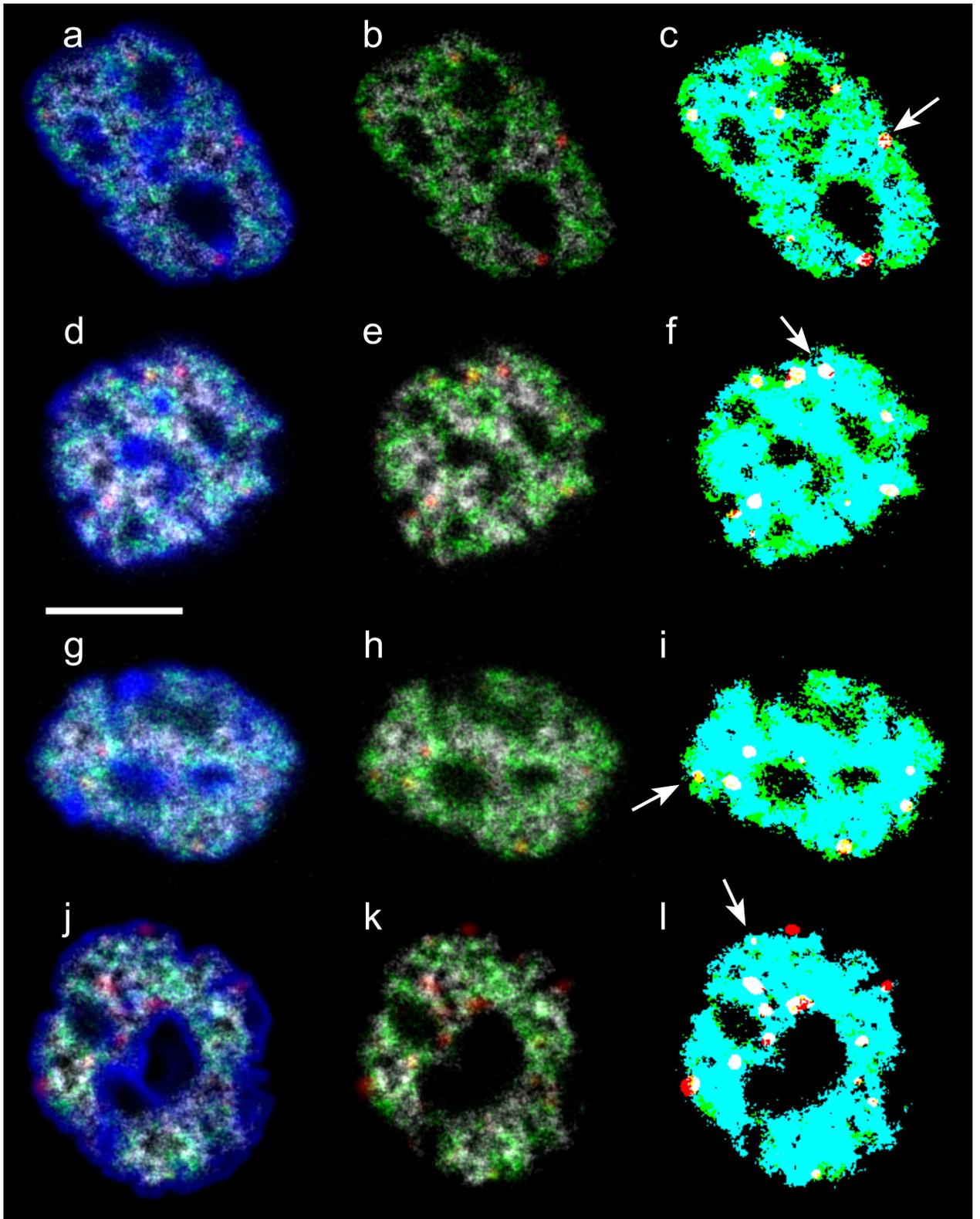


Figura 25.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase ES en relación a dominios de replicación (EdU, verde) y regiones de EC (H3K4me₃, gris). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/EdU/ γ H2AX/H3K4me₃ y EdU/ γ H2AX/H3K4me₃ respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran la superposición de las máscaras binarias de los canales verde (EdU), rojo (γ H2AX) y cyan (H3K4me₃). En verde y blanco se observan respectivamente las áreas de solapamiento rojo-verde y rojo-cyan ó rojo-verde-cyan respectivamente. Las flechas ejemplifican *foci* en los cuales el área que no colocaliza con dominios replicantes mapea en regiones eucromáticas. Barra = 5 μ m.

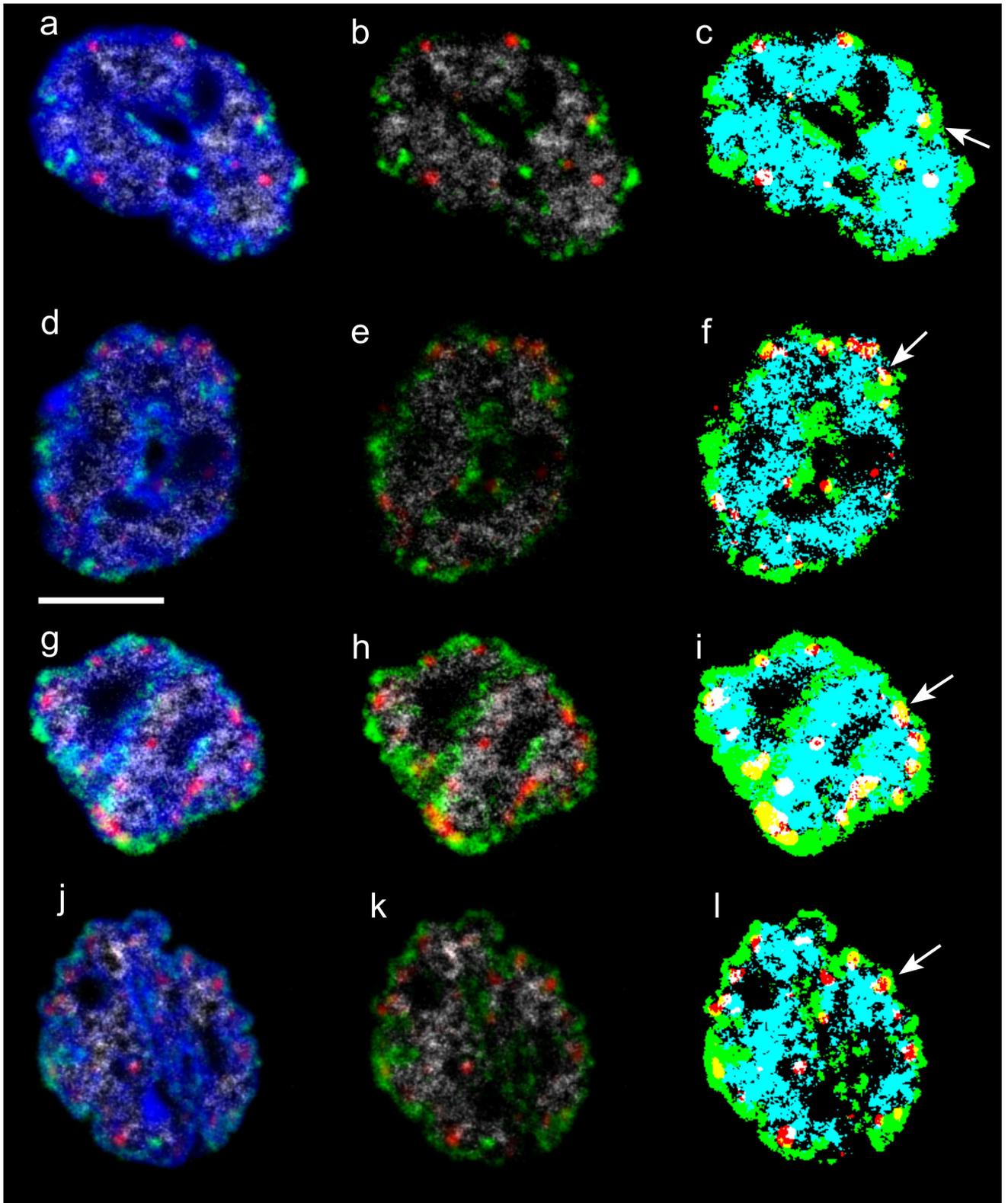


Figura 26.- Distribución de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y evidenciados por inmunomarcación (Cy3; rojo) en planos provenientes de series en z de núcleos de CHO9 en fase LS en relación a dominios de replicación (EdU, verde) y regiones de EC (H3K4me₃, gris). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, d, g, j) y (b, e, h, k) contienen imágenes superpuestas de las señales de DAPI/EdU/ γ H2AX/H3K4me₃ y EdU/ γ H2AX/H3K4me₃ respectivamente. Los paneles (c, f, i, l) ilustran la superposición de las máscaras binarias de los canales verde (EdU), rojo (γ H2AX) y cyan (H3K4me₃). En verde y blanco se observan respectivamente las áreas de solapamiento rojo-verde y rojo-cyan ó rojo-verde-cyan respectivamente. Las flechas ejemplifican *foci* en los cuales el área que no colocaliza con dominios replicantes mapea en regiones eucromáticas. Barra = 5 μ m.

6. Discusión

Diversos trabajos han evidenciado que las estructuras de orden superior de la cromatina juegan un rol importante en la regulación de procesos nucleares tales como la transcripción y la replicación del ADN [Mahy *et al.* 2002; Cremer *et al.* 2006; Fraser & Bickmore 2007]. En este sentido, es lógico pensar que la estructura de la cromatina (estructuras de orden mayor de la cromatina) pudiera también incidir tanto en la sensibilidad de las células a agentes clastogénicos como en los mecanismos de reparación del daño genético inducido.

La detección del daño primario del ADN en la cromatina interfásica mediante la visualización *in situ* de *foci* de γ H2AX por microscopía de fluorescencia ha permitido ahondar en el estudio de la sensibilidad de los diferentes dominios cromatínicos al daño inducido. Esta aproximación ha hecho posible superar las limitaciones asociadas al análisis de AC en cromosomas mitóticos [Folle *et al.* 1997, 1998; Martínez-López *et al.* 2001, 2004; Puerto *et al.* 2001], ya que éste último refleja el resultado del procesamiento de las lesiones en el núcleo celular y no el daño genético primario.

Varios autores han postulado una localización preferencial de los *foci* de γ H2AX inducidos en las regiones eucromáticas del genoma [Cowell *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007, Falk *et al.* 2008; Karagiannis *et al.* 2007; Vasireddy *et al.* 2010]. Sin embargo, la localización de los *foci* de γ H2AX cuando el daño genético se induce en regiones de eu- o heterocromatina replicante o en regiones potencialmente activas no ha sido extensamente explorada.

A este respecto, en la presente tesis hemos analizado la distribución del daño primario (RDC) inducido por BLM (*foci* de γ H2AX) en núcleos interfásicos de la línea celular CHO9 en relación al estado de la cromatina (regiones eucromáticas positivas H3K4me₃), la cromatina replicante (regiones EdU positivas) o potencialmente activa (*foci* de ser5P-ARN Pol II).

6.1 Nivel de daño en núcleos control y tratados con BLM

Tanto en los experimentos de γ H2AX/ser5P-ARN Pol II como de γ H2AX/EdU/H3K4me₃ se observó un daño basal mínimo en los núcleos control en relación al daño inducido en los núcleos tratados con BLM, evidenciando el efecto de la exposición al agente radiomimético.

Por otro lado, resultó llamativo que una proporción de las células en los cultivos tratados con BLM (21,4% en los experimentos de γ H2AX/ser5P-ARN Pol II) presentara una señal uniforme de γ H2AX en todo el núcleo, sin presencia de *foci* definidos. Estos núcleos no fueron considerados en los ensayos de colocalización (fueron eliminados manualmente de las ROI en los experimentos de γ H2AX/ser5P-ARN Pol II o no fueron escaneados en los experimentos de γ H2AX/EdU/H3K4me₃); limitándose el análisis a los núcleos que presentaban *foci* de γ H2AX definidos.

La existencia de núcleos con marcación pan-nuclear de γ H2AX ha sido reportada en líneas celulares humanas sometidas a irradiación UV [Marti *et al.* 2006; de Feraudy *et al.* 2010]. Ambos autores determinaron la presencia de este tipo de marcación en todas las fases del ciclo celular, aunque principalmente durante la fase S. De acuerdo a los resultados reportados por de Feraudy *et al.* [2010] la fosforilación masiva de H2AX inducida por luz UV en células en fase S representaría una señal preapoptótica asociada a un proceso de muerte celular programada dependiente de ATM y JNK.

En nuestro caso, observamos marcación pan-nuclear de γ H2AX tanto en núcleos replicantes, positivos para EdU, como en núcleos G1/G2, que no incorporaron EdU durante el tratamiento con BLM (Figura 27). Por tanto, a diferencia de lo observado con radiación UV, la fosforilación masiva de H2AX inducida por BLM no sería preponderante en fase S.

La observación de los núcleos contrateñidos con DAPI en las células con marcación pan-nuclear (tanto en fases ES, LS o G1/G2) no evidenció características nucleares asociadas al proceso apoptótico. Sin embargo, no podemos descartar en estas células la presencia de un proceso apoptótico temprano independiente de la fase del ciclo celular.

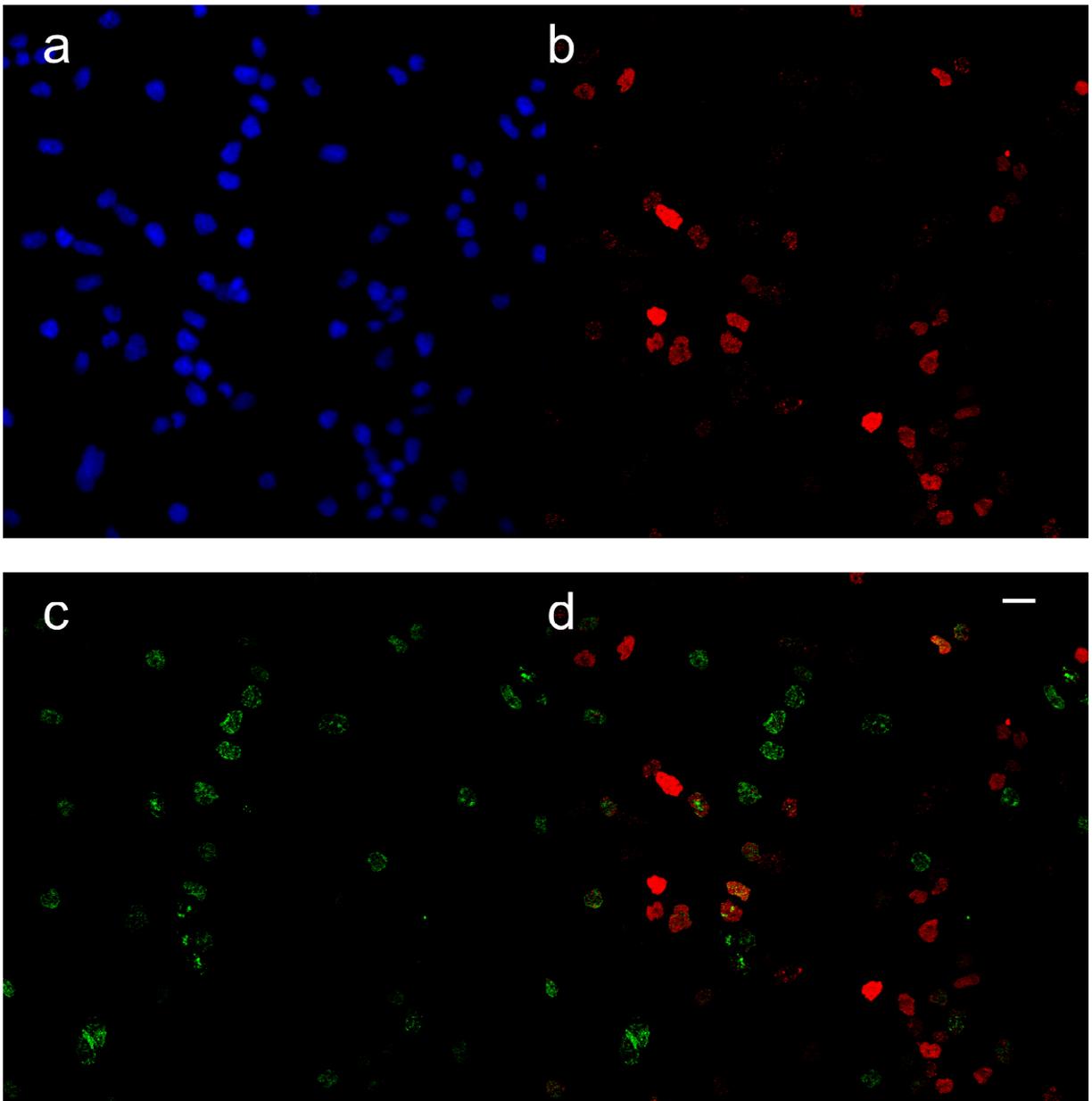


Figura 27.- Plano general (objetivo 63X; zoom=1) de núcleos de CHO9 expuestos a bleomicina en relación a γ H2AX inducida (Cy3; rojo) y dominios de replicación (EdU; verde) .Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Los paneles (a, b y c) corresponden a las señales de DAPI, γ H2AX y EdU respectivamente. El panel (d) ilustra la superposición de las señales de EdU (verde) y γ H2AX (rojo). Barra = 15 μ m.

6.2 Relación entre cromatina dañada y cromatina potencialmente activa

El mapeo sobre idiogramas de cromosomas humanos de las regiones de cromatina hiperacetilada H4⁺, RIDGE, antiRIDGE y sitios de fractura generados por RI ha indicado una localización preferencial del daño genético en las regiones H4⁺ y RIDGE; sugiriendo una mayor sensibilidad de la cromatina potencialmente activa a la inducción de daño por RI [Folle *et al.* 2010].

Estos resultados concuerdan con los realizados por Falk *et al.* [2008], los cuales evaluaron mediante inmunoFISH la presencia de *foci* de γ H2AX inducidos por RI en un RIDGE (11 Mb) y un antiRIDGE (11 Mb) cercanos (12 Mb), que mapeaban ambos en la región pericéntrica de 11q. Estos autores determinaron una mayor sensibilidad (~ 4 veces) del RIDGE en comparación con su antiRIDGE próximo.

El análisis empleando el algoritmo CDA para evaluar la colocalización de *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y *foci* de ser5P-ARN Pol II indicó una tendencia a la colocalización de ambas señales (Tabla 3), confirmando los resultados previos de Falk *et al.* [2008] y Folle *et al.* [2010] en relación a una mayor susceptibilidad de la cromatina potencialmente activa al daño genético inducido.

Por otra parte, Solovjeva *et al.* [2007] analizando *in vivo* la incorporación de 5-bromouridina trifosfato (BrUTP) en moléculas de ARN de células humanas 30 minutos post-irradiación con rayos X, obtuvieron una correlación negativa entre las señales de BrUTP y los *foci* de γ H2AX. Los autores concluyeron que la transcripción resultaba inhibida en la vecindad de los *foci*.

Estos hallazgos aparentemente discrepantes podrían deberse a las diferentes aproximaciones experimentales empleadas en estas investigaciones. Por una parte, la cromatina potencialmente activa, debido a su menor grado de compactación, sería más susceptible a la inducción de daño genético. Por otro lado, la inhibición de la transcripción en los sitios dañados facilitaría la reparación de las lesiones y/o, como proponen Solovjeva *et al.* [2007], restringiría los movimientos de la cromatina a nivel de las RDC, limitando, de ese modo, la posibilidad que ocurra una reparación errónea de las lesiones.

En nuestro caso, al realizar la inmunodetección conjunta de Ser5P-ARN Pol II y γ H2AX pudimos aportar evidencias en relación a la influencia de la cromatina potencialmente activa sobre la inducción de daño genético. No obstante, no pudimos evaluar la posibilidad de que exista una inducción preferencial de *foci* de γ H2AX en las regiones que estaban transcribiendo (cromatina activa) en el momento de inducción del daño pues esto hubiera requerido la inmunodetección de Ser2P-ARN Pol II junto a γ H2AX [Egloff & Murphy 2008].

6.3 Relación entre cromatina dañada y eucromatina

El análisis de la relación entre la distribución de *foci* de γ H2AX y las regiones eucromáticas H3K4me₃ mediante el algoritmo ICA reveló una correlación positiva entre ambas señales en fases G1/G2, ES y LS (Tabla 12). Asimismo, el análisis de las áreas solapantes en máscaras binarias evidenció también un predominio del daño en las regiones de EC en todas las fases (Tabla 14).

Por una parte, la distribución de *foci* de γ H2AX hacia las regiones eucromáticas mostró un sesgo (24,1%) en los núcleos en fases G1/G2 no replicantes, reforzando la hipótesis de que las áreas de cromatina decondensada son más susceptibles al daño genético, como ha sido reportado por otros autores utilizando una metodología similar [Cowell *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007, Falk *et al.* 2008; Karagiannis *et al.* 2007; Vasireddy *et al.* 2010]. Por otra parte, la distribución de *foci* de γ H2AX hacia las regiones eucromáticas se incrementó significativamente en los núcleos ES (sesgo: 39.7%), en los cuales la inducción del daño genético aconteció durante la replicación de la EC, en comparación con los núcleos G1/G2 (24.1%). En contraposición, la localización preferencial de *foci* de γ H2AX en regiones eucromáticas disminuyó significativamente en los núcleos LS (sesgo: 6.4%) en los cuales el daño se generó durante la replicación de la HC.

Estos resultados sugieren que si bien los *foci* de γ H2AX predominaron en la EC (menos compacta) independientemente de la fase del ciclo celular, la replicación de la cromatina también moduló la distribución del daño inducido por BLM en cuanto a su localización en eu/heterocromatina tanto en núcleos ES como LS.

Asimismo, las inmunomarcaciones de H3K4me₃ y ser5P-ARN Pol II mostraron una distribución nuclear similar (Figuras 6, 7, 16, 22, 23 y 24), correspondiente al compartimento eucromático. Esto se debería a que el anticuerpo anti-Ser5P-ARN Pol II reveló la cromatina con capacidad de transcribirse, aunque no necesariamente en proceso activo de transcripción al momento de realizar el tratamiento con BLM. Por tanto, es esperable que los resultados de colocalización de *foci* de γ H2AX en relación a ambas marcas fueran comparables.

6.4 Relación entre cromatina dañada y cromatina replicante

En primera instancia es de destacar que la BLM, a la dosis (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tiempo de incubación (30 min) empleados, no afectó el proceso de replicación, ya que la proporción de regiones de cromatina replicante fue similar entre células control y tratadas, confirmando lo observado en estudios previos en cuanto a la no interferencia directa de la BLM sobre la síntesis del ADN [Chen & Stubbe 2005].

Por otra parte, la marcación conjunta en núcleos interfásicos de las regiones eucromáticas (H3K4me₃ positivas) y los patrones de replicación (EdU positivas) permitió profundizar en el análisis de la influencia de la replicación de la cromatina en la distribución del daño primario en eu/heterocromatina.

A este respecto, los resultados obtenidos mediante el algoritmo ICA revelaron una correlación positiva de *foci* de γH2AX versus regiones de cromatina replicante (EdU positivas) tanto en ES como LS (ES: ICQ=0.125, LS: ICQ=0.151; Tabla 7). Asimismo, el análisis de áreas solapantes en máscaras binarias evidenció un predominio del daño en las regiones replicantes (sesgo ES: 66,0%; sesgo LS: 60,6%; Tabla 10). Estos valores resultaron estadísticamente similares indicando un mismo efecto de la replicación sobre la distribución del daño inducido independiente de la fase del ciclo celular.

Este incremento comparable del daño inducido por BLM en la eu- o heterocromatina replicante puede ser explicado por el desenrollamiento local de la cromatina hasta ADN desnudo tanto en la EC como en la HC durante la síntesis de ADN. La decondensación de la eu- o heterocromatina podría incrementar el acceso de las moléculas de BLM al ADN (aumentando el número de sitios dañados) y/o la accesibilidad de quinasas involucradas en la fosforilación de H2AX.

Mediante un diseño experimental diferente (análisis de AC inducidas en el cromosoma cromosoma X de CHO9 por diferentes agentes), Di Tomaso *et al.* [2006; 2010] también concluyeron que la cromatina en proceso de replicación sería más sensible a los agentes inductores de daño en el ADN. Determinaron que las AC inducidas mapeaban principalmente en regiones heterocromáticas en células LS (replicación de la HC) y en regiones eucromáticas en células ES (replicación de la EC).

Por otra parte, la inspección visual de las imágenes fluorescentes y las máscaras binarias correspondientes a núcleos tanto en ES como LS reveló que estos resultados no se debían a una distribución en la cual la mayoría de los *foci* de γH2AX mapeaban dentro de las áreas replicantes y el resto fuera de ellas, sino a una localización recurrente de los *foci* de γH2AX en las regiones frontera entre regiones replicantes y no replicantes (Figuras 19 y 20). Asimismo, se pudo apreciar que el área de los *foci* que no colocalizaba con dominios

replicantes mapeaba con frecuencia en regiones eucromáticas (H3K4me₃ positivas) tanto en núcleos ES como LS (Figuras 25 y 26).

Estas observaciones podrían implicar, en ambas fases, la migración de *foci* de γ H2AX desde dominios replicantes (eu- o heterocromáticos) hacia regiones de EC en los límites entre dominios cromatínicos replicantes y no replicantes.

En este sentido, Aten *et al.* [2004] y Scherthan *et al.* [2008] postularon la existencia de factorías o *hubs* de reparación hacia las cuales migrarían las RDC para ser reparadas. El hecho de no observar en nuestras imágenes protrusiones de ADN marcado con EdU portando *foci* de γ H2AX fuera de los dominios replicantes, sugiere que la migración del daño hacia *hubs* de reparación sería de rango limitado. Dichos *hubs* se localizarían en las interfases de dominios replicantes y no replicantes.

Por otro lado, en ensayos de microirradiación de regiones de HC empleando trayectorias lineales de iones, Jakob *et al.* [2011] observaron el reposicionamiento de *foci* de γ H2AX desde regiones heterocromáticas hacia regiones menos condensadas en la periferia de la HC, sugiriendo el movimiento de los sitios dañados hacia estas regiones para su reparación. Sin embargo, como en nuestras imágenes de núcleos en fase ES (EC replicando) observamos también una distribución de los *foci* de γ H2AX en las interfases replicante/no replicante, la migración hacia estas regiones no dependería del estado de la cromatina. Por el contrario, esta observación implicaría la migración de las RDC hacia compartimentos especializados en regiones eucromáticas fuera de las áreas replicantes, tanto en ES como LS, para su reparación.

Esto permitiría concluir que la cromatina dañada de una región replicante eu- o heterocromática podría migrar hacia una región eucromática no replicante contigua para ser reparada.

Además, estudios de microscopía electrónica y nanoscópicos en el contexto del modelo TC-CI han aportado evidencias que apoyan la existencia de una zona de cromatina decondensada denominada región pericromatínica (en la superficie de cada dominio cromosómico bordeando el CI), la cual constituiría el subcompartimento nuclear principal donde ocurrirían los procesos de transcripción, *splicing* co-transcripcional y replicación del ADN [Jaunin & Fakan 2002; Trentani *et al.* 2003; Markaki *et al.* 2010]. Asimismo, cabe la posibilidad de que otros procesos nucleares de singular importancia, tales como la reparación del ADN, pudieran ocurrir preferencialmente en estas regiones. Para investigar este punto, Solimando *et al.* [2009] utilizaron microscopía electrónica para determinar la distribución de las proteínas de reconocimiento del daño XPA y XPC en líneas celulares humanas. Estas proteínas forman parte del sistema de reparación por escisión de

nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*, NER), el cual resulta esencial para la remoción del daño inducido por UV. Observaron que ambas proteínas se acumulaban rápidamente en la región pericromatínica luego de la irradiación con UV mientras que sólo XPC presentaba una concentración moderada en el interior de los dominios cromatínicos. Esto sugiere que si bien el daño era reconocido por XPC dentro de estos dominios, los complejos de reparación se ensamblaban preferentemente en las regiones pericromatínicas. Sus hallazgos indicarían que las lesiones producidas por UV en el interior de los dominios podrían ser reubicadas hacia las regiones pericromatínicas para su reparación. Por tanto, si bien es posible que las factorías de reparación de RDC (y por consiguiente los *foci* de γ H2AX) se ubiquen preferencialmente en estas regiones, nuestra metodología de estudio no permitió dilucidar este aspecto.

A su vez, la localización de *foci* de γ H2AX en interfases replicantes/no-replicantes podría responder a que las lesiones inducidas por BLM se concentraron en las regiones denominadas TTR (*Timing Transitions Regions*), correspondientes a segmentos de ADN localizados entre dominios de replicación temprana y tardía [Méndez 2009]. Como se mencionó anteriormente, el cambio en la dinámica de replicación entre bandas G-claras y G-oscuras en mamíferos ocurre gradualmente desde fases ES-MS a LS [Takebayashi *et al.* 2005], produciéndose un enlentecimiento significativo de la replicación del ADN cuando las regiones de 1-2 Mb de los TTR replican [Herrick 2011]. Se ha reportado que tras la replicación de las bandas G-claras eucromáticas, las horquillas de replicación se detienen en los TTR de las regiones interbanda, reiniciando la síntesis de ADN en la banda G-oscura adyacente luego de la pausa de fase MS [Holmquist & Ashley 2006]. Esta región interbanda, desprovista de orígenes de replicación, es duplicada usualmente mediante una única horquilla de replicación [Ermakova *et al.* 1999], pudiendo generar regiones propensas al daño genético. A este respecto, Watanabe *et al.* [2002] observaron, midiendo los tiempos de replicación a todo lo largo de los brazos cromosómicos 11q y 21q humanos, que los genes relacionados a cánceres presentes en estos dominios de brazo se concentraban en los TTR. Por otra parte, estas regiones presentaban también una alta frecuencia de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) y de genes relacionados a otras enfermedades, como Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica o fenilcetonuria. En total, 29 de los 52 genes presentes en las regiones de transición entre dominios de replicación temprana y tardía se asociaron a enfermedades. Asimismo, estudios posteriores de este grupo de investigación en líneas celulares humanas, evidenciaron que los amplicones de las bandas cromosómicas 11q13 y 11q22 se localizaban en TTR [Watanabe *et al.* 2004]. Estos estudios sugieren que las regiones entre dominios de replicación temprana y tardía coinciden con regiones inestables del genoma. Ha sido documentado que la existencia de pausas durante la replicación

provoca un incremento en las rupturas del ADN y los reordenamientos cromosómicos [Verbovaia & Razin 1997; Rothstein *et al.* 2000] lo que podría explicar, en parte, la inestabilidad genética de estas regiones.

7. Conclusiones

- 1) La marcación de γ H2AX en núcleos control fue mínima con respecto a la inducida por BLM (40 μ g/ml; 30 min), evidenciando el efecto de la exposición a este agente radiomimético.
- 2) La proporción de regiones de cromatina replicante fue similar entre células control y tratadas, revelando que la BLM a la dosis y tiempo de incubación empleados, no afectó el proceso de replicación.
- 3) El análisis empleando el algoritmo CDA indicó colocalización entre *foci* de γ H2AX inducidos por BLM y *foci* de ser5P-ARN Pol II, confirmando resultados previos en relación a una mayor sensibilidad de la cromatina potencialmente activa a la inducción de daño.
- 4) El análisis mediante el algoritmo ICA y la determinación de áreas solapantes en máscaras binarias reveló colocalización entre las señales de *foci* de γ H2AX y las regiones eucromáticas H3K4me₃ en todas las fases del ciclo celular:
 - a) En los núcleos en fases G1/G2 no replicantes este resultado ratificó la hipótesis, postulada por diversos autores, de que las áreas de cromatina decondensada son más susceptibles al daño genético.
 - b) En comparación con núcleos G1/G2, la localización de *foci* de γ H2AX en las regiones eucromáticas H3K4me₃ se incrementó en núcleos ES mientras que disminuyó en núcleos LS. Este hallazgo demuestra una modulación en la distribución del daño inducido por BLM en eu/heterocromatina por parte de la replicación del ADN.
- 5) Las inmunomarcaciones de H3K4me₃ y ser5P-ARN Pol II mostraron una distribución nuclear similar, correspondiente al compartimento eucromático, ya que el anticuerpo anti-(Ser5P-ARN Pol II) detecta la cromatina con capacidad de ser transcripta, aunque no necesariamente en activa transcripción durante el tratamiento con BLM. Por tanto, era esperable observar resultados similares de colocalización de *foci* de γ H2AX en relación a ambas inmunomarcaciones.

6) El análisis de la distribución de *foci* de γ H2AX *versus* regiones de cromatina replicante mediante el algoritmo ICA y la determinación de áreas solapantes en máscaras binarias evidenció, tanto en ES como LS, un predominio del daño en la cromatina replicante, confirmando resultados anteriores de nuestro equipo de investigación mediante análisis de AC inducidas. Este resultado podría responder a la decondensación local de la eu- o heterocromatina hasta ADN desnudo en dominios replicantes, lo cual incrementaría el acceso de las moléculas de BLM al ADN y/o la accesibilidad de quinasas involucradas en la fosforilación de H2AX.

7) La inspección visual de las imágenes fluorescentes multicanal o las máscaras binarias correspondientes en núcleos ES o LS reveló una localización recurrente de los *foci* de γ H2AX en las regiones frontera entre dominios replicantes y no replicantes. Este hallazgo podría responder a los siguientes fenómenos:

a) la migración de *foci* hacia las fronteras entre dominios de cromatina replicantes/no-replicantes donde se ubicarían factorías o *hubs* de reparación de RDC.

b) la localización preferencial de las lesiones inducidas por BLM en las regiones TTR, correspondientes a segmentos de ADN entre dominios de replicación temprana y tardía, los cuales se ha postulado constituirían regiones del genoma sensibles al daño.

8. Perspectivas

En la presente tesis hemos observado, en núcleos que se encontraban en proceso de síntesis de ADN al momento de inducción del daño, una peculiar distribución de *foci* de γ H2AX. A este respecto, constatamos la presencia de *foci* de γ H2AX en regiones frontera entre dominios replicantes/no-replicantes. Un patrón de distribución de γ H2AX de este tipo no ha sido descrito con anterioridad en la literatura científica, por lo cual sería importante ahondar en el estudio de este fenómeno. Esto podría llevarse a cabo a través de:

- 1) El estudio de la distribución de *foci* de γ H2AX en núcleos replicantes y no replicantes mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica y/o super-resolución, las cuales al permitir el estudio de la estructura nuclear a escala nanoscópica, podrían proporcionar evidencias para determinar si existe una ubicación preferencial de *foci* de γ H2AX en subcompartimentos nucleares especializados en la reparación.
- 2) La utilización de algoritmos que no valoren el solapamiento entre señales fluorescentes (como en los ensayos de colocalización) sino la proximidad entre las mismas. Por ejemplo, algoritmos basados en el análisis de conectividad entre diferentes estructuras o en la generación de capas múltiples dentro del volumen nuclear dependientes de la cercanía a zonas replicantes. Esto posibilitaría abordar con mayor exactitud el estudio de la localización de *foci* de γ H2AX en regiones frontera entre diferentes dominios de replicación nucleares.
- 3) La irradiación de las células con RI para reducir el intervalo de inducción de daño a milisegundos y, de esta forma, eliminar la heterogeneidad de los *foci* de γ H2AX respecto al momento de su formación producto de la exposición de los cultivos a 30 minutos de BLM.
- 4) El estudio de la distribución de *foci* de γ H2AX en núcleos replicantes y no replicantes mediante el análisis de imágenes obtenidas en microscopios confocales de tipo *spinning disk*, lo cual permitiría explorar en células vivas una posible evolución temporal de la distribución de *foci* de γ H2AX en relación a regiones replicantes. Podría complementarse este análisis cinético utilizando el ensayo TUNEL para detectar directamente las RDC generadas en el ADN.
- 5) El uso de sondas fluorescentes para visualizar TTR específicos (por ejemplo, regiones interbanda) junto con *foci* de γ H2AX (técnica de inmuno-FISH), lo cual permitiría evaluar directamente si existe una localización preferencial de los *foci* en algunas de estas regiones del genoma aparentemente sensibles a la inducción de daño.

Además sería de interés evaluar si:

- 1) Los *foci* de γ H2AX se localizan preferentemente en las regiones en proceso de transcripción durante el tratamiento con BLM mediante la inmunodetección de Ser2P-ARN Pol II junto a γ H2AX.
- 2) La marcación pan-nuclear de γ H2AX encontrada en los cultivos expuestos a BLM representa una señal de apoptosis temprana evaluando, por ejemplo, la detección de fosfatidilserina mediante Anexina V.

9. Referencias bibliográficas

- Akhtar A, Gasser S (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* 8:507-517
- Aten J, Stap J, Krawczyk P, van Oven C, Hoebe R, Essers J, Kanaar R (2004) Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303:92-95
- Bartova E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S (2008) Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56:711-721
- Bolte S, Cordelieres F (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213-232
- Boveri T (1909) Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3:181-268
- Branco M, Pombe A (2006) Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol* 4:e138
- Brown C (2007) Fluorescence microscopy- avoiding the pitfalls. *J Cell Sci* 120:1703-1705
- Burma S, Chen B, Murphy M, Kurimasa A, Chen D (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462-42467
- Cann K, Dellaire G (2011) Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol* 89:45-60
- Caron H, van Schaik B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus M, van Asperen R, Boon K, Voute P, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R (2001) The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science* 291:1289-1292
- Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio M, Fernandez-Capetillo O, Pilch D, Sedelnikova O, Eckhaus M, Ried T, Bonner W, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675-679
- Chen J, Ghorai M, Kenney G, Stubbe J (2008) Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 36:3781-3790
- Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: Toward better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-112
- Cheung P, Lau P (2005) Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 19:563-573
- Conchello J, Lichtman J (2005) Optical sectioning microscopy. *Nat Methods* 2:920-931
- Corradini N, Rossi F, Giordano E, Caizzi R, Verni F, Dimitri P (2007) *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. *Heredity (Edinb)* 98:3-12
- Cowell I, Sunter N, Singh P, Austin C, Durkacz B, Tilby M (2007) γ H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS ONE* 2: e1057
- Craig J, Bickmore W (1993) Chromosome bands-flavours to savour. *BioEssays* 15: 349-354

- Cremer T, Cremer C, Schneider T, Baumann H, Hens L, Kirsch-Volders M (1982) Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Hum Genet* 62:201-209
- Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18:307-316
- Cremer T, Cremer M (2010) Chromosome Territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003889
- de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver J (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of γ H2AX in the S phase after UV damage contain double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6870-6875
- Dellaire G, Kepkay R, Bazett-Jones D (2009) High resolution imaging of changes in the structure and spatial organization of chromatin, γ H2AX and the MRN complex within etoposide-induced DNA repair foci. *Cell Cycle* 8:3750-3769
- Di Tomaso M, Liddle P, Lafon-Hughes L, Folle G (2012, en prensa) Chromatin damage patterns shift according to eu/heterochromatin replication. En: "The mechanism of DNA replication" (Ed): Stuart D, University of Alberta, Canada. Intech.
- Di Tomaso M, Martínez-López W, Folle G, Obe P (2006) Modulation of chromosome damage localization by DNA replication timing. *Int J Radiat Biol* 82:877-886
- Di Tomaso M, Martínez-López W, Palitti (2010) Asynchronously replicating eu/heterochromatic regions shape chromosome damage. *Cytogenet Genome Res* 128:111-117
- Dillon N (2004) Heterochromatin structure and function. *Biol Cell* 96:631-637
- Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo M, Lattanzi G, Biamonti G (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118:419-435
- Dimitrova D, Gilbert D (1999) The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1-phase. *Mol Cell* 4:983-993
- Elia M, Bradley M (1992) Influence of chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation. *Cancer Res* 52:1580-1586
- Egloff S, Murphy S (2008) Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* 24:280-288
- Ermakova O, Nguyen L, Little R, Chevillard C, Riblet R, Ashouian N, Birshtein B, Schildkraut C (1999) Evidence that a single replication fork proceeds from early to late replicating domains in the IgH locus in a non-B cell line. *Mol Cell* 3:321-330
- Falk M, Lukasova E, Kozubek S (2008) Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation. *Biochim Biophys Acta* 1783:2398-2414
- Falk M, Lukasova E, Kozubek S (2010) Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat Res* 704:88-100
- Folle G, Boccardo E, Obe G (1997) Localization of chromosome breakpoints induced by DNase I in chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chromosoma* 106:391-399

- Folle G, Liddle P, Lafon-Hughes L, Di Tomaso M (2010) Close encounters: RIDGEs, hyperacetylated chromatin, radiation breakpoints and genes differentially expressed in tumors cluster at specific human chromosome regions. *Cytogenet Genome Res* 128:17-27
- Folle G, Martínez-López W, Boccardo E, Obe G (1998) Localization of chromosome breakpoints: implications of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mutat Res* 404:17-26
- Fraser P, Bickmore W (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447:413-417
- Fussner E, Ching R, Bazett-Jones D (2011) Living without 30 nm chromatin fibers. *Trends Biochem Sci* 36:1-6
- Goedecke W (2007) Double strand break mechanisms in mammalian cells en: Obe G, Vijayalaxmi (Eds.), "Chromosomal alterations: methods, results and importance in human cells", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 53-63
- Goetze S, Mateos-Langerak J, Gierman H, de Leeuw W, Giromus O, Indemans M, Koster J, Ondrej V, Versteeg R, van Driel R (2007) The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol Cell Biol* 27:4475-4487
- Grewal S, Jia S (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8:35-46
- Hakim O, Sung M, Hager G (2010) 3D shortcuts to gene regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22:305-313
- Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Bot* 69:726-818.
- Herrick J (2011) Genetic variation and DNA replication timing, or why is there late replicating DNA? *Evolution* 65:3031-3047
- Holmquist G, Ashley T (2006) Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* 114:96-125
- Jakob B, Splinter J, Conrad S, Voss K, Zink D, Durante M, Löbrich M, Taucher-Scholz G (2011) DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res* 39:6489-6499
- Jaunin F, Fakan S (2002). DNA replication and nuclear architecture. *J Cell Biochem* 85:1-9.
- Jeon Y, Bekiranov S, Karnani N, Kapranov P, Ghosh S, MacAlpine D, Lee C, Hwang D, Gingeras T, Dutta A (2005) Temporal profile of replication of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6419-6424
- Karagiannis T, Harikrishnan K, El-Osta A (2007) Disparity of histone deacetylase inhibition on repair of radiation-induced DNA damage on euchromatin and constitutive heterochromatin compartments. *Oncogene* 26: 3963-3971
- Kimura H, Sugaya K, Cook P (2002) The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells. *J Cell Biol* 159:777-782
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Lliakis (2008) γ H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36:5678-5694

- Kim J, Kruhlak M, Dotiwala F, Nussenzweig A, Haber J (2007) Heterochromatin is refractory to γ H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol* 178:209-218
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705
- Kruhlak M, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller W, McNally J, Bazett-Jones D, Nussenzweig A (2006) Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 172:823-834
- Labit H, Perewoska I, Germe T, Hyrien O, Marheineke K (2008) DNA replication timing is deterministic at the level of chromosomal domains but stochastic at the level of replicons in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res* 36:5623-5634
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8:104-115
- Li Q, Lau A, Morris T, Guo L, Fordyce C, Stanley E (2004) A syntaxin 1, $G\alpha_0$, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunolocalization. *J Neurosci* 24:4070-4081
- Löbrich M, Cooper P, Rydberg B (1996) Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol* 70:493-503
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi A, Barton O, Jeggo P (2010) γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9:662-669
- Loupart M, Krause S, Heck M. (2000) Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 10:1547-1556
- Ma H, Samarabandu J, Devdhar R, Acharya R, Cheng P, Meng C, Berezney R (1998) Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol* 143:1415-1425
- Mahy N, Perry P, Gilchrist S, Baldock R, Bickmore W (2002) Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol* 157:579-589
- Manders M, Verbeek F, Aten J (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. *J Microsc* 169:375-382
- Markaki Y, Gunkel M, Schermelleh L, Beichmanis S, Neumann J, Heidemann M, Leonhardt H, Eick D, Cremer C, Cremer T (2010) Functional nuclear organization of transcription and the interchromatin compartment. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75:475-492
- Marti T, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver J (2006) H2AX phosphorylation within G_1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9891-9896
- Martínez-López W, Folle G, Cassina G, Méndez-Acuña L, Di Tomaso M, Obe G, Palitti F (2004) Distribution of breakpoints induced by etoposide and X-rays along the CHO X chromosome. *Cytogenet Genome Res* 104:182-187

- Martínez-López W, Folle G, Obe G, Jeppesen P (2001) Chromosome regions enriched in hyperacetylated histone H4 are preferred sites for endonuclease- and radiation-induced breakpoints. *Chromosome Res* 9:69-75
- McManus K, Hendzel M (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025
- Méndez J (2009) Temporal regulation of DNA replication in mammalian cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44:343-351
- Misteli T (2007) Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128:787-800.
- Niida H, Katsuno Y, Banerjee B, Hande M, Nakanishi M (2007) Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* 27:2572-2581
- Noon A, Shibata A, Rief N, Löbrich M, Stewart G, Jeggo P, Goodarzi A (2010) 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* 12:177-184
- North A (2006) Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition. *J Cell Biol* 172:9-18
- Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7:3-12
- Pokholok D, Harbison C, Levine S, Cole M, Hannett N, Lee T, Bell G, Walker K, Rolfe P, Herbolsheimer E (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122:517-527
- Postberg J, Alexandrova O, Cremer T, Lipps H (2005) Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J Cell Sci* 118:3973-3983
- Povirk L, Han Y, Steighner R (1989) Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry* 28:5808-5814
- Puerto S, Ramírez M, Marcos R, Creus A, Suralles J (2001) Radiation-induced chromosome aberrations in human euchromatic (17cen-p53) and heterochromatic (1cen-1q12) regions. *Mutagenesis* 16:291-296
- Ramirez O, Garcia A, Rojas R, Couve A, Härtel S (2010) Confined displacement algorithm determines true and random colocalization in fluorescence microscopy. *J Microsc* 239:173-183
- Reddy K, Zullo J, Bertolino E, Singh H (2008) Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452:243-247
- Rogakou E, Pilch D, Orr A, Ivanova V, Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868
- Rogakou E, Boon C, Redon C, Bonner W (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* 146:905-915

- Ronneberger O, Baddeley D, Scheipl F, Verveer PJ, Burkhardt H, Cremer C, Fahrmeir L, Cremer T, Joffe B (2008) Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res* 16:523-562
- Rothkamm K, Löbrich M (1999) Misrejoining of DNA double-strand breaks in primary and transformed human and rodent cells: a comparison between the HPRT region and other genomic locations. *Mutat Res* 433:193-205
- Rothstein R, Michel B, Gangloff S (2000) Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* 14:1-14
- Rouquette J, Cremer C, Cremer T, Fakan S (2010) Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *Int Rev Cell Mol Biol* 282:1-90
- Ryba T, Hiratani I, Lu J, Itoh M, Kulik M, Zhang J, Dalton S, Gilbert D (2010) Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res* 20:761-770.
- Scherthan H, Hieber L, Braselmann H, Meineke V, Zitzelsberger H (2008) Accumulation of DSBs in γ H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochem Biophys Res Commun* 371:694-697
- Sibarita J (2005) Deconvolution microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95:201-243
- Smith Z, Higgs D (1999) The pattern of replication at a human telomeric region (16p13.3): its relationship to chromosome structure and gene expression. *Hum Mol Genet* 8:1373-86
- Solimando L, Luijsterburg M, Vecchio L, Vermeulen W, van Driel R, Fakan S (2009) Spatial organization of nucleotide excision repair proteins after UV-induced damage in the human cell nucleus. *J Cell Sci* 122:83-91
- Solovei I, Kreysing M, Lanctôt C, Kösem S, Peichl L, Cremer T, Guck J, Joffe B (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137:356-368
- Solovjeva L, Svetlova M, Chagin V, Tomilin N (2007) Inhibition of transcription at radiation-induced nuclear foci of phosphorylated histone H2AX in mammalian cells. *Chromosome Res* 15:787-797
- Takebayashi S, Sugimura K, Saito T, Sato C, Fukushima Y, Taguchi H, Okumura K (2005) Regulation of replication at the R/G chromosomal band boundary and pericentromeric heterochromatin of mammalian cells. *Exp Cell Res* 304:162-174
- Tounekti O, Kenani A, Foray N, Orłowski S, Mir L (2001) The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer* 84:1272-1279
- Trentani A, Testillano P, Risueno M, Biggiogera M (2003) Visualization of transcription sites at the electron microscope. *Eur J Histochem* 47: 195–200.
- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28:1-13
- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y (1966) New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 19:200-209

- Unnikrishnan A, Gafken P, Tsukiyama T (2010) Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* 17:430-437
- Vanderwall D, Lui S, Wu W, Turner C, Kozarich J, Stubbe J (1997) A model of the structure of HOO-Co-bleomycin bound to d(CCAGTACTGG)₂: recognition at the d(GpT) site and implications for double-strand cleavage. *Chem Biol* 4:373-387
- Vasireddy R, Karagiannis T, El-Osta A (2010) γ -radiation-induced γ H2AX formation occurs preferentially in actively transcribing euchromatic loci. *Cell Mol Life Sci* 67:291-294
- Verbovaia L, Razin S (1997) Mapping of replication origins and termination sites in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 45:24-30
- Versteeg R, van Schaik B, van Batenburg M, Roos M, Monajemi R, Caron H, Bussemaker H, van Kampen A (2003) The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res* 13:1998-2004
- Watanabe Y, Fujiyama A, Ichiba Y, Hatori M, Yada T, Sakaki Y, Ikemura T (2002) Chromosome-wide assessment of replication timing for human chromosome 11q and 21q: disease-related genes in timing-switch regions. *Hum Mol Genet* 11:13-21
- Watanabe Y, Ikemura T, Sugimura H (2004) Amplicons on human chromosome 11q are located in the early/late-switch regions of replicating timing. *Genomics* 84:796-805
- Woodfine K, Fiegler H, Beare D, Collins J, McCann O, Young B, Debernardi S, Mott R, Dunham I, Carter N (2004) Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet* 13:191-202
- Yang S, Rhind N, Bechhoefer J (2010) Modeling genome-wide replication kinetics reveals a mechanism for regulation of replication timing. *Mol Syst Biol* 6:404
- Zhou J, Ermakova O, Riblet R, Birshtein B, Schildkraut C (2002) Replication and subnuclear location dynamics of the immunoglobulin heavy-chain locus in B-lineage cells. *Mol Cell Biol* 22:4876-4889
- Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T (2007) Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem* 40:101-111