



Departamento de Microbiología

**Estudio de la ubiquitilación del complejo MRN mediada por
SCF(β TrCP/FBXW7): implicaciones biológicas**

TESIS DOCTORAL

ALEJANDRO BELMONTE FERNÁNDEZ

Sevilla, 2023



Departamento de Microbiología

**Estudio de la ubiquitilación del complejo MRN mediada por
SCF(β TrCP/FBXW7): implicaciones biológicas**

Memoria presentada por el Graduado D. Alejandro Belmonte Fernández
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Sevilla

Alejandro Belmonte Fernández

Director del trabajo de investigación:

Francisco Romero Portillo

Sevilla, Abril 2023

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS	III
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
PRINCIPALES SIGLAS Y ABREVIATURAS	XII

Índice de contenidos

Resumen	4
Introducción	
1. El cáncer: un problema global	9
1.1. Biología del cáncer: las células cancerosas y el microambiente tumoral	9
1.2. Principales opciones terapéuticas	15
1.3. Quimioterapia basada en platinos: cisplatino	18
• Mecanismo de acción	19
• Mecanismos de resistencia al tratamiento	23
○ Previos a la diana	24
○ En la diana	25
○ Posteriores a la diana	26
○ Fuera de la diana	27
2. La reparación de roturas de doble cadena en el ADN	28
2.1. Unión de extremos no homólogos (NHEJ)	28
2.2. Recombinación homóloga (HR)	30
2.3. El complejo MRN	33
• Estructura de los componentes del complejo MRN	33
• Principales funciones del complejo MRN	36
• Patologías asociadas a defectos en el complejo MRN	40
3. La ubiquitilación de proteínas	43
3.1. Diversidad de la ubiquitilación	43
3.2. Maquinaria implicada y mecanismo de acción	45
3.3. El complejo ligasa de ubiquitina SCF	47
• La proteína F-box β TrCP	50
○ Sustratos de SCF(β TrCP) destacables y regulación	51
○ Papel de SCF(β TrCP) en la transformación tumoral	53
• La proteína F-box FBXW7	55
○ Sustratos de SCF(FBXW7) destacables y regulación	56
○ Papel de SCF(FBXW7) en la transformación tumoral	57
3.4. Sistemas de degradación de proteínas dependientes de ubiquitina	59
• La vía del proteasoma	59
• La vía de la autofagia/lisosoma	61
Objetivos	69
Materiales y métodos	

1. Material biológico	73
1.1. Bacterias	73
1.2. Células de mamífero	73
• Cultivo de líneas celulares	74
• Descongelación y congelación de células	75
• Tratamiento con diversos compuestos	75
2. Manipulación de ácidos nucleicos	77
2.1. Plásmidos	77
2.2. Aislamiento de plásmidos de bacterias	79
2.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción	79
2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	80
2.5. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	80
2.6. Purificación mediante precipitación fenólica	80
2.7. Ligación de fragmentos de ADN	81
2.8. Reacciones de PCR	81
• Oligonucleótidos cebadores	81
• Amplificación de fragmentos de ADN para clonación	82
• Análisis de transformantes por PCR	82
2.9. Mutagénesis puntual	82
2.10. Transformación de bacterias electrocompetentes	83
2.11. Secuenciación	83
2.12. Transfección transitoria de células de mamíferos	84
• Transfección por electroporación	84
• Transfección con sistemas lipídicos	84
2.13. Producción de lentivirus	85
2.14. Transducción con lentivirus	85
2.15. ARNs pequeños de interferencia (siRNAs)	86
2.16. Silenciamiento génico transitorio	86
3. Análisis de proteínas	87
3.1. Preparación de extractos celulares	87
• Extractos totales	87
• Extractos celulares NP-40	87
• Fraccionamiento subcelular	88
○ Obtención de extractos citosólicos y nucleares	88
○ Obtención de extractos cromatínicos	89
○ Obtención de fracciones enriquecidas en lisosomas	89
3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	90
3.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	90
3.4. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	91
3.5. Fijación de proteínas	91
3.6. Tinción con rojo Ponceau	91

3.7. Inmunodetección de proteínas	91
3.8. Transcripción-traducción <i>in vitro</i>	93
3.9. Ensayos de ubiquitilación	93
• Ubiquitilación <i>in vitro</i>	93
○ Migración y tinción con azul de Coomassie	93
○ Secado de geles y autorradiografía	94
• Ubiquitilación <i>in vitro</i>	94
3.10. Ensayos de co-inmunoprecipitación	95
4. Técnicas celulares	97
4.1. Inmunofluorescencia	97
4.2. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo	98
4.3. Análisis de actividad β -galactosidasa en células senescentes	98
5. Cuantificación y análisis estadístico	99
Resultados	
1. Caracterización de la asociación de β TrCP y FBXW7 con las proteínas del complejo MRN.	103
1.1. β TrCP y FBXW7 interactúan <i>in vivo</i> con las proteínas del complejo MRN.	103
1.2. SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7) ubiquitilan proteínas del complejo MRN tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .	108
1.3. Búsqueda de motivos consenso de interacción con β TrCP y FBXW7 en el complejo MRN.	110
1.4. Estudio de las potenciales quinasas implicadas en la asociación proteína F-box/sustrato.	114
2. Función de la asociación de las proteínas F-box con el complejo MRN.	118
2.1. Papel de la asociación entre SCF(β TrCP) y el complejo MRN.	118
2.2. Estudio funcional de la ubiquitilación del complejo MRN por SCF(FBXW7).	121
• SCF(FBXW7) promueve la degradación del complejo MRN a través de la vía de la autofagia/lisosoma.	121
• El complejo MRN se asocia con p62/LC3 en el núcleo celular tras ser ubiquitilado por SCF(FBXW7).	125
• SCF(FBXW7) induce la localización del complejo MRN en los lisosomas.	131
• La apoptosis provocada por agentes genotóxicos estimula la degradación autofágica del complejo MRN mediada por SCF(FBXW7).	135
3. Efecto de la sobreexpresión de β TrCP en condiciones de senescencia.	143
Discusión	
1. El complejo MRN, un nuevo sustrato de las ligasas de ubiquitina SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7).	156

2. Efecto fisiológico de la asociación de β TrCP y FBXW7 con el complejo MRN.	164
3. Efecto de la sobreexpresión de β TrCP sobre la senescencia inducida por cisplatino.	173
Conclusiones	183
Bibliografía	187
Anexo. Publicación científica	223

Índice de tablas

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas.	73
Tabla 2. Compuestos utilizados para el tratamiento de las células en cultivo.	76
Tabla 3. Plásmidos utilizados.	77
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.	81
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación.	83
Tabla 6. ARNs pequeños de interferencia utilizados.	86
Tabla 7. Anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección de proteínas.	92
Tabla 8. Anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar proteínas.	96
Tabla 9. Anticuerpos empleados en ensayos de inmunofluorescencia.	97
Tabla 10. Motivos de unión a β TrCP identificados y mutados en los componentes del complejo MRN.	111
Tabla 11. Motivos de unión a FBXW7 identificados y mutados en los componentes del complejo MRN.	113

Índice de figuras

Figura 1. Principales características de las células cancerígenas y su microambiente.	14
Figura 2. Dianas moleculares de algunas terapias dirigidas.	16
Figura 3. Estructura molecular del cisplatino y de algunos de sus compuestos derivados.	19
Figura 4. Mecanismo de acción del cisplatino.	20
Figura 5. Apoptosis derivada del daño en el ADN.	23
Figura 6. Mecanismos de resistencia al cisplatino.	24
Figura 7. Reparación de DSBs por la ruta de la recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ).	30
Figura 8. Reparación de DSBs por la ruta de la recombinación homóloga (HR).	32
Figura 9. Representación esquemática de los dominios principales de MRE11, RAD50 y NBS1.	35
Figura 10. Procesamiento de los extremos de una DSB durante la HR.	37
Figura 11. Cambio de conformación del complejo MRN dependiente de ATP.	38
Figura 12. Diferentes formas de ubiquitilación de una proteína sustrato.	44
Figura 13. Maquinaria enzimática implicada en la reacción de ubiquitilación.	46
Figura 14. Componentes del complejo ligasa de ubiquitina SCF.	48
Figura 15. Formas de reconocimiento del sustrato por parte de las proteínas F-box.	50
Figura 16. Representación esquemática de los dominios principales de las isoformas de β TrCP1 y β TrCP2.	51
Figura 17. Actividades asociadas a β TrCP según algunos de los sustratos sobre los que actúa.	54
Figura 18. Estructura del gen <i>FBXW7</i> y principales dominios de las isoformas que codifica.	55
Figura 19. Actividades asociadas a FBXW7 según algunos de los sustratos sobre los que actúa.	58
Figura 20. Estructura del proteasoma.	60
Figura 21. Formas de autofagia características.	62
Figura 22. Etapas de la formación del autofagosoma y la degradación de sus cargos.	63
Figura 23. Efecto del tratamiento con agentes genotóxicos sobre la autofagia.	65
Figura 24. Identificación de un péptido único perteneciente a MRE11 en la inmunoprecipitación de Flag FBXW7 mediante espectrometría de masas en tándem.	103
Figura 25. Identificación de péptidos únicos pertenecientes a RAD50 y NBS1 en la inmunoprecipitación de HA β TrCP mediante espectrometría de masas en tándem.	104

Figura 26. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con HA β TrCP en el núcleo de células de mamífero.	105
Figura 27. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con Flag FBXW7 en el núcleo de células de mamífero.	105
Figura 28. La inmunoprecipitación de las proteínas del complejo MRN trae consigo a HA β TrCP.	106
Figura 29. La inmunoprecipitación de las proteínas del complejo MRN trae consigo a Flag FBXW7.	106
Figura 30. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con la forma endógena de β TrCP.	107
Figura 31. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con la forma endógena de FBXW7.	107
Figura 32. SCF(β TrCP) ubiquitila <i>in vitro</i> a los componentes del complejo MRN.	108
Figura 33. SCF(FBXW7) ubiquitila <i>in vitro</i> a MRE11.	109
Figura 34. Los componentes del complejo MRN son ubiquitilados <i>in vivo</i> por SCF(FBXW7) mediante ubiquitinas unidas a través de la lisina 48.	110
Figura 35. El mutante MRE11 $\Delta\beta$ T pierde la asociación con β TrCP.	112
Figura 36. El tratamiento con CHIR-99021, inhibidor de la quinasa GSK3, reduce la asociación entre las proteínas del complejo MRN y HA β TrCP.	115
Figura 37. El tratamiento con PF-4708671, inhibidor de la quinasa p70S6K, afecta a la asociación entre las proteínas del complejo MRN y HA β TrCP.	116
Figura 38. El tratamiento con CHIR-99021 reduce la asociación entre las proteínas del complejo MRN y Flag FBXW7.	116
Figura 39. MRE11 es ubiquitilado <i>in vivo</i> por SCF(β TrCP) mediante ubiquitinas unidas a través de la lisina 63.	118
Figura 40. El tratamiento con 10 μ M de cisplatino no altera los niveles del complejo MRN, independientemente de la sobreexpresión de HA β TrCP.	119
Figura 41. La sobreexpresión de HA β TrCP favorece la localización en la cromatina del complejo MRN.	120
Figura 42. La sobreexpresión de HA β TrCP ΔF reduce la presencia del complejo MRN en la cromatina en comparación con la observada al sobreexpresar HA β TrCP.	121
Figura 43. La sobreexpresión de HA FBXW7 y HA FBXW7 ΔF afecta a los niveles de las proteínas del complejo MRN.	122
Figura 44. El bloqueo de la vía del proteasoma no altera sustancialmente los niveles del complejo MRN.	123
Figura 45. El bloqueo o estímulo de la vía de la autofagia/lisosoma afecta a los niveles de las proteínas del complejo MRN.	124
Figura 46. El bloqueo de la vía autofágica incrementa los niveles del complejo MRN en la línea celular que sobreexpresa HA FBXW7.	125

Figura 47. El silenciamiento génico transitorio de mediadores del flujo autofágico y de <i>FBXW7</i> permite una acumulación de las proteínas del complejo MRN.	126
Figura 48. Los componentes del complejo MRN se acumulan en la línea celular DLD1 carente del gen <i>FBXW7</i> .	126
Figura 49. Las proteínas del complejo MRN interactúan con p62 y LC3.	127
Figura 50. La interacción entre el complejo MRN y p62/LC3 tiene lugar en el núcleo celular.	128
Figura 51. El bloqueo de la vía de la autofagia/lisosoma fomenta la localización perinuclear de LC3/RAD50 y p62/MRE11.	129
Figura 52. NBS1 colocaliza con MRE11 y RAD50 en el núcleo celular.	130
Figura 53. La ubiquitilación de SCF(<i>FBXW7</i>) sobre el complejo MRN permite su interacción con p62/LC3.	131
Figura 54. El bloqueo de la vía autofágica permite detectar las proteínas del complejo MRN en la fracción lisosomal celular.	132
Figura 55. La sobreexpresión de <i>HA FBXW7</i> potencia la presencia de los componentes del complejo MRN en la fracción lisosomal.	133
Figura 56. La localización de NBS1 en los lisosomas que se detecta al bloquear la vía autofágica en células silvestres no sucede con la sobreexpresión de <i>HA FBXW7 ΔF</i> .	134
Figura 57. La privación de nutrientes no produce una caída en los niveles del complejo MRN, pese a la activación de la autofagia.	135
Figura 58. El tratamiento con dosis de cisplatino capaces de inducir apoptosis provoca una caída en los niveles de las proteínas del complejo MRN.	137
Figura 59. El tratamiento con dosis de doxorrubicina capaces de inducir apoptosis también provoca una bajada en los niveles del complejo MRN.	138
Figura 60. El bloqueo de la autofagia en condiciones de daño apoptótico en el ADN frena la degradación del complejo MRN.	139
Figura 61. El silenciamiento génico transitorio de <i>FBXW7</i> impide la degradación del complejo MRN en condiciones de daño apoptótico en el ADN.	139
Figura 62. El daño apoptótico en el ADN potencia la presencia de NBS1 en los lisosomas en células silvestres pero no en aquellas que sobreexpresan <i>HA FBXW7 ΔF</i> .	141
Figura 63. La diferencia en el marcaje de NBS1 en los lisosomas entre células silvestres y aquellas que sobreexpresan <i>HA FBXW7 ΔF</i> es significativa.	142
Figura 64. Mecanismos moleculares de la inducción de senescencia.	144
Figura 65. La sobreexpresión de <i>HA βTrCP</i> no afecta al ritmo de proliferación celular en condiciones normales.	146
Figura 66. El tratamiento con 5 μM de cisplatino induce senescencia celular, de acuerdo con la actividad β-galactosidasa lisosomal.	147

Figura 67. La sobreexpresión de <i>HA βTrCP</i> provoca una reducción en el número de células que va acompañada de un menor nivel de p21 CIP1 en condiciones de senescencia.	148
Figura 68. La sobreexpresión de <i>HA βTrCP</i> trae consigo una reducción en el número de células posterior a la entrada en senescencia.	149
Figura 69. Las líneas celulares que sobreexpresan <i>HA βTrCP</i> reducen su número de células también en condiciones de senescencia oxidativa.	150
Figura 70. El bloqueo de la vía del proteasoma produce una acumulación de p21 CIP1 en condiciones de senescencia en la línea que sobreexpresa <i>HA βTrCP</i> .	151
Figura 71. El silenciamiento génico transitorio de <i>HA βTrCP</i> permite una acumulación de p21 CIP1 en condiciones de senescencia.	152

Principales siglas y abreviaturas

A: alanina

AUTOTAC: quimera dirigida a la autofagia

C: cisteína

C-terminal: extremo carboxilo terminal de una proteína o polipéptido

CDKs: quinasas dependientes de ciclinas

Cis: cisplatino

Con A: concanamicina A

CPD: fosfodegrón de CDC4 (FBXW7)

D: ácido aspártico

DMSO: dimetilsulfóxido

DSB(s): rotura(s) de doble cadena del ADN

DUB(s): desubicultilasa(s)

Dx: doxorubicina

E: ácido glutámico

EN: extracto nuclear

G: glicina

HR: recombinación homóloga

I: isoleucina

IP: inmunoprecipitación

K: lisina

KU: complejo formado por KU70 y KU80

L: leucina

lncRNAs: ARNs largos no codificantes

MMR: reparación de errores de emparejamiento

MRN: complejo formado por MRE11, RAD50 y NBS1

N: asparagina

N-terminal: extremo amino terminal de una proteína o polipéptido

NER: reparación por escisión de nucleótidos

NHEJ: unión de extremos no homólogos

P: prolina

PROTAC: quimera dirigida a la proteólisis

Q: glutamina

R: arginina

Rapa: rapamicina

S: serina

S100: extracto citosólico

SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia

SCF(β TrCP/FBXW7): complejo formado por SKP1, CUL1, y β TrCP o FBXW7 como proteína F-box

siRNA: ARN pequeño de interferencia

T: treonina

TLS: síntesis por translesión

Tre: trehalosa

Ub: ubiquitina

V: valina

Wb: *Western-blot*

Resumen

El cisplatino, como otros fármacos basados en platino, se encuentra entre los compuestos más usados en las quimioterapias contra distintos tipos de cánceres. Entre sus múltiples efectos, el cisplatino se une al ADN generando una gran variedad de lesiones que provocan, en última instancia, la muerte celular. Algunas de estas lesiones, en concreto las roturas de doble cadena, pueden ser reparadas por recombinación homóloga o por unión de extremos no homólogos, provocando resistencias al fármaco. Uno de los principales intervinientes en la reparación de las roturas de doble cadena es el complejo MRN (MRE11, RAD50 y NBS1), esencial para la identificación de las roturas, el reclutamiento de diversos factores de señalización y el procesamiento, todo ello encaminado a la reparación de las mismas. El complejo MRN también interviene en otros procesos, como la reparación del ADN tras la formación de aductos o tras el colapso de horquillas de replicación. Dado su papel en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, los defectos en los componentes del complejo MRN se han asociado con enfermedades como el cáncer.

La ubiquitilación de proteínas es una modificación post-traduccional que desempeña importantes funciones en la célula: desde la degradación de proteínas vía proteasoma o lisosoma, hasta la modificación de la localización de proteínas concretas o participando en procesos de señalización. La ubiquitilación de las proteínas tiene un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular. Por ello, las alteraciones en la ubiquitilación de determinadas proteínas pueden contribuir a la transformación tumoral. En el proceso de ubiquitilación intervienen distintas enzimas, entre las que destaca la ligasa de ubiquitina, por ser la encargada del reconocimiento del sustrato. La ligasa de ubiquitina SCF está formada por una serie de subunidades entre las que se encuentran las proteínas F-box, cuyo papel es identificar a los sustratos específicos de esta ligasa. Dos de las proteínas F-box más destacadas de SCF son β TrCP y FBXW7. Ambas son responsables de la ubiquitilación de una gran variedad de sustratos implicados en múltiples procesos celulares, y tanto estos como dichas proteínas F-box se han relacionado con diferentes aspectos de la transformación tumoral.

En esta Tesis nos hemos centrado en el estudio del complejo MRN como potencial sustrato de SCF(β TrCP/FBXW7). En el laboratorio se había realizado un estudio de las proteínas que interaccionaban con β TrCP y FBXW7 mediante espectrometría de masas, y entre ellas estaban algunos de los componentes del complejo MRN. Ahora hemos podido confirmar que existe una asociación *in vivo* entre estas proteínas F-box y el complejo MRN en el núcleo de las células de mamífero. Además, tanto SCF(β TrCP) como SCF(FBXW7) son capaces de ubiquitilar *in vitro* e *in vivo* ciertos componentes del complejo, por lo que este es sustrato de ambas ligasas de ubiquitina. La asociación entre β TrCP y MRN ocurre a través de MRE11, que es la diana *in vivo* de esta proteína F-box, y está regulada por las quinasas p70S6K y GSK3. Esta última quinasa también interviene en la asociación de FBXW7 con el complejo MRN.

Profundizando en el papel fisiológico de las asociaciones entre estas proteínas F-box y el complejo MRN, pusimos de manifiesto que β TrCP estimula la localización de los componentes del complejo en la cromatina, aunque se requieren más estudios para conocer la relevancia de estos resultados. Por su parte, la interacción entre FBXW7 y el complejo MRN induce la degradación del mismo por la vía de la autofagia/lisosoma. La ubiquitilación llevada a cabo por SCF(FBXW7) permite que el complejo MRN se asocie con los mediadores del flujo autofágico, p62 y LC3, en el núcleo de la célula para, posteriormente, trasladarse a los lisosomas, donde se llevará a cabo su degradación. Este proceso se potencia cuando la célula entra en apoptosis derivada del tratamiento con agentes genotóxicos.

Por último, a raíz de los ensayos que realizamos estudiando el comportamiento del complejo MRN en respuesta a cisplatino, observamos en varias líneas celulares que el tratamiento con dosis subletales de cisplatino provocaba su entrada en senescencia. Sin embargo, en las líneas celulares equivalentes que sobreexpresaban β TrCP se producía muerte celular, mostrando además unos niveles de p21 CIP1 inferiores a los de las correspondientes líneas silvestres. En la Tesis discutimos las implicaciones derivadas de todos estos resultados.

Introducción

1. El cáncer: un problema global

Bajo el término “cáncer” se engloban un grupo amplio de enfermedades heterogéneas caracterizadas principalmente por una proliferación celular descontrolada que provoca la aparición de una masa anormal de células denominada tumor, con capacidad de invasión y reproducción en otros tejidos (metástasis). Los cánceres hematológicos constituyen una excepción a esta definición, ya que en ellos las células cancerosas se multiplican y diseminan por los sistemas sanguíneo y linfático, así como en la médula ósea (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). El cáncer se sitúa como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, se ha estimado que sólo en el año 2020 se produjeron alrededor de 19,3 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo. Actualmente, el cáncer de mama se sitúa como el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado, con una estimación de 2,3 millones de nuevos casos anuales, lo que supone un 11,7% del total. Le siguen el cáncer de pulmón (11,4%), colorrectal (10%), de próstata (7,3%) y de estómago (5,6%). En lo relativo a la mortalidad, se produjeron casi 10 millones de decesos a causa de esta enfermedad, destacando los derivados del cáncer de pulmón, alrededor de 1,8 millones (18%), seguidos por el colorrectal (9,4%), de hígado (8,3%), de estómago (7,7%) y de mama (6,9%) (Sung *et al*, 2021).

De acuerdo con las tendencias actuales, se espera que el cáncer supere a las enfermedades cardiovasculares como la principal causa de muerte prematura en la mayoría de los países a lo largo de este siglo (Bray *et al*, 2021). De hecho, se estima que para 2040 se alcanzarán 28,4 millones de nuevos casos, lo que supone un incremento del 47% respecto a las cifras actuales. Esta tendencia al alza en los casos, que trae consigo también un incremento en la mortalidad, refleja en gran medida la tendencia de la población mundial al crecimiento y al envejecimiento, como resultado del aumento en la esperanza de vida, así como cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo vinculados a la aparición de la enfermedad. Algunos de ellos, además, están asociados al desarrollo socioeconómico de las diferentes regiones, de manera que los países en los que el cáncer se sitúa como una de las primeras causas de muerte prematura son países que poseen un mayor Índice de Desarrollo Humano (Sung *et al*, 2021; Omran, 2005; Gersten & Wilmoth, 2002). Resulta evidente, pues, que el cáncer es un problema cada vez mayor en la sociedad actual, lo que exige el desarrollo de nuevas medidas de prevención y detección precoz eficaces, así como tratamientos más efectivos.

1.1. Biología del cáncer: las células cancerosas y el microambiente tumoral

Un tumor no puede interpretarse sólo como una masa aislada de células malignas. Se trata de un órgano complejo cuya biología sólo puede entenderse estudiando la

heterogeneidad de tipos celulares presentes en él, así como el microambiente tumoral que construyen durante su desarrollo. Los componentes principales del tumor son las células cancerígenas, que portan las mutaciones responsables de la aparición y curso de la enfermedad, que las hacen proliferar de manera descontrolada. La transformación de una célula normal en una célula potencialmente tumorigénica es un proceso complejo que implica numerosos pasos sucesivos, en los cuales la célula va acumulando alteraciones genéticas. Estas alteraciones conciernen a dos grupos de genes con funciones opuestas: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Los primeros codifican proteínas que promueven la proliferación celular, mientras que los segundos codifican proteínas que reducen la proliferación y/o estimulan la muerte celular. Cuando se producen mutaciones en proto-oncogenes que implican una ganancia de función, estos se convierten en oncogenes, haciendo a la célula más propensa a proliferar de manera descontrolada. De igual manera, cuando se producen mutaciones que conllevan una pérdida de función de los genes supresores de tumores, la célula también se hace proclive a proliferar de un modo aberrante, evadiendo además las posibles señales que, en condiciones normales, provocarían la inducción de la muerte celular programada o apoptosis (Pollock & Meltzer, 2002; Croce, 2008; Krug *et al*, 2002).

La aparición de estas mutaciones permite a la célula multiplicarse a una tasa muy superior a la del resto de células del tejido, cuya proliferación está estrictamente controlada, otorgándole así una posición dominante. De esta manera, dichas mutaciones se seleccionan y, a medida que la proliferación continúa y el tumor progresa, se irán seleccionando nuevas mutaciones que conferirán otras ventajas encaminadas a la supervivencia celular. Así, se puede entender el desarrollo de un tumor como una serie de expansiones clonales en las que se van seleccionando genotipos mutantes de acuerdo con las ventajas que otorgan. En consecuencia, el rasgo probablemente más distintivo de las células tumorales es su inestabilidad genómica. Poseen un genoma plagado de distintos tipos de mutaciones que abarcan desde cambios tan sutiles como mutaciones puntuales a otras más evidentes como amplificaciones o deleciones de secuencias de ADN amplias, así como alteraciones cromosómicas (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). En muchos casos, estas mutaciones se dan en sitios concretos del genoma de manera recurrente, lo que indica que esas regiones han de albergar genes cuya alteración favorece la progresión neoplásica (Korkola & Gray, 2010).

Por tanto, las células cancerosas deben desarrollar una tasa de mutación alta (Negrini *et al*, 2010; Salk *et al*, 2010). Esta elevada mutabilidad se puede lograr incrementando la sensibilidad a los agentes mutagénicos y/o anulando el normal funcionamiento de uno o varios componentes de la maquinaria de mantenimiento genómico. Además, la acumulación de mutaciones puede acelerarse al comprometer los sistemas de vigilancia que normalmente monitorizan la integridad genómica y

obligan a las células dañadas genéticamente a parar su ciclo celular de manera temporal o permanente (Sigal & Rotter, 2000; Kastan, 2008; Jackson & Bartek, 2009). El ejemplo más representativo de esto lo constituye la proteína p53, conocida como el “guardián del genoma” (Lane, 1992), cuyo gen se encuentra mutado en al menos el 50% de los tumores malignos humanos (Levine, 1997; Kandoth *et al*, 2013).

Sin embargo, los patrones de expresión génica aberrantes que presentan las células tumorales no sólo se deben a los diferentes tipos de mutaciones que incorporan en su genoma. También se pueden deber a modificaciones en la programación epigenética celular. Alterando la metilación del ADN o modificando las histonas, estas células son capaces, por ejemplo, de inactivar la expresión de determinados genes supresores de tumores (Esteller, 2007; Berdasco & Esteller, 2010; Jones & Baylin, 2007). Esta reprogramación epigenética se ve además influida en gran medida por las propiedades del microambiente tumoral. En este contexto, tiene especial relevancia el ambiente hipóxico que caracteriza los tumores, o ciertas regiones dentro de estos. La hipoxia reduce la actividad de las desmetilasas TET, provocando así cambios en el patrón de metilación del ADN, en concreto hipermetilación (Thienpont *et al*, 2016). Incluso en determinados tipos de tumores, la hipoxia puede activar programas de regulación genética responsables directos del crecimiento tumoral (Lin & Monje, 2020; Michealraj *et al*, 2020).

A través de estas alteraciones genéticas y epigenéticas, las células cancerosas son capaces de adquirir una serie de propiedades que les permiten mantener de un modo u otro su proliferación exacerbada. Entre estas propiedades cabría destacar la inducción y mantenimiento de señales que regulan positivamente la proliferación celular, eludiendo a la vez los programas que la regulan negativamente, la inmortalidad replicativa, la capacidad para evadir la muerte celular programada o la reprogramación de su metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

Las células cancerígenas no son una población homogénea, sino que presentan una amplia variabilidad fenotípica, en buena parte derivada de la heterogeneidad genética que se establece a medida que el tumor progresa. La elevada inestabilidad genómica propia de estas células provoca la aparición de subpoblaciones genéticamente distintas dentro del mismo tumor, que contribuyen en conjunto a la progresión de la enfermedad (Yachida *et al*, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Por otro lado, a la heterogeneidad fenotípica presente en el tumor también contribuye de manera sustancial la presencia de células en diferentes estadios de diferenciación. Los tumores presentan una población de células madre cancerosas (CSCs, del inglés *cancer stem cell*) que presentan las propiedades básicas de cualquier célula madre normal, fundamentalmente las capacidades de autorrenovación y diferenciación, pudiendo generar subpoblaciones funcionalmente distintas que darían soporte en conjunto al crecimiento tumoral. Además, una célula puede desdiferenciarse y volver a los estadios previos de célula progenitora, o bien una célula progenitora puede bloquear

su diferenciación y proliferar manteniéndose en un estado de diferenciación parcial, o bien una célula puede transdiferenciarse y generar células fenotípicamente diferentes a las originales. Esta plasticidad de fenotipos afecta a la respuesta que tendrá el tumor ante un determinado tratamiento, ya que, las distintas subpoblaciones, según sus características fenotípicas, serán más o menos sensibles a la terapia (Hanahan, 2022; Senga & Grose, 2021; Hanahan & Weinberg, 2011).

Un buen ejemplo de la plasticidad propia de las células tumorales lo encontramos en el proceso de metástasis. A medida que el tumor progresa, las células cancerosas van adquiriendo diferentes capacidades que les permiten invadir tejidos adyacentes o lejanos, lo que se conoce como metástasis. El proceso de metástasis abarca una serie de pasos en los que se incluye la invasión del tejido local, la intravasación de las células tumorales en vasos sanguíneos y/o linfáticos, el tránsito a través de ellos hasta tejidos distantes, la extravasación en estos tejidos y la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), que finalmente crecerán hasta formar nuevos tumores macroscópicos, proceso denominado colonización (Talmadge & Fidler, 2010). Las células cancerosas situadas en los márgenes de los tumores deben activar un programa regulador denominado transición epitelio-mesénquima que les otorga los cambios fenotípicos necesarios para poder desarrollar esta capacidad invasiva reversible (Lambert & Weinberg, 2021; Gupta *et al*, 2019; Bakir *et al*, 2020). En la inducción de este programa juegan un papel fundamental las condiciones del microambiente tumoral en los márgenes del tumor, como la hipoxia o las diferentes citoquinas secretadas por las células del microambiente, así como los cambios en la programación epigenética celular (Lindner *et al*, 2020; Javaid *et al*, 2013; Serrano-Gomez *et al*, 2016; Skrypek *et al*, 2017).

Además de las propias células cancerígenas, en el tumor y su microambiente podemos encontrar diversos tipos celulares, entre los que destacan las células endoteliales y pericitos, que conforman los vasos sanguíneos (Hanahan & Weinberg, 2011). Los tumores, al igual que cualquier otro tejido, requieren un aporte constante de nutrientes, así como la eliminación de los productos metabólicos de desecho. Para ello, se valen de los vasos sanguíneos propios del tejido circundante, e inducen la formación de nuevos vasos que nutren de manera específica al tumor, proceso denominado angiogénesis. Los vasos sanguíneos neoformados resultan de una mezcla desbalanceada de señales proangiogénicas, por lo que suelen presentar células endoteliales que proliferan y entran en apoptosis en tasas anormalmente altas. Además, presentan una estructura aberrante y débil, lo que puede derivar en microhemorragias y un flujo sanguíneo errático (Nagy *et al*, 2010; Baluk *et al*, 2005).

Otros tipos celulares que podemos encontrar son los fibroblastos y células del sistema inmune. Entre todas las células del estroma y las células tumorales se establece una señalización recíproca, de manera que las segundas inducen el reclutamiento de las primeras y las modifican epigenética y fenotípicamente para

facilitar la progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Hanahan, 2022). En particular, las células inmunes, contra las que las células cancerosas desarrollan diferentes mecanismos de evasión, pueden promover un estado inflamatorio protumorigénico al proporcionar al microambiente tumoral moléculas bioactivas que favorecen la proliferación celular y facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis, entre otros fenómenos (DeNardo *et al*, 2010; Grivennikov *et al*, 2010; Qian & Pollard, 2010; Karnoub & Weinberg, 2006).

Además de los tipos celulares antes mencionados, en los tejidos neoplásicos también se pueden encontrar células senescentes de diversos orígenes. La senescencia se caracteriza por una detención de la proliferación normalmente irreversible inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran la falta de nutrientes, el daño en el ADN o el daño de orgánulos y ciertas estructuras celulares, entre otros. Estos estímulos se asocian en muchos casos a la propia célula tumoral, particularmente el daño en el ADN causado por la hiperproliferación aberrante, o son provocados por ciertos tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Birch & Gil, 2020; Gorgoulis *et al*, 2019; Hernandez-Segura *et al*, 2018). No obstante, la inducción de senescencia celular no sólo se observa en los tumores a nivel de las propias células cancerosas, sino que también puede observarse en diferentes tipos de células del microambiente tumoral, como los fibroblastos o las células endoteliales, afectando todo ello al desarrollo del tumor (Birch & Gil, 2020; Faget *et al*, 2019; Wang *et al*, 2020a; Hwang *et al*, 2020; Wang *et al*, 2020b).

Por último, cabría destacar un par de elementos relevantes sobre los que se está poniendo el foco por su posible papel en el desarrollo del cáncer: la microbiota y la señalización neuronal. En este contexto, la microbiota se define como el conjunto de microorganismos que se asocian simbióticamente a los tejidos del cuerpo expuestos al medio exterior, como la epidermis y las mucosas internas (sobre todo el tracto gastrointestinal, pero también en pulmones, mamas y sistema urogenital). Cada vez hay más estudios que indican que la variabilidad polimórfica que se detecta a nivel del microbioma entre individuos diferentes puede tener un profundo impacto en el desarrollo del cáncer (Dzutsev *et al*, 2017; Helmink *et al*, 2019). Determinados microorganismos, fundamentalmente bacterias, aunque no sólo estas, pueden tener efectos protectores o promotores de la aparición y progresión del tumor, así como afectar a la respuesta al tratamiento. Sería el caso, por ejemplo, de la microbiota intestinal en el cáncer de colon (Sears & Garrett, 2014), aunque también se han realizados estudios en otros casos (Healy & Moran, 2019; Swaney & Kalan, 2021; Willis & Gabaldón, 2020; Xu *et al*, 2020a). También se ha documentado presencia de microbiota en el interior de las células tumorales de distintos tipos de cáncer (Nejman *et al*, 2020), la cual tendría un papel relevante en los procesos inflamatorios asociados al tumor y la progresión del mismo (Jin *et al*, 2019; Pushalkar *et al*, 2018).

Respecto a la señalización neuronal, diversos estudios han correlacionado la densidad de fibras nerviosas que inervan un tumor con la agresividad del mismo (Magnon *et al*, 2013; Albo *et al*, 2011; Shao *et al*, 2016; Huang *et al*, 2014). El aumento de la señalización a través de receptores β -adrenérgicos, mediada por noradrenalina, favorece el desarrollo tumoral y la metástasis en diversos modelos de cáncer (Le *et al*, 2016; Partecke *et al*, 2016; Zahalka *et al*, 2017). Además, los niveles circulantes de noradrenalina aumentan en situaciones de estrés crónico, situación que se ha descrito como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Thaker *et al*, 2006; Lillberg *et al*, 2003). Asimismo, la señalización neuronal puede jugar un papel importante en la modulación del microambiente tumoral (Senga & Grose, 2021).

Como podemos ver, la biología de un tumor resulta extremadamente compleja, tanto por la enorme cantidad de alteraciones que pueden presentar las propias células cancerosas como por las complicadas relaciones que estas establecen con el microambiente tumoral. A modo de síntesis, en la **Figura 1** se muestran las características fundamentales de las células cancerosas, según la revisión más reciente elaborada por Douglas Hanahan (Hanahan, 2022).

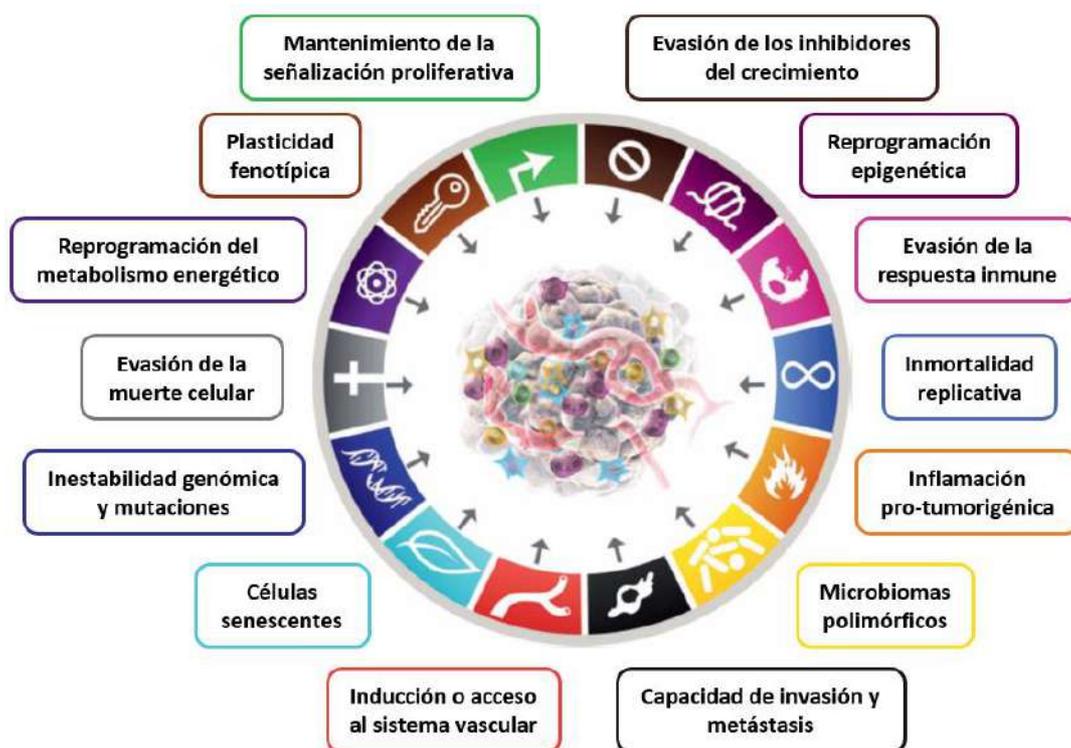


Figura 1. Principales características de las células cancerígenas y su microambiente. Figura modificada a partir de Hanahan, 2022.

1.2. Principales opciones terapéuticas

Los tratamientos contra el cáncer han experimentado una gran evolución en las últimas décadas a medida que se ha alcanzado un mayor conocimiento de la biología y el desarrollo de esta enfermedad. Tradicionalmente, los tratamientos más utilizados han sido la resección quirúrgica del tumor localizado en un tejido u órgano específico, junto con radioterapia y quimioterapia. La radioterapia consiste en la eliminación de las células tumorales mediante radiación de alta energía y se utiliza en una proporción elevada de pacientes (Baskar *et al*, 2012). Por su parte, la quimioterapia utiliza fármacos citotóxicos que atacan especialmente a células con tasas de proliferación altas, como las células cancerígenas, pero también afectan a otras células normales que proliferan rápidamente, como las células de la piel, la médula ósea o el epitelio del tracto gastrointestinal. Esto causa una elevada toxicidad, provocando los efectos secundarios más comunes asociados a estos tratamientos (Chabner & Roberts Jr, 2005). El repertorio de fármacos quimioterápicos es enormemente variado. Los primeros grupos de fármacos utilizados fueron los agentes alquilantes (derivados de las mostazas nitrogenadas, como la ciclofosfamida, entre otros), que causan citotoxicidad al añadir grupos alquilo al ADN, y los antimetabolitos (aminopterin, metotrexato, etc.), que son moléculas cuya estructura mimetiza la de metabolitos fisiológicos provocando el bloqueo de ciertas reacciones enzimáticas e inhibiendo la replicación del ADN y, en última instancia, la proliferación celular. Destacan también los fármacos antimetabólicos (vinblastina, paclitaxel, etc.), que interfieren en la dinámica de los microtúbulos y bloquean la mitosis impidiendo la proliferación; los antibióticos citotóxicos (doxorubicina, actinomicina D, etc.); los inhibidores de poliaminas y su transporte (α -difluorometilornitina, entre otros) y los agentes moduladores de hierro (deferroxamina, triapina, etc.) (Falzone *et al*, 2018). A la variedad de quimioterapias existentes hay que sumar las terapias combinadas que se aplican hace décadas y han mejorado sustancialmente los resultados en los pacientes (Shewach & Kuchta, 2009). En la práctica clínica resulta también común el uso de terapias hormonales, beneficiosas contra aquellos tumores que tienen una pronunciada dependencia hormonal, como los de mama o próstata. Consiste en el uso de compuestos que interfieren con la producción de hormonas, como los inhibidores de la aromatasa, o bloquean ciertos receptores hormonales, como los antiandrógenos (Fairchild *et al*, 2015; Abraham & Staffurth, 2016).

No obstante, la escasa especificidad y los importantes efectos secundarios de las terapias clásicas ponen de manifiesto la necesidad de buscar nuevos tratamientos más tolerables y efectivos. En este sentido, el conocimiento cada vez mayor sobre las rutas celulares de señalización que dirigen procesos fundamentales para el mantenimiento de las células tumorales ha permitido el desarrollo de nuevas terapias que mejoran en eficacia y reducen los efectos indeseados de las quimioterapias tradicionales. Son las llamadas terapias dirigidas (**Figura 2**). Estas terapias tienen como objetivo bloquear

rutas o proteínas específicas, es decir, dianas moleculares como receptores, factores de crecimiento, quinasas o moléculas relacionadas con la apoptosis o la angiogénesis, que están presentes también en células normales pero que suelen estar sobreexpresadas o mutadas en las células cancerígenas, resultando esenciales para el mantenimiento de las mismas. De esta manera, el efecto tóxico se concentra en las células malignas, minimizándose en las células sanas y evitándose así buena parte de los posibles efectos secundarios (Chabner & Roberts Jr, 2005).

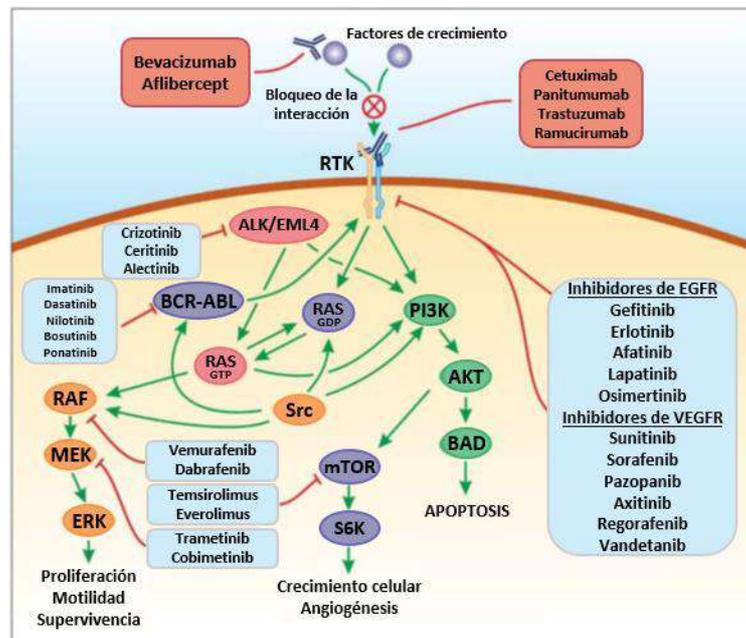


Figura 2. Dianas moleculares de algunas terapias dirigidas. Se representan anticuerpos monoclonales dirigidos contra factores de crecimiento específicos, que impiden que estos interactúen con sus receptores, o contra receptores quinasas de tirosina (RTK) extracelulares, que bloquean la señalización a través de estos. También se muestran algunos inhibidores de proteínas quinasas (inhibidores de EGFR y VEGFR, inhibidores de ALK/EML4, inhibidores de BCR-ABL, inhibidores de RAF, inhibidores de mTOR e inhibidores de MEK). Todos estos compuestos interfieren rutas o proteínas específicas que son esenciales para el mantenimiento de las células cancerígenas. Figura modificada a partir de Falzone *et al*, 2018.

Entre las terapias dirigidas destaca la inmunoterapia. Los tratamientos inmunoterapéuticos tienen como objetivo estimular el sistema inmune del paciente para que sea capaz de reconocer y atacar a las células cancerosas. Estas terapias, cuya efectividad se ha demostrado contra diferentes tipos de cáncer, incluyen el uso de anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos, citoquinas, vacunas o terapias basadas en células (Lee Ventola, 2017a, 2017b). Los anticuerpos monoclonales se han convertido en una parte fundamental de las terapias contra el cáncer, gracias a su versatilidad en el reconocimiento de diferentes receptores u otras proteínas celulares (Falzone *et al*, 2018). Así, pueden ejercer una acción citotóxica directamente sobre las células tumorales estimulando el sistema inmune para que desarrolle respuestas

anticancerígenas, bloquear los mecanismos inmunosupresores que permiten que las células cancerosas escapen del sistema inmune o anular el efecto de moléculas angiogénicas que estimulan la vascularización del tumor (Zahavi & Weiner, 2020; Falzone *et al*, 2018; Guo & Cui, 2020).

Por otro lado, dentro de las terapias dirigidas nos encontramos un grupo amplio de pequeñas moléculas inhibitoras. Son compuestos de bajo peso molecular que se pueden unir con gran afinidad a un rango amplio de dianas extracelulares e intracelulares, entre las que destacan quinasas de tirosina, quinasas de serina/treonina, maquinaria de regulación epigenética o proteínas de la familia BCL-2 (Sharma *et al*, 2022; Bedard *et al*, 2020). La selectividad de estos compuestos es variable, lo que permite dividirlos en dos grandes grupos: los inhibidores multiquinasa, que están dirigidos simultáneamente contra diversas quinasas de la célula, y los inhibidores selectivos, que tienen menos dianas e incluso, en algunos casos, solo una, lo que es especialmente eficaz en aquellos tumores que presentan dependencia de una oncoproteína concreta o alguna vulnerabilidad específica (Bedard *et al*, 2020; Paez *et al*, 2004).

Asimismo, para evitar la falta de especificidad de la quimioterapia tradicional, se han desarrollado sistemas para el envío dirigido de moléculas citotóxicas conjugadas a anticuerpos monoclonales o ligandos peptídicos, o incluidas en nanoestructuras transportadoras. El conocimiento de marcadores específicos presentes en la superficie de las células tumorales de forma exclusiva, o más abundante de lo habitual en una célula normal, permite que, con estos métodos, se alcance una mayor concentración del fármaco en las células cancerosas, reduciendo así la toxicidad periférica (Hughes, 2010; Allen, 2002; Okarvi, 2008; Danhier *et al*, 2010). Existe una gran variedad de nanoestructuras con aplicación en la terapia contra el cáncer, como por ejemplo las nanopartículas poliméricas, dendrímeros o liposomas. Estas nanoestructuras se pueden “cargar” por diferentes métodos y hacer diana en las células tumorales bien a través de antígenos específicos o gracias a la elevada permeabilidad de los vasos sanguíneos neoformados que nutren el tumor. Esto, junto al pobre drenaje linfático del mismo, hace que los nanotransportadores se acumulen pasivamente en los tejidos neoplásicos en lugar de hacerlo en los tejidos sanos. Sin embargo, pese a sus ventajas, también presentan ciertas limitaciones, como la dificultad para penetrar en las regiones profundas del tumor (Gmeiner & Ghosh, 2015; Zhao *et al*, 2018).

Los tratamientos contra el cáncer constituyen un campo en constante evolución. Las opciones terapéuticas se han multiplicado, apareciendo nuevas líneas de tratamiento que presentan una mayor eficacia respecto a las tradicionales, con una reducción significativa de los efectos secundarios sobre los tejidos sanos. Sin embargo, factores como la amplia heterogeneidad intra e intertumoral, la diversidad de tipos celulares, tejidos y órganos a los que el cáncer puede afectar, o el hecho de que los tumores no sean estáticos sino que vayan evolucionando con el tiempo a medida que

acumulan nuevas mutaciones, entre otros factores (Duffy, 2013), hacen que el tratamiento para esta enfermedad siga siendo un reto a día de hoy.

1.3. Quimioterapia basada en platinos: cisplatino

Entre los fármacos quimioterapéuticos más utilizados en la clínica destacan los agentes basados en platino. Son compuestos de coordinación metálicos constituidos por un átomo de platino central al que se le unen diversos ligandos. Entre ellos, nos centraremos en el cisplatino (cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂], cis-diaminodicloroplatino (II) o CDDP). En su caso, al platino central se le unen 4 ligandos formando una geometría plana cuadrada: dos grupos amino fuertemente unidos al átomo de platino y dos grupos cloruro en posición *cis* que permitirán ejercer su acción citotóxica (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

El cisplatino fue sintetizado por primera vez por Michele Peyrone en 1844 y su estructura química elucidada por Alfred Werner en 1893 (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Sin embargo, el efecto antitumoral de este compuesto comenzó a estudiarse a partir de las observaciones realizadas por el físico americano Barnett Rosenberg y su equipo en la década de 1960. Intentando averiguar el posible efecto de la aplicación de un campo eléctrico sobre el crecimiento bacteriano, descubrieron por casualidad que, a partir de los electrodos de platino inmersos en el medio de cultivo bacteriano que estaban utilizando, se formaban sales de platino que impedían la división bacteriana. De entre las sales formadas, los mayores efectos se observaron en el caso del cisplatino (Rosenberg *et al*, 1967, 1965). Estudios posteriores comprobaron que el efecto antiproliferativo de este compuesto también era aplicable al cáncer (Rosenberg *et al*, 1969). Así, en 1978 la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) de Estados Unidos aprobó el uso del cisplatino como nuevo fármaco contra el cáncer, dando comienzo así a una nueva etapa revolucionaria en quimioterapia marcada por el desarrollo y uso de agentes basados en platino (Prestayko *et al*, 1979).

Desde sus inicios, los fármacos derivados del platino, en especial el cisplatino, son el pilar fundamental de la quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cánceres, entre los que destacan los de testículo, vejiga, pulmón, ovario, cuello uterino, esófago, estómago, mama, próstata y cabeza y cuello (Kelland, 2007). Sus aplicaciones son múltiples, abarcando distintos regímenes de tratamiento en combinación con otros fármacos quimioterápicos o radioterapia (Wang *et al*, 2021). El fármaco suele provocar una respuesta terapéutica inicial exitosa, asociada con una remisión completa o parcial, o una estabilización de la enfermedad (Galluzzi *et al*, 2012). Por desgracia, también puede provocar diversos efectos secundarios en los pacientes, como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, ototoxicidad o neurotoxicidad, así como náuseas y vómitos (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014;

Dilruba & Kalayda, 2016; Kelland, 2007; Cvitkovic *et al*, 1977). Además, la resistencia al cisplatino representa un obstáculo importante para el éxito del tratamiento. Ciertos tumores son intrínsecamente resistentes al fármaco mientras que otros originalmente sensibles desarrollan resistencia gradualmente después de la respuesta inicial (Galluzzi *et al*, 2012).

Los importantes efectos secundarios y la aparición de quimiorresistencias impulsaron el desarrollo de nuevos compuestos derivados del original, en cuyas estructuras los ligandos iniciales son sustituidos por otros diferentes (**Figura 3**), afectando con ello a su actividad biológica (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Así, pasando por la segunda generación de compuestos en la década de 1980, representada por el carboplatino, y la tercera generación a principios de los 2000, representada por el oxaliplatino, llegamos hasta las versiones más recientes, donde la variedad de compuestos derivados del platino se diversifica mucho más (satraplatino, nedaplatino, heptaplatino o lobaplatino, entre otros) (Dilruba & Kalayda, 2016). Con todos estos compuestos se pretende mantener o mejorar la eficacia del original, a la vez que reducir los efectos secundarios y la aparición de resistencias. No obstante, el tratamiento con cisplatino sigue siendo todavía la opción preferente en múltiples situaciones clínicas.

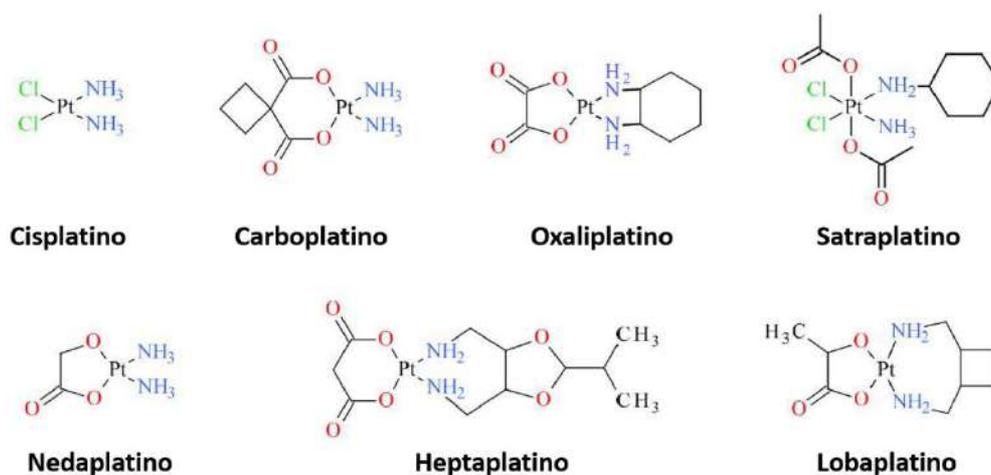


Figura 3. Estructura molecular del cisplatino y de algunos de sus compuestos derivados. Figura modificada a partir de Mastalarz *et al*, 2020.

- **Mecanismo de acción**

Tras confirmarse el efecto antitumoral del cisplatino, comenzó a estudiarse su mecanismo de acción (**Figura 4**). En el torrente sanguíneo y en los fluidos extracelulares el fármaco tiene escasa actividad, siendo prácticamente inerte. A día de hoy, el mecanismo por el cual el cisplatino se incorpora a la célula sigue sin estar totalmente definido. Tradicionalmente se pensaba que la entrada ocurría por difusión

pasiva a través de la membrana plasmática y por medio de transportadores específicos (Gately & Howell, 1993). Diversos estudios han demostrado que entra en la célula a través del sistema de transportadores del cobre CTR, como CTR1 y CTR2, una familia de proteínas transmembrana que participan en el transporte y homeostasis de este metal (Kilari *et al*, 2016). Por otro lado, también se ha visto que intervienen los canales de aniones regulados por volumen (VRACs, del inglés *volume-regulated anion channels*), formados por heterómeros de la proteína LRRC8. Se ha estimado que una proporción elevada del cisplatino que entra en la célula depende de sus subunidades LRRC8A y LRRC8D (Planells-Cases *et al*, 2015). Además de estos transportadores, se han descrito otros potenciales candidatos, aunque tienen un papel menos definido (Rottenberg *et al*, 2021).

Una vez dentro de la célula, la molécula de cisplatino debe activarse, para lo cual se sustituyen uno o los dos grupos cis-cloruro que posee inicialmente por moléculas de agua. Por tanto, la activación del cisplatino depende de las condiciones del medio, en concreto, de la concentración fisiológica del ion cloruro: en la sangre, la concentración es de alrededor de 100 mM, suficientemente alta como para mantener la molécula de cisplatino en su estado inicial inactivo. Dentro de las células, la concentración del ion es bastante más baja, lo que permite la sustitución de estos grupos por agua, con la consiguiente activación de la molécula (Chu, 1994).

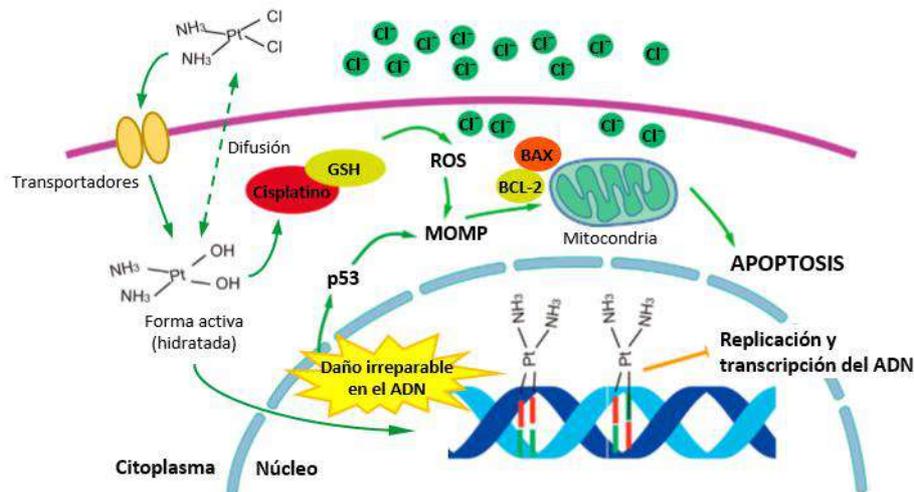


Figura 4. Mecanismo de acción del cisplatino. Cuando el fármaco se incorpora a la célula, la baja concentración intracelular del ion cloruro permite la hidratación de la molécula de cisplatino, que se torna reactiva. Entonces, ejerce su acción citotóxica tanto a nivel citoplasmático como nuclear, provocando así la muerte celular. Figura modificada a partir de Wang *et al*, 2021.

Las formas mono y bi-hidratadas del cisplatino son altamente reactivas, causando efectos citotóxicos tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear. Si bien la diana clásica del cisplatino es el ADN celular, además de unirse y lesionar también el ADN mitocondrial, los efectos de este fármaco a nivel citoplasmático son destacables, ya

que se ha demostrado una citotoxicidad significativa en células enucleadas (Berndtsson *et al*, 2007). Una proporción considerable del cisplatino que entra en la célula interacciona con una gran variedad de moléculas nucleófilas presentes en el citoplasma, como el glutatión reducido (GSH), los grupos tiol o sulfhidrilo de proteínas como las metalotioneínas o ciertos fosfolípidos, entre otras (Galluzzi *et al*, 2014). Estas interacciones facilitan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) que tienen un papel dual, favoreciendo por un lado la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, del inglés *mitochondrial outer membrane permeabilization*) que conduce a la apoptosis, y agravando por otro lado el daño en el ADN causado por el cisplatino directamente (Sancho-Martínez *et al*, 2012).

A nivel nuclear, el cisplatino se une con gran afinidad al ADN, concretamente a los sitios N7 de las purinas, generando monoadductos y enlaces intracatenarios 1,2 y 1,3 (Chen *et al*, 2016a). Las uniones intracatenarias 1,2 constituyen la lesión más frecuente, contribuyendo en gran medida a la citotoxicidad (Chaney *et al*, 2005). También, aunque en menor proporción, se generan enlaces intercatenarios (Ming *et al*, 2017), los cuales, al unir covalentemente las dos hebras de la molécula de ADN, obstaculizan la apertura de la doble hélice que tiene lugar en diferentes procesos como el de replicación (o la transcripción), provocando el colapso de la horquilla de replicación y la aparición de roturas de doble cadena (DSBs, del inglés *double-strand breaks*) (Rocha *et al*, 2018). Toda esta variedad de lesiones en el ADN puede ser reparada por diferentes vías, entre las que destacan la reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés *nucleotide excision repair*), la reparación de errores de emparejamiento (MMR, del inglés *mismatch repair*), la recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*) y la unión de extremos no homólogos o recombinación no homóloga (NHEJ, del inglés *nonhomologous end joining*) (Martin *et al*, 2008).

En consecuencia, los aductos y los enlaces en las cadenas de ADN alteran y dañan la estructura de la doble hélice e interfieren con los procesos de replicación y transcripción. Se activa entonces la respuesta a daños en el ADN, provocando una parada del ciclo celular, fenómeno que permite a los mecanismos de reparación reestablecer la integridad del ADN, evitando así posibles mitosis anormales (Vitale *et al*, 2011). Si el daño es excesivo y no se puede reparar, las células entran en muerte celular programada, generalmente apoptosis (**Figura 5**). Muy resumidamente, esto implica la activación secuencial de las quinasas ATM y ATR, que activan a sus proteínas efectoras CHK2 y CHK1, respectivamente, quienes a su vez fosforilan a la proteína supresora de tumores p53 provocando su estabilización (Roos *et al*, 2016). Esta ejerce diversas funciones tanto a nivel nuclear, activando la expresión de genes cuyos productos estimulan la apoptosis, como a nivel citoplasmático, lo que promueve la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, desencadenando así la

apoptosis intrínseca, promovida internamente en la célula. También se estimula la expresión de genes que codifican componentes de la vía apoptótica extrínseca, promovida por factores externos (Kroemer *et al*, 2007; Galluzzi *et al*, 2011). La vía extrínseca se activa cuando ligandos concretos se unen a receptores específicos de la membrana plasmática, miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Tras la unión, se transmiten señales al interior celular que reclutan procaspasas e inician la cascada apoptótica (Kischkel *et al*, 1995). Por su parte, en la vía intrínseca intervienen las proteínas de la familia BCL-2, que facilitan la formación de poros en la membrana externa mitocondrial, permitiendo así la liberación del citocromo C al citoplasma. Este se une al factor activador de proteasas apoptóticas APAF1 y, junto a la procaspasa 9, forman el apoptosoma. Se produce entonces la activación de otras caspasas, como las caspasas 3 y 7, que se encargarán de procesar diversos sustratos celulares (Nuñez *et al*, 1998).

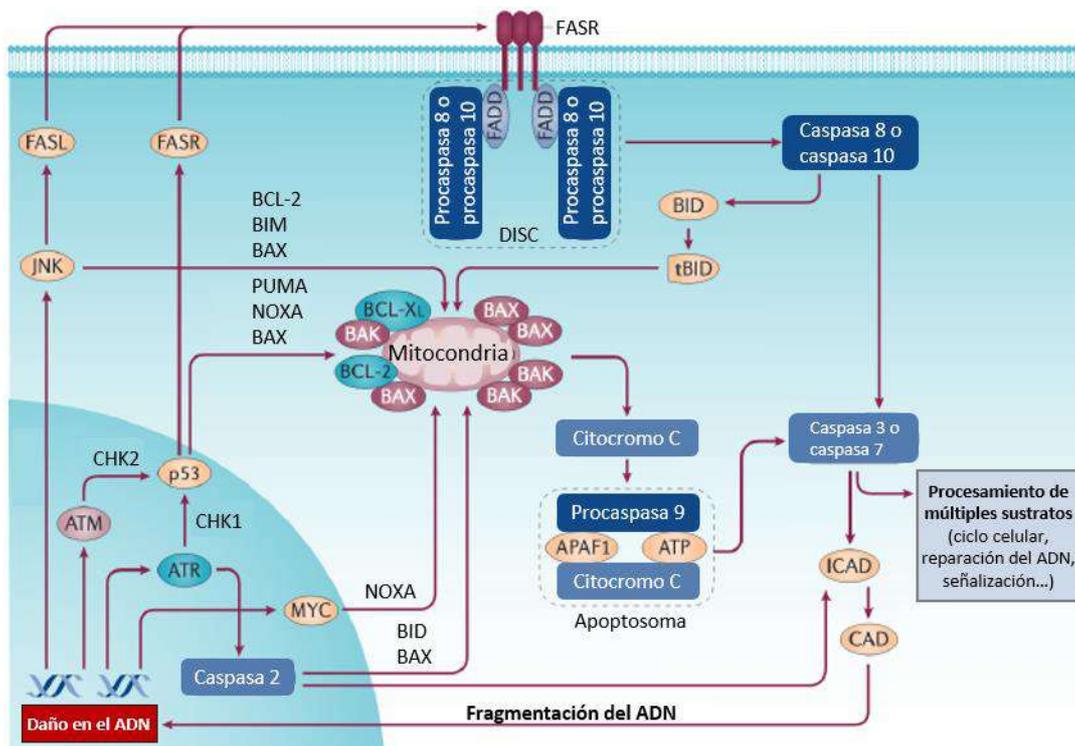


Figura 5. Apoptosis derivada del daño en el ADN. El daño en el ADN activa la apoptosis, tanto por la vía intrínseca como extrínseca, a través de 3 efectores principales: JNK, p53 y MYC. Respecto a la vía extrínseca, se activan proteínas que actúan a modo de ligandos de los receptores de muerte localizados en la membrana plasmática, como es el caso del ligando FAS (FASL) para el receptor FASR. Tras la unión ligando-receptor, estos receptores transmiten señales al interior celular por medio del complejo señalizador de inducción de muerte (DISC) provocando la activación de las caspasas. Respecto a la vía intrínseca, la estabilización de p53 debida a las fosforilaciones llevadas a cabo por CHK2 y CHK1, activadas a su vez por ATM y ATR, y la inducción de MYC, entre otros factores, promueven que los miembros proapoptóticos de la familia BCL-2 inhiban a los antiapoptóticos y generen poros en la membrana externa mitocondrial, permeabilizándola. Tiene lugar entonces la liberación del citocromo C al citoplasma, el cual se asocia con APAF1 y la procaspasa 9, formando el apoptosoma. Este complejo facilita la activación de las caspasas 3 y 7, que se encargan de ejecutar el resto del programa apoptótico mediante el procesamiento de diversos sustratos, como proteínas de ciclo o de reparación del ADN. Además, procesan a ICAD, inhibidor de la DNasa activada por caspasas (CAD), lo que permite que esta fragmente el ADN celular. Figura modificada a partir de Roos *et al*, 2016.

- **Mecanismos de resistencia al tratamiento**

Como se ha descrito anteriormente, la buena respuesta inicial que muestran los pacientes de diversos tipos de tumores al tratamiento con cisplatino a menudo deriva en la aparición de resistencias que provocan el fracaso terapéutico. Dado que en la acción citotóxica de este fármaco intervienen diversos mecanismos moleculares, el fenotipo de resistencia puede deberse a alteraciones en uno o más de uno de esos circuitos (Galluzzi *et al*, 2012). Los mecanismos de resistencia al cisplatino suelen clasificarse según el momento en que tenga lugar el fenómeno respecto al principal objetivo del fármaco: la unión al ADN celular. Así, podemos encontrar mecanismos de resistencia previos a la diana, en la diana, posteriores a la diana o fuera de esta (**Figura 6**).

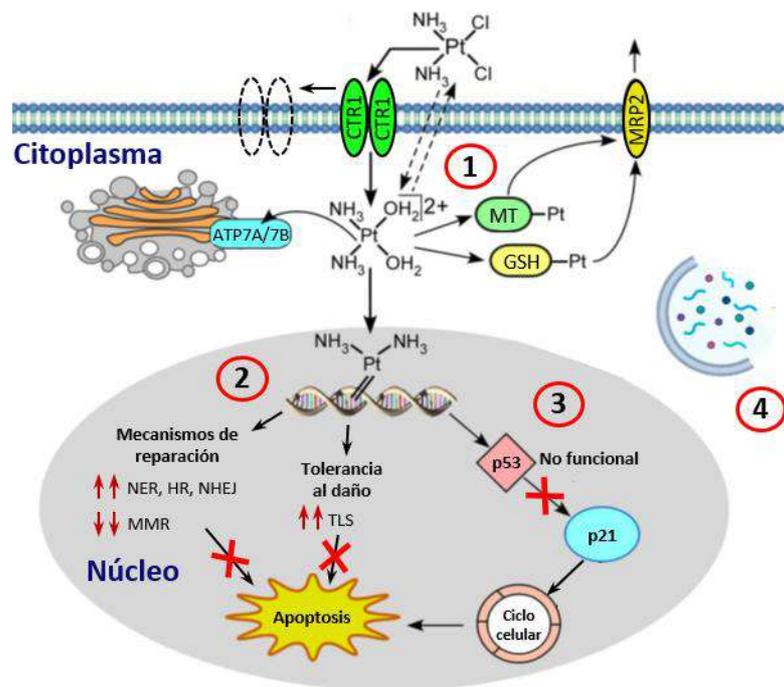


Figura 6. Mecanismos de resistencia al cisplatino. Se representan los mecanismos previos a la diana (1), como la reducción de la entrada del fármaco o su inactivación citoplasmática; en la diana (2), como una mayor eficacia de los mecanismos de reparación de daños en el ADN o una mayor capacidad para tolerar los daños; posteriores a la diana (3), como la inactivación de la proteína p53; y fuera de la diana (4), como una mayor actividad autofágica. Figura modificada a partir de Dilruba & Kalayda, 2016.

○ *Previos a la diana*

Se distinguen dos mecanismos principales por los que las células cancerosas pueden eludir el efecto del cisplatino antes de que este ejerza su acción citotóxica: la reducción de la acumulación intracelular de cisplatino y la inactivación del cisplatino citoplasmático.

La reducción de la acumulación intracelular del fármaco puede deberse bien a una disminución en la entrada del mismo o bien a un aumento en su expulsión. El tratamiento con cisplatino puede seleccionar células con una menor expresión del transportador de cobre CTR1, lo que conlleva a una menor entrada de este fármaco (Holzer *et al*, 2006). También se ha asociado a este fenómeno la pérdida de las subunidades LRRC8A y LRRC8D de los canales tipo VRACs (Planells-Cases *et al*, 2015). Por otro lado, las ATPasas de tipo P extrusoras de cobre, ATP7A y ATP7B, parecen estar implicadas en la excreción del cisplatino. ATP7A lo aísla en vesículas para evitar una mayor distribución, mientras que ATP7B es responsable de su expulsión (Kalayda *et al*, 2008; Safaei, 2006). Estos transportadores se han encontrado sobreexpresados en células cancerosas resistentes a cisplatino (Samimi *et al*, 2004). Igualmente, se ha estudiado que la sobreexpresión de proteínas de resistencia a múltiples fármacos, especialmente MRP2, miembro de la familia de transportadores ABC, también

contribuye a la reducción de la concentración intracelular de cisplatino (Liedert *et al*, 2003; Borst *et al*, 2000).

Una vez que el fármaco se ha incorporado al citoplasma, la interacción con ciertas moléculas nucleófilas presentes en él, como el GSH o las metalotioneínas, limita la cantidad de cisplatino reactivo disponible en la célula, contribuyendo así a su detoxificación. Se han observado niveles altos de GSH o de glutatión S-transferasa (GST), enzima que media la unión del cisplatino al GSH, en células resistentes al cisplatino (Galluzzi *et al*, 2012). Los conjugados cisplatino-GSH se excretan fuera de la célula a través del transportador MRP2 (Borst *et al*, 2000).

○ *En la diana*

La sensibilidad de la célula tumoral al tratamiento con cisplatino depende en gran medida del daño que sea capaz de producir la unión del fármaco al ADN celular. Por ello, la capacidad de la célula para reparar o tolerar estos daños es esencial para sobrevivir y desarrollar resistencia al tratamiento. Así pues, los mecanismos de reconocimiento y reparación de los daños en el ADN tienen un papel fundamental en la aparición de resistencias.

La reparación por escisión de nucleótidos (NER) resulta básica en la respuesta al daño en el ADN causado por el cisplatino (Wood *et al*, 2000; Shuck *et al*, 2008). Interviene fundamentalmente en la reparación de aductos intracatenarios mediante la escisión de los nucleótidos dañados por medio de un corte a ambos lados de la lesión, seguido de la síntesis de nuevo ADN para reconstituir la sección afectada (Gillet & Schärer, 2006). Así, se ha vinculado una mayor eficacia en la reparación de daños por esta ruta con la resistencia al tratamiento con cisplatino (Galluzzi *et al*, 2012).

Los aductos generados por el cisplatino también son reconocidos por la maquinaria de reparación de errores de emparejamiento (MMR), que se encarga habitualmente de corregir inserciones, deleciones y otras incorporaciones de bases erróneas en los procesos de replicación y recombinación del ADN (Vaisman *et al*, 1998; Kunkel & Erie, 2005). No obstante, en el caso del daño provocado por cisplatino, la maquinaria del MMR fracasa en el proceso de reparación, lo que acaba desencadenando señales proapoptóticas. Por ello, se han asociado mutaciones y menor expresión de ciertos genes que codifican proteínas clave de la maquinaria de MMR con una mayor resistencia al tratamiento (Galluzzi *et al*, 2012; Rocha *et al*, 2018).

También se han vinculado defectos en la maquinaria de la MMR con un incremento del fenómeno denominado síntesis por translesión (TLS, del inglés *translesion synthesis*) (Galluzzi *et al*, 2012), por el cual el daño provocado por el agente genotóxico no se repara, sino que se tolera y la molécula de ADN dañada continúa replicándose (Yamanaka *et al*, 2017). En este fenómeno intervienen polimerasas de ADN especializadas que carecen de actividad correctora de errores, lo que les permite

continuar con la replicación pese a la persistencia del daño (Lange *et al*, 2011). Por otro lado, dado que este mecanismo es propenso a introducir errores en la secuencia de ADN, además de incrementar la tolerancia celular al tratamiento, genera nuevas mutaciones que aumentan la inestabilidad genómica y la heterogeneidad, favoreciendo el desarrollo de subpoblaciones resistentes a cisplatino (Zhang, 2020). De hecho, se han relacionado niveles de expresión altos de los genes que codifican para esas polimerasas con una mayor resistencia al tratamiento (Rocha *et al*, 2018).

Por su parte, las rutas de la recombinación homóloga (HR) y de la no homóloga (NHEJ) intervienen fundamentalmente en la reparación de roturas de doble cadena producto del tratamiento con cisplatino (Diggle *et al*, 2005; Sears & Turchi, 2012; Telli *et al*, 2016). Existen cada vez más evidencias que vinculan gran parte de las proteínas que intervienen en el proceso de HR con la resistencia celular intrínseca o adquirida al cisplatino (Rocha *et al*, 2018). Así, aquellas células cancerosas que muestran una HR eficaz son más resistentes al tratamiento que aquellas que muestran unos mecanismos defectuosos. Además, la expresión alterada de determinados genes que codifican proteínas de la ruta de la NHEJ también se puede asociar con la resistencia a platinos en determinados tipos de cáncer (Huang *et al*, 2021).

- *Posteriores a la diana*

La resistencia a cisplatino también puede derivar de alteraciones en las rutas de señalización que normalmente desencadenan la apoptosis en respuesta a los daños en el ADN. Uno de los mecanismos más comunes implica la inactivación de la proteína supresora de tumores p53 (Vousden & Lane, 2007). Generalmente, las células cancerosas que portan *TP53* silvestre suelen ser más sensibles al tratamiento con cisplatino que aquellas que portan versiones mutantes del gen (Gaducci *et al*, 2002; Feldman *et al*, 2008).

Otros estudios han señalado que, en células resistentes al fármaco, la ruta de las quinasas MAP (MAPK), que tiene un papel importante en la regulación de la apoptosis en respuesta a cisplatino, no funciona correctamente, limitando así la señalización a través del sistema FAS/FASL, inductor de la apoptosis extrínseca, lo que promueve en conjunto la supervivencia celular (Spierings *et al*, 2003).

Por otro lado, la resistencia puede derivar de modificaciones en la propia maquinaria de ejecución de la apoptosis. Por ejemplo, una menor expresión o inhibición de proteínas proapoptóticas como BAD o BAX o la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-2, BCL-XL o MCL-1 se relacionan con una peor respuesta al tratamiento con cisplatino (Huang *et al*, 2021).

- *Fuera de la diana*

El fenotipo resistente a cisplatino también está sostenido por alteraciones en vías de señalización que no están directamente implicadas en la respuesta al fármaco. El incremento de la actividad autofágica, alteraciones en la vía PI3K/AKT1, el incremento en la producción de moléculas antioxidantes para neutralizar las ROS, la acción de diferentes chaperonas implicadas en la respuesta a proteínas desplegadas o distintas formas de reprogramación metabólica son sólo algunos ejemplos de los múltiples mecanismos que también están implicados o favorecen la resistencia a cisplatino (Galluzzi *et al*, 2012; Wang *et al*, 2021). Además, ciertas características del microambiente tumoral, como la exposición a condiciones hipóxicas, el remodelado de la matriz extracelular o la inflamación pueden contribuir de diferentes formas a la resistencia (Huang *et al*, 2021).

2. La reparación de roturas de doble cadena en el ADN

Las DSBs constituyen el tipo de lesión en el ADN más peligrosa para la célula. La rotura de las dos cadenas del ADN puede resultar de la exposición celular a agentes exógenos como la radiación ionizante o ciertos fármacos quimioterapéuticos, pero también puede aparecer espontáneamente, de manera endógena, en condiciones de estrés replicativo o por la aparición de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, estas lesiones también pueden ocurrir de manera programada en ciertos fenómenos fisiológicos como la meiosis o la diversificación de las inmunoglobulinas (Cejka & Symington, 2021; Aguilera & Gómez-González, 2008).

En el caso del tratamiento con cisplatino, las DSBs no son la lesión más frecuente, pero se encuentran entre las que entrañan mayor riesgo. Esto se debe probablemente a la dificultad de su reparación ya que, a diferencia de otro tipo de lesiones en las que el daño recae sobre una de las cadenas del ADN mientras la otra sigue intacta y puede ser usada como molde para la reparación, en el caso de las DSBs está comprometida la integridad de las dos cadenas a la vez. Además, se interfiere con procesos fundamentales para la célula, como la replicación y la transcripción, lo que puede desencadenar la muerte celular programada (Rocha *et al*, 2018).

De manera general, la célula puede utilizar dos vías principales para reparar las DSBs: la recombinación homóloga (HR) y la recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ), además de otras vías secundarias.

2.1. Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

La reparación de DSBs por la ruta de la unión de extremos no homólogos clásica (c-NHEJ, en adelante NHEJ) es un fenómeno que puede ocurrir a lo largo de todo el ciclo celular, pero es especialmente relevante en las fases G₀, G₁ y S temprana, al ser un proceso que no requiere la presencia de ADN homólogo para la reparación (**Figura 7**) (Takata *et al*, 1998; Delacôte & Lopez, 2008). Pese a ser un mecanismo de reparación eficiente, dependiendo de la secuencia específica y las modificaciones químicas presentes en el punto de rotura, la NHEJ puede ser mutagénica, es decir, propensa a introducir errores en la secuencia reparada. Además de ser un mecanismo clave para la reparación del daño en el ADN, la NHEJ también participa en otros fenómenos fisiológicos especializados, como la recombinación V(D)J, la recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas o la dinámica de los telómeros (Hartlerode & Scully, 2009).

La NHEJ se inicia con un complejo heterodimérico compuesto de las proteínas KU70 y KU80, que reconocen la DSB y se unen con gran afinidad al ADN en ambos extremos de la rotura, promoviendo su alineamiento (Walker *et al*, 2001; Cary *et al*, 1997). La asociación del complejo KU con el ADN ocurre muy rápido tras el daño y sirve como andamiaje para la unión de otros factores clave en el proceso. A continuación, se

recluta a ambos lados de la rotura la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs), miembro de la familia de proteínas quinasas PIKKS (Gottlieb & Jackson, 1993). Los complejos KU se desplazan hacia el interior de la molécula de ADN, lo que permite que las DNA-PKcs contacten con el ADN y entre ellas, formándose así un “puente molecular” o sinapsis entre las hebras del ADN roto (Yoo & Dynan, 1999; DeFazio *et al*, 2002).

La asociación de DNA-PKcs con el ADN y el complejo KU hace que la primera active su función quinasa de serina/treonina (Yaneva *et al*, 1997). Esto permite que DNA-PKcs se autofosfore y sea fosforilada por otras quinasas como ATM, lo que regula el acceso al punto de rotura de otros factores de la NHEJ (Uematsu *et al*, 2007; DeFazio *et al*, 2002). A su vez, DNA-PKcs es capaz de fosforilar otros sustratos que actúan posteriormente en la ruta de reparación. Uno de ellos es la endonucleasa Artemis, que es fosforilada e incorporada a la DSB para procesar los extremos rotos (Soubeyrand *et al*, 2006). Las DSBs pueden generar diferentes tipos de extremos, por lo que se requiere la acción de determinadas enzimas para que recorten y procesen estos extremos y los transformen en extremos 5'-fosforilados aptos para la posterior ligación, y en ello juega un papel esencial Artemis. Esta enzima posee actividad exonucleasa 5'-3' independiente de DNA-PKcs, y actividad endonucleasa dependiente de ella, lo que le permite procesar fragmentos de ADN de cadena sencilla, de cadena doble y horquillas (Ma *et al*, 2005, 2002). El procesamiento de estas regiones puede generar vacíos en la secuencia del ADN que deberán ser completados por las polimerasas de ADN. Concretamente, se han destacado las de la familia de la polimerasa de ADN de tipo X, como son las polimerasas μ y λ (Nick McElhinny & Ramsden, 2004).

Una vez que las polimerasas de ADN completan los huecos generados, la NHEJ culmina con la ligación de los extremos del ADN que lleva a cabo el complejo XRCC4/Ligasa IV/XLF. Tanto XRCC4 como XLF carecen de actividad enzimática, pero son necesarios para el correcto funcionamiento de la ligasa de ADN IV (Lees-Miller & Meek, 2003). XLF es similar estructuralmente a XRCC4 y juntos forman el andamiaje necesario para proteger la DSB y permitir el reclutamiento de la ligasa de ADN IV para procesar y reparar la rotura (Ahnesorg *et al*, 2006). La ligasa de ADN IV puede ligar tanto hebras de ADN con extremos romos o salientes compatibles (Grawunder *et al*, 1997) como algunas hebras con extremos incompatibles o que conservan huecos de varios nucleótidos en su secuencia (Tsai *et al*, 2007; Gu *et al*, 2007). Además, este complejo tiene la capacidad de poder ligar una cadena del ADN independientemente de la otra, lo que permite que la maquinaria de procesamiento actúe a la vez que la de ligación (Ma *et al*, 2004).

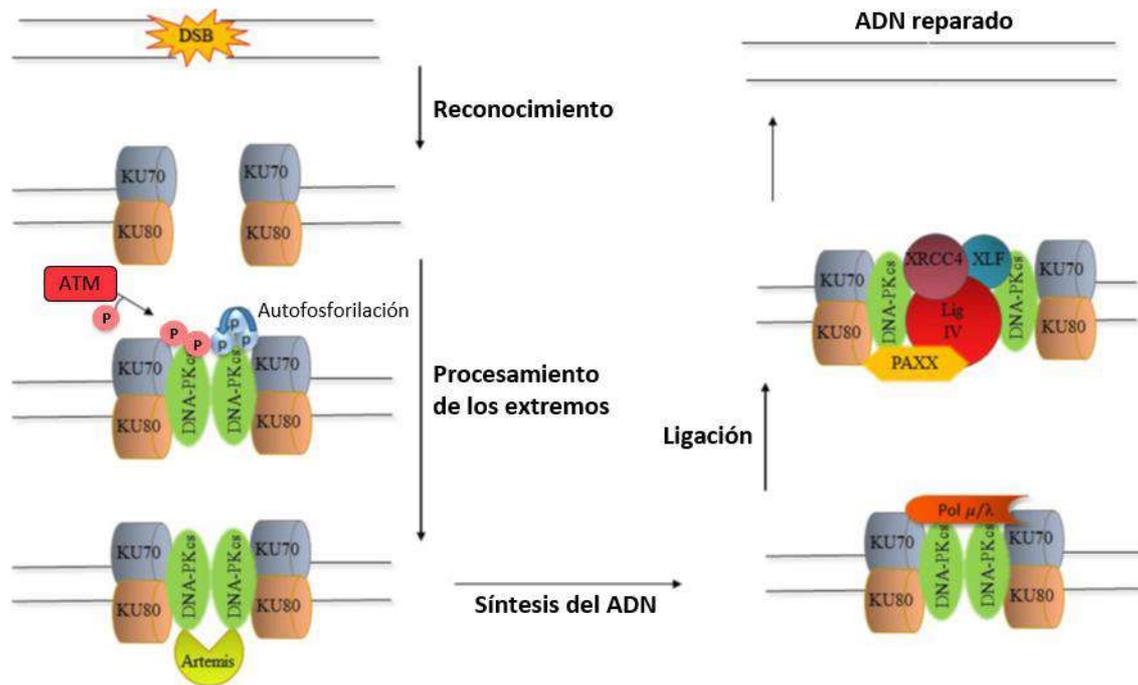


Figura 7. Reparación de DSBs por la ruta de la recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ). Figura modificada a partir de Rahimian *et al*, 2020.

El proceso de NHEJ es complejo y en él intervienen, además de los factores mencionados, otros como la proteína PAXX, que promueve el ensamblaje de factores clave de la NHEJ en los sitios dañados, regula la actividad de la polimerasa de ADN λ , y estimula la actividad de la ligasa IV (Tadi *et al*, 2016; Craxton *et al*, 2018).

2.2. Recombinación homóloga (HR)

Las DSBs también se pueden reparar por recombinación homóloga clásica (c-HR, en adelante HR), la ruta de reparación esencial de las fases S y G₂ del ciclo celular ya que requiere la presencia de una cromátida hermana cuya secuencia de ADN, homóloga a la secuencia dañada, sirva de molde para la reparación (**Figura 8**). Por tanto, a diferencia de la NHEJ, la HR es un mecanismo libre de errores (Bhattacharjee & Nandi, 2016). Por otra parte, la HR también tiene un papel clave en fenómenos como la meiosis o el mantenimiento de los telómeros (San Filippo *et al*, 2008).

En las primeras fases de la HR, el complejo MRN (formado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1) juega un papel crucial. Tras producirse la DSB, este complejo se une a los puntos de rotura y mantiene próximos los extremos del ADN mediante la interacción entre las diferentes subunidades de RAD50 (Hopfner *et al*, 2002; Lafrance-Vanasse *et al*, 2015). Además, permite el reclutamiento y activación de otros factores implicados en la cascada de señalización de respuesta al daño, como la quinasa ATM, que interacciona directamente con NBS1 (Lee & Paull, 2005, 2004). ATM se encarga de fosforilar numerosos sustratos que intervienen en la señalización de los daños en el

ADN, como la histona H2AX, cuya fosforilación es un marcador temprano de la presencia de DSBs en la cromatina, así como otras proteínas implicadas en distintas etapas de la HR (Li *et al*, 2000; Matsuoka *et al*, 2007; Savic *et al*, 2009; Wang *et al*, 2013a).

Para que tenga lugar la reparación de los daños en el ADN por HR es necesario que se generen extremos con salientes 3'-hidroxilo de cadena sencilla a ambos lados del punto de rotura. Con este fin tiene lugar una resección inicial en la que participa la subunidad MRE11 del complejo MRN, cuya actividad nucleasa permite procesar los extremos dañados. En este paso no sólo interviene este complejo, sino también CtIP y BRCA1 (Huertas, 2010; Cejka & Symington, 2021). La ligasa de ubiquitina BRCA1 interacciona con CtIP y lo poliubiquitila, lo que resulta esencial para su reclutamiento en los sitios de daño en el ADN y la apropiada resección (Chen *et al*, 2008; Yu *et al*, 2006; Yun & Hiom, 2009). Se forma así un complejo MRN/CtIP/BRCA1 que lleva a cabo una resección corta a ambos lados de la rotura. Posteriormente, esta resección se amplía y acelera por medio de otras nucleasas como EXO1, la nucleasa/helicasa DNA2 y la helicasa BLM, formándose así tramos más largos de ADN monocatenario (Cejka & Symington, 2021). En todo este proceso intervienen además las quinasas ATM y ATR, miembros de la familia de proteínas quinasas PIKKs, que modulan la actividad de algunas de las proteínas que intervienen en la resección, como el complejo MRN, EXO1 y DNA2 (Jasin & Rothstein, 2013; Symington & Gautier, 2011).

Los segmentos generados de ADN de cadena sencilla se cubren rápidamente con la proteína RPA, que estabiliza y protege estas estructuras monocatenarias de la acción de las nucleasas. No obstante, para que continúe el proceso de reparación, RPA debe ser desplazada y sustituida por la recombinasa RAD51. Dado que RPA se une con mayor afinidad que RAD51 a las secuencias de ADN de cadena sencilla, se requiere la acción adicional de proteínas mediadoras. En concreto la proteína BRCA2, que es reclutada en la DSB a través de BRCA1, y parálogos de RAD51, entre otros (Sun *et al*, 2019; Talens *et al*, 2017). Una vez que la recombinasa RAD51 se une establemente al ADN monocatenario, los filamentos nucleoproteicos generados pueden invadir la cromátida hermana para buscar la correspondiente secuencia homóloga. Se forma entonces una estructura *D-loop* en la que el extremo 3' de la hebra invasora actúa como cebador a partir del cual la polimerasa de ADN sintetiza la nueva hebra usando la homóloga como molde (Rahimian *et al*, 2020). Finalmente, las estructuras generadas se pueden resolver con o sin intercambio de información genética culminando así la reparación de la DSB (Hartlerode & Scully, 2009).

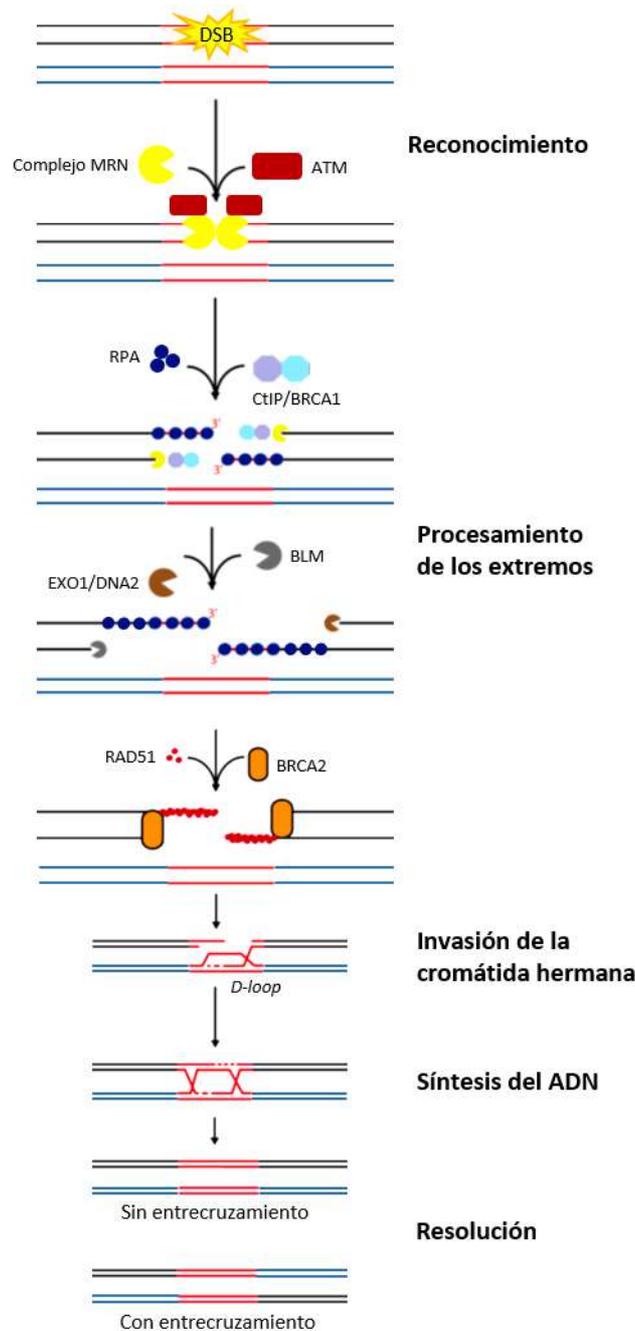


Figura 8. Reparación de DSBs por la ruta de la recombinación homóloga (HR). Figura modificada a partir de una modificación realizada por Fernández Ávila, 2016 de Hartlerode & Scully, 2009.

La elección de la ruta de reparación (NHEJ o HR) depende fundamentalmente del ciclo celular. Para llevar a cabo la HR se requiere la presencia de cromátidas hermanas, las cuales se generan durante la replicación del ADN que tiene lugar en la fase S. Además, las quinasa dependientes de ciclinas (CDKs) regulan la actividad de diversos sustratos que intervienen en la resección de las hebras del ADN (Ceccaldi *et al*, 2016). La formación de ADN de cadena sencilla extendido en los puntos de rotura favorece la HR y evita la reparación mediada por NHEJ, ruta en la que la resección es mínima o inexistente. En la regulación de este proceso juega un papel fundamental la

fosforilación de CtIP. En las fases S y G₂, las CDKs fosforilan a CtIP en diferentes residuos, estimulando así la resección (Wang *et al*, 2013). Estas fosforilaciones no sólo aumentan su actividad, sino que también incrementan su interacción con BRCA1 (Huertas & Jackson, 2009; Yu & Chen, 2004), lo cual, como indicamos anteriormente, resulta esencial para la resección inicial. Esta regulación dependiente de CDKs también afecta a otros actores clave de la HR, como EXO1 (Tomimatsu *et al*, 2014). En cambio, la NHEJ se favorece por la localización de KU70/KU80 en los extremos rotos del ADN, que los protege y evita la resección (Kieffer & Lowndes, 2022).

Otros factores importantes para la elección de la ruta de reparación son 53BP1 y BRCA1, que exhiben papeles antagónicos en la reparación de las DSBs. 53BP1 se asocia con RIF1 y el complejo Shieldin en las DSBs en la fase G₁ para proteger los extremos del ADN roto, promoviendo así la NHEJ, mientras que BRCA1 promueve la resección de los extremos rotos a través de su interacción con CtIP en las fases S/G₂, estimulando la HR. Además, aparte de las diferentes fosforilaciones, otros tipos de modificaciones post-traduccionales como la metilación, la acetilación o la ubicuitilación, entre otras, tanto en las histonas como en los propios factores que intervienen en la NHEJ/HR, también influyen en la determinación de la ruta de reparación del daño (Ray & Raghavan, 2021; Cejka & Symington, 2021).

2.3. El complejo MRN

Como hemos mencionado anteriormente, el complejo formado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1, denominado complejo MRN, tiene un papel esencial en la respuesta a los daños en el ADN. Está entre los primeros sensores de las DSBs, interviniendo tanto en el reconocimiento de la lesión, como en la señalización, el procesamiento y la reparación de la misma (Oh & Symington, 2018; Rupnik *et al*, 2010; Williams *et al*, 2010). Para llevar a cabo esta variedad de funciones, el complejo presenta distintas actividades desde un punto de vista bioquímico, entre las que destacan: la hidrólisis de ATP, la capacidad para interactuar con moléculas de ADN y de ejercer como puente entre ellas, las actividades endonucleasa y exonucleasa y la interacción con otras proteínas efectoras (Bian *et al*, 2019).

- **Estructura de los componentes del complejo MRN**

El complejo MRN es un complejo heterohexamérico compuesto por dos subunidades de la proteína MRE11, dos de RAD50 y dos de NBS1. El núcleo catalítico del complejo está formado por las dos subunidades de MRE11 y por los dominios ATPasa de RAD50, constituyendo en conjunto la zona de unión y procesamiento del ADN (Bian *et al*, 2019). MRE11 y RAD50 están ampliamente conservados filogenéticamente, mientras que NBS1 sólo se encuentra en eucariotas, actuando

como proteína de andamiaje fundamental para la interacción con otras proteínas (Rahman *et al*, 2020).

MRE11 es una proteína que pertenece a la superfamilia de las metalofosfoesterasas similares a la calcineurina (Matange *et al*, 2015). Posee un dominio fosfodiesterasa N-terminal (**Figura 9A**) con actividad exonucleasa 3'-5' dependiente de Mn^{2+} capaz de procesar moléculas bicatenarias de ADN, y actividad endonucleasa capaz de procesar ADN de cadena sencilla, siendo ambas funciones claves para la resección de los extremos rotos del ADN (Buis *et al*, 2008). Este dominio coordina los dos iones Mn^{2+} requeridos para la actividad catalítica de la proteína a través de 7 residuos conservados. Además, facilita la dimerización de las dos subunidades de MRE11 del complejo e incluye los sitios de unión a NBS1, por lo que no sólo es responsable de la actividad nucleasa de la proteína, sino que también contribuye al ensamblaje y estabilización del propio complejo (Hopfner *et al*, 2001; Schiller *et al*, 2012). Cerca de esta región se localiza un dominio *cap* que puede provocar el desenrollamiento de la doble hélice del ADN con el fin de orientarla correctamente para la resección (Williams *et al*, 2008). Por su parte, la región C-terminal posee un dominio de unión a RAD50 y dos dominios de unión al ADN (Lafrance-Vanasse *et al*, 2015). Por tanto, MRE11 interacciona con NBS1 y RAD50, mientras que estos no interactúan directamente entre sí para constituir el complejo. Asimismo, esta región C-terminal está sujeta a modificaciones post-traduccionales, como la metilación de los residuos de arginina presentes en ciertas secuencias ricas en glicina/arginina, que se ha demostrado importante para la actividad exonucleasa de la proteína y la activación de la quinasa ATR (Déry *et al*, 2008; Yu *et al*, 2012). Por tanto, MRE11 es un componente esencial tanto para la formación del complejo MRN como para la unión al ADN y la actividad enzimática del propio complejo (Lamarche *et al*, 2010).

RAD50 es un miembro de la superfamilia de proteínas ATPasas de tipo ABC (del inglés *ATP-binding cassette*). Por su conformación, pertenece también a la familia de proteínas para el mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC, por sus siglas en inglés) (Hopfner & Tainer, 2003; Tatebe *et al*, 2020). Se trata del componente de mayor tamaño del complejo MRN, con 1312 aminoácidos frente a los 708 de MRE11 y los 754 de NBS1. En los extremos N-terminal y C-terminal de RAD50 se encuentran los subdominios con actividad ATPasa (**Figura 9B**), que cuando se pliegan generan el dominio completo (Hopfner *et al*, 2000). Además, estas regiones contienen los motivos *Walker A* y *Walker B*, que son fundamentales para la unión a nucleótidos (Rojowska *et al*, 2014). Entre ambos subdominios de la proteína se extiende una región amplia de hélices superenrolladas antiparalelas que posee un motivo central CXXC que coordina Zn^{2+} (gancho de zinc o *zinc-hook*). Esta estructura media la dimerización, dependiente de Zn^{2+} , de las subunidades de RAD50 y permite la formación de puentes flexibles a diferentes distancias, lo que resulta esencial para mantener juntos los extremos rotos

del ADN en el proceso de reparación (Hopfner *et al*, 2002; Park *et al*, 2017). La conformación de RAD50 en el complejo depende de la unión a moléculas de ATP, como veremos a continuación. La interacción entre RAD50 y MRE11 ocurre a través de los dominios de unión específicos situados a ambos lados de la región de hélices superenrolladas. El complejo funcional formado por los dímeros de estas dos proteínas (llamado MR o M₂R₂) se ha conservado en los 3 dominios de la vida, lo que refleja el papel crítico que ambos componentes desempeñan en la célula (Möckel *et al*, 2012; Lim *et al*, 2011).

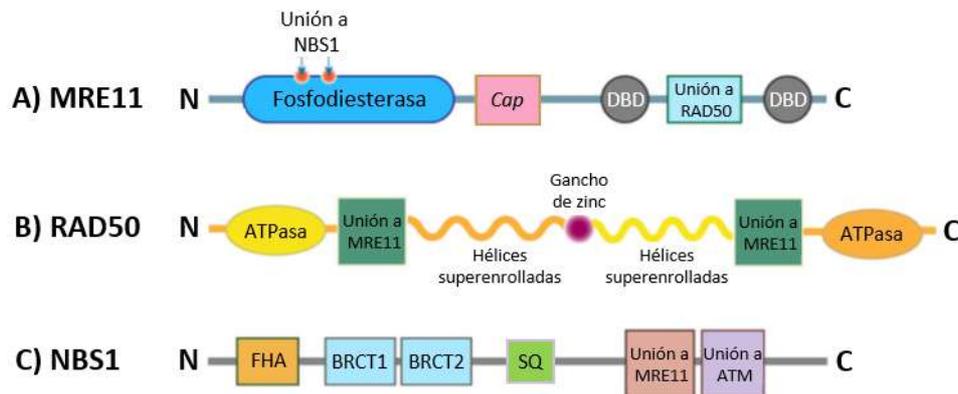


Figura 9. Representación esquemática de los dominios principales de MRE11, RAD50 y NBS1. DBD: DNA-binding domain. FHA: fork-head associated domain, BRCT: breast cancer-associated 1 C-terminal domain. Figura modificada a partir de Bian *et al*, 2019.

Como ya hemos indicado, la proteína NBS1 o nibrina, codificada en humanos por el gen *NBN*, es la subunidad del complejo MRN específica de los eucariotas. En su extremo N-terminal posee un dominio FHA y dos dominios BRCT en tándem (**Figura 9C**), que son importantes para la interacción con múltiples proteínas fosforiladas (Lafrance-Vanasse *et al*, 2015). Estos dominios están ampliamente conservados entre proteínas nucleares eucariotas implicadas en procesos como los puntos de control del ciclo celular y la reparación del ADN. A través de ellos, NBS1 es capaz de interactuar con proteínas básicas en la señalización, reparación y respuesta a daños en el ADN como γ -H2AX, MDC1 o CtIP (Saito *et al*, 2013). Aunque el resto de su estructura está menos definida, se sabe que el extremo C-terminal posee otras regiones críticas para la interacción con MRE11, ATM, RNF20 o RAD18 (Schiller *et al*, 2012; Saito *et al*, 2013; Lee & Paull, 2004). Además de estas regiones, NBS1 presenta motivos Ser-Gln (SQ) en su zona central, que son secuencias consenso de fosforilación por ATM o ATR. Los residuos de esta región están altamente conservados en vertebrados y tienen un papel importante en la transducción de señales que ocurre durante la respuesta a daños en el ADN (Saito *et al*, 2013; Qiu & Huang, 2021).

- **Principales funciones del complejo MRN**

El complejo MRN interviene en diferentes eventos celulares, de entre los que destaca la respuesta a las DSBs. En este ámbito, el papel del complejo ha sido ampliamente estudiado, interviniendo tanto en la detección de las DSBs como en la señalización, el procesamiento y la reparación de las mismas. Cuando se produce el daño en el ADN, el complejo MRN reconoce y se une rápidamente a las DSBs. Así, es reclutado en los sitios dañados a través de γ -H2AX y RAD17, los cuales interactúan con NBS1 (Kinner *et al*, 2008; Wang *et al*, 2014a). Una vez unido, el complejo MRN recluta a su vez a otras proteínas implicadas en la respuesta a los daños en el ADN, incluyendo la quinasa ATM, que también interactúa con NBS1. Tras su activación por autofosforilación, ATM fosforila otras proteínas diana para iniciar nuevas rutas de señalización. Entre sus sustratos se encuentran los componentes del propio complejo MRN y MDC1, que a su vez reclutará más moléculas de MRN en las DSBs, amplificando así la señalización en un bucle de retroalimentación positiva esencial para la reparación del daño (Syed & Tainer, 2018; Qiu & Huang, 2021).

En los puntos de rotura, el complejo MRN desempeña otro papel fundamental ya que mantiene próximos los extremos rotos y actúa como puente entre distintas moléculas de ADN. Estas funciones se llevan a cabo gracias a la estructura de RAD50, concretamente, a las regiones de hélices superenrolladas antiparalelas que culminan en el gancho de zinc (Hopfner *et al*, 2002; Lafrance-Vanasse *et al*, 2015). Estas regiones permiten la interacción entre diferentes subunidades de RAD50, propiciando la formación de puentes entre la molécula de ADN rota y su correspondiente en la cromátida hermana. De esta manera, contribuye a la posterior creación de las estructuras *D-loop*, comunes en el proceso de HR. Asimismo, también podría facilitar el alineamiento y aproximación de los extremos de ADN rotos que vayan a ser reparados por NHEJ (Bian *et al*, 2019).

La localización del complejo MRN en las DSBs es uno de los eventos que dirige la reparación de la rotura por HR. Como describimos anteriormente, para que este fenómeno tenga lugar es necesario que a ambos lados del punto de rotura se generen regiones amplias de cadena sencilla con salientes 3'-hidroxilo. Debe ocurrir, por tanto, una degradación de los extremos 5' a ambos lados de la rotura, dependiente de MRE11. Según el modelo generalmente aceptado (**Figura 10**), el complejo MRN inicia la resección mediante la actividad endonucleasa de MRE11, que genera un corte en el interior de las hebras a degradar a ambos lados de la DSB. A continuación, partiendo de ese corte, MRE11 en colaboración con CtIP digiere las hebras gracias a su actividad exonucleasa en dirección 3'-5' hacia la DSB (Liu & Huang, 2016). Tras esta resección inicial, que genera un primer fragmento corto de ADN monocatenario, se incorporan otras enzimas con actividad nucleasa como EXO1 o DNA2 quienes, junto a BLM y otros factores, ampliarán la resección en sentido 5'-3' hacia el interior de las hebras de ADN. Así, las hebras de cadena sencilla generadas con salientes extensos 3'-hidroxilo

continuarán la reparación vía HR (Cejka & Symington, 2021). En este proceso de resección amplia se ha propuesto otra función para el complejo MRN independiente de su actividad catalítica. Se ha visto que la nucleasa EXO1 es inhibida de manera potente por la unión de RPA a las regiones de ADN monocatenarias que se van generando durante la digestión (Myler *et al*, 2016; Genschel & Modrich, 2003). Se cree que el complejo MRN podría interactuar con EXO1 y desplazarse junto con la maquinaria de resección para evitar la inhibición inducida por RPA (Myler *et al*, 2017).

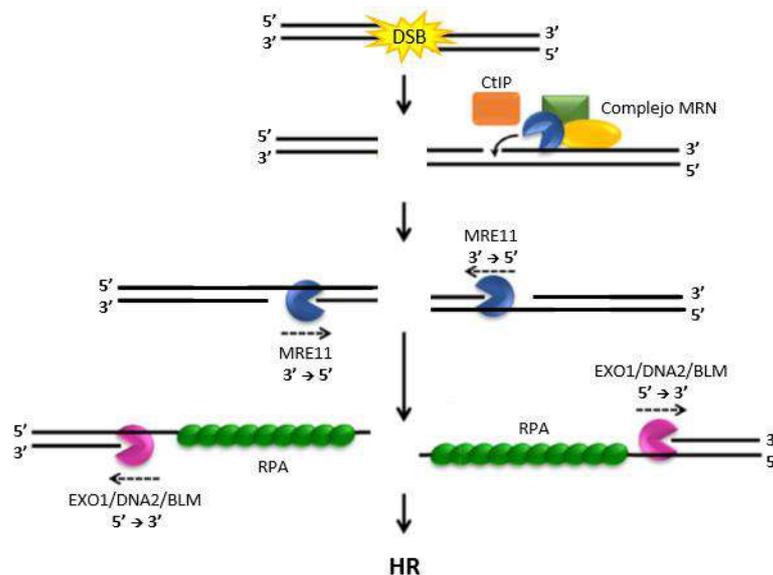


Figura 10. Procesamiento de los extremos de una DSB durante la HR. El complejo MRN, junto a CtIP, inicia la resección por medio de un corte interior en las hebras a degradar, que son procesadas primero en sentido 3'-5' (se muestra sólo a MRE11 para simplificar). A continuación, otros factores extienden la resección en dirección 5'-3', generando amplios salientes 3'-hidroxilo que son cubiertos por la proteína RPA y continúan la reparación por HR. Figura modificada a partir de Shibata *et al*, 2018.

Sin embargo, este modelo no explica por qué los extremos 3' generados en la DSB no son también degradados por la actividad exonucleasa de MRE11. Un estudio reciente (Cannavo *et al*, 2019) pone el foco sobre la regulación que RAD50 ejerce sobre la actividad nucleasa de MRE11, a través de su función ATPasa. El complejo MRN no es un complejo estructuralmente estático, sino que experimenta cambios conformacionales cuando el dominio ATPasa de RAD50 une ATP (**Figura 11**). Cuando esto ocurre, las hélices superenrolladas antiparalelas de las dos subunidades de RAD50 se pliegan entre ellas y forman una estructura compacta y rígida. Esta conformación "cerrada" permite acomodar la doble hélice del ADN, pero bloquea el acceso de la misma a los sitios activos del dímero de MRE11. Cuando se produce la hidrólisis del ATP, la estructura rígida desaparece y las subunidades de RAD50 recuperan un estado más flexible y relajado. En esta conformación "abierta", los sitios activos de MRE11 quedan libres para albergar las hebras de ADN y poder ejercer su actividad nucleasa

(Liu *et al*, 2016a). Por tanto, el ciclado entre ambas conformaciones del complejo MRN es clave en la regulación de la actividad nucleasa de MRE11.

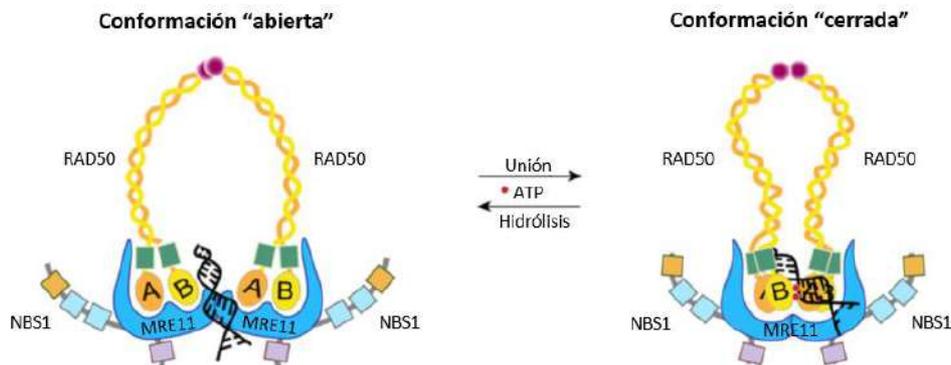


Figura 11. Cambio de conformación del complejo MRN dependiente de ATP. Cuando los dominios ATPasa de las moléculas de RAD50 no unen ATP, el complejo presenta una conformación “abierta” que permite el acceso del ADN a los sitios activos de MRE11 y, por tanto, su procesamiento. La unión del ATP hace que el complejo adopte una conformación “cerrada” que impide al ADN acceder a los sitios activos de MRE11. La hidrólisis del ATP permite el paso de la conformación “cerrada” a la “abierta”, regulando así la actividad del complejo. Figura modificada a partir de Bian *et al*, 2019.

El complejo MRN también actúa en la reparación de los extremos de ADN que presentan aductos de proteínas (Deshpande *et al*, 2016). Es capaz de procesar y separar complejos proteicos unidos covalentemente al ADN genómico, como ocurre con las topoisomerasas (Aparicio *et al*, 2016). Asimismo, el complejo también parece intervenir en la reparación de las DSBs que presentan estructuras de horquilla en sus extremos (Li *et al*, 2017; Runge & Li, 2018).

En lo que se refiere a la NHEJ, el papel del complejo MRN está menos definido. Principalmente, participa a través de la actividad nucleasa de MRE11 en los pasos de resección iniciales que tienen lugar en las formas alternativas de NHEJ dependientes de resección y búsqueda de regiones de microhomología para la reparación. En estas rutas, además de MRE11, también intervienen otros componentes de las vías de HR y NHEJ clásicas como CtIP, BRCA1, EXO1 o Artemis, entre otros (Sharma *et al*, 2015; Dutta *et al*, 2017; Biehs *et al*, 2017; Rass *et al*, 2009).

Por otro lado, el complejo MRN también participa en el procesamiento de las horquillas de replicación fallidas. El estrés replicativo puede provocar una ralentización, atasco o colapso de la horquilla de replicación. Estas situaciones derivan de fenómenos como el daño en el ADN, la formación de estructuras anormales en el ADN, la aparición de aductos proteína-ADN o los híbridos ADN-ARN (Zeman & Cimprich, 2014). Cuando tiene lugar la parada o el colapso de la horquilla, el complejo MRN se une a estas zonas y promueve la activación de ATR, quinasa fundamental en la respuesta a estrés replicativo, y el reinicio de la replicación (Oakley *et al*, 2009; Gatei *et al*, 2014). Para ello, la actividad nucleasa del complejo produce la resección de las

hebras de ADN nacientes permitiendo la liberación del replisoma de la zona colapsada (Aze *et al*, 2013). Sin embargo, la resección debe estar bien regulada para evitar una degradación excesiva de la horquilla debida a la actividad exonucleasa de MRE11 (Hashimoto *et al*, 2010; Vallerga *et al*, 2015). Así, otras proteínas colaboran en la regulación de esta resección, por ejemplo BRCA2, que frena la digestión de las hebras de cadena sencilla nacientes promoviendo en ellas la formación de nucleofilamentos de RAD51 (Kolinjivadi *et al*, 2017; Schlacher *et al*, 2011).

También se ha descrito la implicación del complejo MRN en los telómeros. Estas estructuras constan de secuencias de ADN repetitivas y no codificantes que protegen los extremos de los cromosomas eucariotas ante la posible pérdida de la información genética contenida en las regiones próximas a ellos. Debido a las limitaciones de las polimerasas de ADN que intervienen en el proceso de replicación, los telómeros van acortando su longitud en cada ciclo de replicación y división celular hasta alcanzar una longitud crítica, momento en el que la célula entra en senescencia o en apoptosis (Lamarche *et al*, 2010). Los telómeros están protegidos por un conjunto de proteínas que forman el complejo *shelterin*, las cuales generan una envoltura nucleoproteica que estabiliza los extremos de los cromosomas. En este contexto, el complejo MRN colabora con el complejo *shelterin* para evitar que los extremos del cromosoma sean tratados como DSBs y por tanto “reparados”, lo que favorece la estabilidad genómica (Marcand, 2014; Marcomini & Gasser, 2015). Cuando los telómeros se vuelven disfuncionales, por ejemplo, debido a la disrupción de algún componente del complejo *shelterin*, son reconocidos como DSBs, provocando la activación de la señalización de respuesta a daños en el ADN. Así, pueden tener lugar fusiones cromosómicas producto de la “reparación” de los telómeros por NHEJ (Celli & de Lange, 2005). En este caso, el complejo MRN intervendría en la detección y señalización vía ATM de estos telómeros disfuncionales. Además, dependiendo de la etapa del ciclo celular y la estructura específica que presenten los telómeros, MRN podría promover o suprimir la fusión mediada por NHEJ (Lamarche *et al*, 2010), favoreciendo o no la inestabilidad genómica, respectivamente.

El complejo MRN interviene asimismo en la detección, señalización y defensa contra las infecciones virales (Stracker *et al*, 2002). Este complejo, junto a otras proteínas, detecta la presencia de ADN viral e inicia una cascada de señalización vinculada al daño en el ADN y a la respuesta inmune innata (Lilley *et al*, 2007). Como sabemos, cuando se produce un daño en el ADN celular, la activación de ATM por MRN se amplifica a una región de más de una megabase, lo que conlleva la formación de los focos de daño en el ADN, la parada del ciclo celular y la reparación del daño (Polo & Jackson, 2011). Sin embargo, cuando tiene lugar una infección viral, la unión de MRN al ADN del virus activa una respuesta local mediada por ATM, debido al pequeño tamaño del ADN vírico. Esta señalización local evita la parada del ciclo celular y la inducción de una respuesta a daños en el ADN global cuando se da la infección, lo que permite a la

célula distinguir entre la señalización derivada del daño en su genoma de la derivada de un ADN exógeno. En este caso, el resultado será la inhibición de la replicación del ADN vírico (Shah & O'Shea, 2015).

El reconocimiento y unión del complejo MRN al ADN del virus ocurre en el citoplasma e induce la producción de interferón de tipo I a través de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), que a su vez estimula diferentes proteínas implicadas en la producción de ese mediador de la respuesta inmune (Kondo *et al*, 2013). Sin embargo, ciertas proteínas codificadas por el genoma vírico pueden asociarse a MRN (y a otras proteínas implicadas en la reparación de daños en el ADN de la célula hospedadora) e inactivarlo a través de su relocalización y degradación por medio de modificaciones post-traduccionales como la SUMOilación y la ubiquitilación (Stracker *et al*, 2002; Sohn & Hearing, 2012; Liu *et al*, 2005).

- **Patologías asociadas a defectos en el complejo MRN**

Las mutaciones en genes esenciales para la respuesta a los daños en el ADN que afectan al nivel de las proteínas o a su funcionalidad se han relacionado de manera clara con el cáncer y otras enfermedades (Romero-Laorden & Castro, 2017; Chae *et al*, 2016; Knijnenburg *et al*, 2018; Vineis *et al*, 2009). En este sentido, diversas mutaciones en los genes de los componentes del complejo MRN también se han vinculado con múltiples escenarios patológicos. De hecho, la disrupción de estos genes provoca letalidad embrionaria en ratones (Xiao & Weaver, 1997; Luo *et al*, 1999; Zhu *et al*, 2001), lo que demuestra el papel fundamental que este complejo desempeña en la supervivencia celular. En humanos, las mutaciones hipomórficas en cualquiera de los genes que codifican las proteínas del complejo pueden causar patologías asociadas con la inestabilidad genómica (van den Bosch *et al*, 2003).

Tal vez el fenotipo patológico más clásico asociado a un defecto en MRN es el síndrome de rotura de Nijmegen (NBS, del inglés *Nijmegen break syndrome*), una enfermedad rara autosómica recesiva causada por mutaciones hipomórficas del gen *NBN*, que codifica la proteína NBS1. Entre sus características clínicas destacan microcefalia, inmunodeficiencia, retraso mental y de crecimiento, radiosensibilidad y una mayor predisposición a padecer infecciones y cáncer, particularmente el linfoma no Hodgkin de células B (Chrzanowska *et al*, 2012; Digweed & Sperling, 2004). La mutación más comúnmente observada en los pacientes de NBS es la 657del5, una deleción de 5 nucleótidos en el exón 6 de *NBN*, que genera dos formas truncadas de la proteína original: un fragmento N-terminal de aproximadamente 26 kDa (p26) y otro C-terminal de 70 kDa (p70) (Maser *et al*, 2001). El fragmento p26 abarca desde el aminoácido 1 al 218 de NBS1, lo que incluye el dominio FHA y el primer dominio BRCT, mientras que el fragmento p70 comprende del aminoácido 221 al final de la secuencia. Este incluye, por tanto, el segundo dominio BRCT y otras regiones que permiten la

interacción con proteínas clave como MRE11 o ATM, además de sitios de fosforilación importantes en la respuesta a los daños en el ADN. En consecuencia, p70 mantiene algunas de las funciones de la proteína. Es capaz de interactuar con MRE11, lo que resulta esencial, pero la escisión de las regiones BRCT en tándem probablemente dificulta la interacción con otras proteínas fosforiladas (Kim *et al*, 2017; Wu *et al*, 2000; Becker *et al*, 2006).

También se han descrito otras mutaciones que generan formas truncadas de NBS1 en distintos tipos de tumores (Ebi *et al*, 2007; Varon *et al*, 1998; Watanabe *et al*, 2009a; Huang *et al*, 2008). Estas formas incompletas de la proteína carecen de distintas longitudes del extremo C-terminal, por lo que los sitios de interacción para MRE11 o ATM suelen estar ausentes en los mutantes. Asimismo, se han documentado multitud de otros tipos de mutaciones, sobre todo puntuales, encontradas en diversos tipos de cáncer, destacando en meduloblastomas, glioblastomas y carcinoma hepatocelular. Suelen afectar a la interacción con proteínas fosforiladas, dificultando así la respuesta a los daños en el ADN y la reparación (Rahman *et al*, 2020).

Respecto a RAD50, se ha documentado una mutación hipomórfica en su gen que provoca un trastorno similar al síndrome de rotura de Nijmegen (NBSLD, del inglés *Nijmegen break syndrome-like disorder*), de características equivalentes a las del propio NBS (Waltes *et al*, 2009). Asimismo, se han observado ciertas mutaciones, como deleciones, mutaciones puntuales o formas truncadas de la proteína, entre otras, en distintos tipos de cáncer, como en el endometrial, de vejiga, de ovario o de mama. Estas mutaciones suelen afectar a la actividad ATPasa de RAD50, así como a la estructura y demás funciones del propio complejo MRN (Rahman *et al*, 2020). También, se ha mostrado en modelos de ratón la importancia del dominio de gancho de zinc. Cuando se presentan en homocigosis mutaciones que inactivan dicho dominio, el fenotipo resulta letal, mientras que en heterocigosis propician la aparición de tumores hepáticos, entre otros efectos (Roset *et al*, 2014).

Por último, en el caso de MRE11, las mutaciones que afectan a su actividad nucleasa, a su estructura, a la interacción con los demás componentes del complejo o a los niveles de la proteína, entre otras, se han relacionado con fenotipos patológicos. Ciertas mutaciones hipomórficas en el gen *MRE11* humano conducen al trastorno similar a la ataxia-telangiectasia (ATLD, del inglés *ataxia-telangiectasia-like disorder*), una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por alteraciones del desarrollo, inmunodeficiencia y neurodegeneración, además de una mayor sensibilidad a la radiación ionizante. Estas características son similares a las que provoca la deficiencia de ATM, responsable de la aparición de ataxia-telangiectasia propiamente dicha (Rahman *et al*, 2020; Taylor *et al*, 2004; Stewart *et al*, 1999). También se han descrito mutaciones esporádicas de MRE11 en diferentes tipos de cáncer, como en el colorrectal, de mama y de ovario. Estas mutaciones incluyen, entre otras, variantes de *splicing* inestables que conllevan menores niveles de la proteína,

deleciones, cambios puntuales en la secuencia aminoacídica o formas truncadas (Rahman *et al*, 2020).

Dado el papel indispensable del complejo MRN en la respuesta a los daños en el ADN, en su reparación y en el mantenimiento de la estabilidad genómica, las proteínas de este complejo se podrían calificar como supresoras tumorales. En células normales, este complejo evita la acumulación de daños en el ADN que traerían consigo fenómenos de inestabilidad genómica, los cuales pueden derivar, como acabamos de describir, en diferentes patologías, entre ellas, el cáncer. Sin embargo, en células tumorales, la actividad eficiente del complejo también podría contribuir a la supervivencia celular y a los fenómenos de resistencia a diferentes tratamientos (Bian *et al*, 2019). Estos hechos ponen de manifiesto la importancia de MRN en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, sea este normal, lo cual es positivo, o tumoral, constituyendo entonces un obstáculo para el éxito del tratamiento.

3. La ubiquitilación de proteínas

La ubiquitilación, definida como el proceso por el cual una molécula de ubiquitina se une covalentemente a una proteína diana, es una modificación post-traducciona fundamental en la regulación y el mantenimiento de la homeostasis celular. Las proteínas ubiquitiladas pueden seguir diferentes caminos: pueden ser degradadas por el proteasoma o por la vía de la autofagia/lisosoma, pueden alterar su localización subcelular, pueden modificar su actividad o regular sus interacciones con otras proteínas (Popovic *et al*, 2014; Chen & Sun, 2009). De entre todos ellos, la eliminación de proteínas ubiquitiladas es probablemente el fenómeno más estudiado. La degradación proteica permite la destrucción de proteínas dañadas o mal plegadas, reciclándose los aminoácidos que las componen en la síntesis de otras nuevas. También regula los niveles de determinados sustratos, lo que es clave para el desarrollo de múltiples procesos como el ciclo y la división celular, el crecimiento o la diferenciación (Pickart, 2004; Popovic *et al*, 2014).

Las importantes funciones que cumple la degradación de proteínas hacen que su desregulación pueda contribuir de manera sustancial a la transformación tumoral. La estabilización inadecuada de determinadas oncoproteínas o la degradación excesiva de proteínas supresoras de tumores, debido a disfunciones en la maquinaria de degradación o en los sustratos, entre otros elementos, puede afectar notablemente al normal funcionamiento de la célula. Por ello, el estudio de los mecanismos de ubiquitilación y de degradación proteica suscitan un gran interés dado su posible papel en el tratamiento del cáncer y otras patologías.

3.1. Diversidad de la ubiquitilación

El elemento básico del proceso de ubiquitilación es la molécula de ubiquitina, una proteína de pequeño tamaño (76 aminoácidos, lo que le otorga un peso de alrededor de 8,6 kDa) evolutivamente muy conservada entre los eucariotas. También existen proteínas similares a la ubiquitina (UBLs), como por ejemplo SUMO, NEDD8 o ISG15 que, al igual que la propia ubiquitina, intervienen en diversos procesos biológicos tales como la autofagia, la reparación de los daños en el ADN, la apoptosis o la regulación del ciclo celular, entre otros (Schwartz & Hochstrasser, 2003).

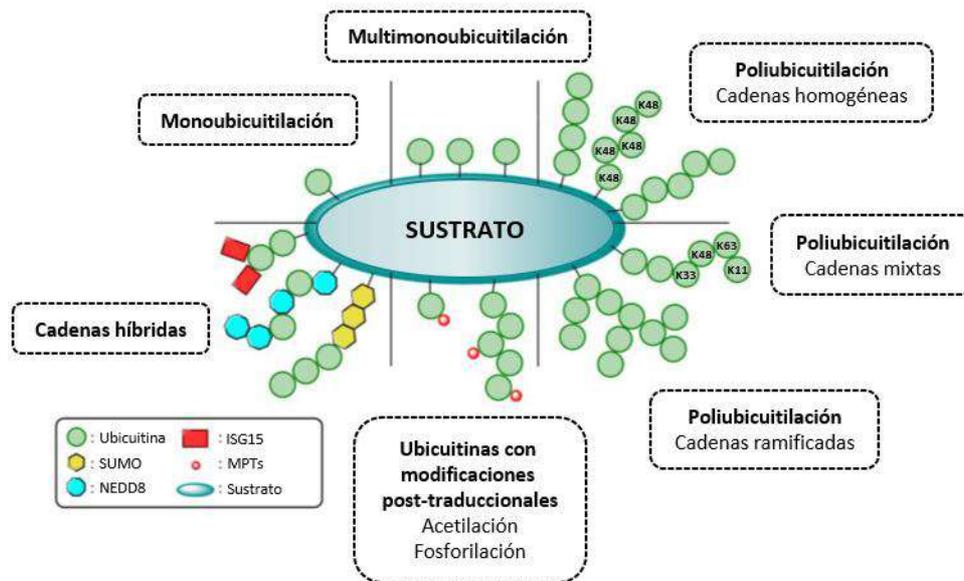


Figura 12. Diferentes formas de ubiquitilación de una proteína sustrato. MPTs: modificaciones post-traduccionales. Figura modificada a partir de Pérez Berrocal *et al*, 2020.

Las moléculas de ubiquitina pueden unirse a las proteínas diana de maneras muy diversas (**Figura 12**), generando estructuras variadas con diferentes implicaciones biológicas. La forma más básica de ubiquitilación consiste en la unión de una única molécula de ubiquitina a la proteína sustrato, lo que se denomina monoubicuitilación. Este fenómeno puede tener lugar en un único residuo de la proteína o en varios residuos a la vez, en cuyo caso hablaríamos de multimonoubicuitilación. Por otro lado, las ubiquitinas pueden unirse a la proteína sustrato formando cadenas de longitud variable, lo que se conoce como poliubiquitilación. Dichas moléculas de ubiquitina pueden enlazarse entre sí a través de diferentes residuos: la metionina inicial (M1) y un total de 7 residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63). Cuando las ubiquitinas se unen a través del mismo aminoácido generan cadenas homogéneas, mientras que cuando se unen a través de residuos diferentes producen cadenas mixtas. También puede ocurrir que en una cadena de poliubiquitinas aparezcan ramificaciones, cuando a la misma ubiquitina se le une más de una molécula adicional a través de diferentes residuos. Además, las cadenas generadas pueden adoptar distintas conformaciones: cuando las ubiquitinas interaccionan entre ellas únicamente a través del residuo por el que se unen, presentan una conformación “abierta”, mientras que si la interacción ocurre por medio de más motivos diferentes presentan una conformación “compacta” (Komander & Rape, 2012).

El camino que va a seguir la proteína ubiquitilada dependerá, fundamentalmente, de la longitud de la cadena de ubiquitinas formada y del residuo aminoacídico a través del cual se hayan producido los enlaces entre las ubiquitinas. Así por ejemplo, la mono y multimonoubicuitilación suele estar relacionada con la regulación de la localización de ciertas proteínas y con procesos celulares esenciales como la reparación de daños

en el ADN, la transcripción, la apoptosis o la endocitosis (Nakagawa & Nakayama, 2015; Popovic *et al*, 2014). Respecto a las cadenas de ubiquitinas, las que presentan enlaces a través de la lisina 48 (K48) y la lisina 63 (K63) son las mejor caracterizadas. Las ubiquitinas unidas a través de K48 suelen estar relacionadas con la degradación de proteínas, en general por la vía del proteasoma. Sin embargo, también han sido descritas en la regulación de la actividad de enzimas específicas (Li & Ye, 2008; Flick *et al*, 2006; Kuras *et al*, 2002). Por el contrario, las ubiquitinas unidas a través de K63 suelen cumplir funciones de señalización, afectando a la localización de proteínas específicas, participando en las rutas de reparación de daños en el ADN, o interviniendo en fenómenos de tráfico intracelular, entre otros (Pickart & Fushman, 2004; Haglund & Dikic, 2005). No obstante, también pueden intervenir en la degradación de proteínas, tanto por la vía del proteasoma como por la vía autofágica (Grumati & Dikic, 2018; Ohtake *et al*, 2018).

Las cadenas de ubiquitinas que presentan enlaces por los otros residuos citados anteriormente tienen papeles menos definidos. Las uniones a través de K6 se han vinculado a procesos de reparación del ADN (Morris & Solomon, 2004); las uniones a través de K11 parecen estar relacionadas con el ciclo celular, concretamente con la degradación de ciertos sustratos vía proteasoma, facilitando así la salida de la mitosis (Matsumoto *et al*, 2010); y los enlaces a través de K27 se han observado en condiciones de daño mitocondrial, colaborando en la autofagia selectiva de la mitocondria (Geisler *et al*, 2010). Respecto al rol de las cadenas de ubiquitinas enlazadas a través de K29 y K33, se han descrito funciones relacionadas con la degradación de proteínas y con diferentes fenómenos de señalización celular, pero se requieren estudios más profundos para definirlos con claridad, al igual que ocurre con las uniones a través de la metionina 1 (Kulathu & Komander, 2012).

Además de unirse por diferentes residuos y generar cadenas de longitud variable, las moléculas de ubiquitina también pueden presentar a su vez distintas modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, las ubiquitinas pueden ser acetiladas o fosforiladas en diferentes residuos. La acetilación en las lisinas 6 o 48 puede inhibir la elongación de las cadenas sin afectar a la monoubicuitilación de la proteína sustrato (Ohtake *et al*, 2015). Incluso, pueden incorporarse a las cadenas de proteínas similares a la ubiquitina, generando así cadenas híbridas que amplían aún más el espectro de posibilidades que presenta la ubiquitilación (Pérez Berrocal *et al*, 2020).

3.2. Maquinaria implicada y mecanismo de acción

En general, el objetivo del proceso de ubiquitilación es la unión de una molécula de ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína sustrato a través de un enlace isopeptídico. Para ello, se requiere la intervención de 3 enzimas que actúan de manera

secuencial (**Figura 13**): la E1 o enzima activadora, la E2 o enzima de conjugación y la E3 o enzima ligasa de ubiquitina (Hershko *et al*, 1983).

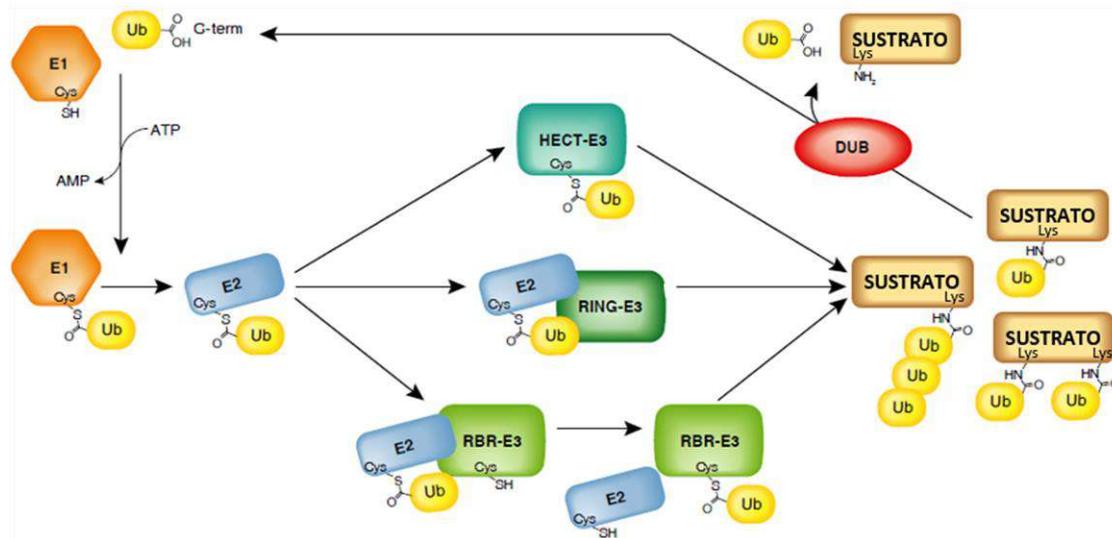


Figura 13. Maquinaria enzimática implicada en la reacción de ubiquitilación. Figura modificada a partir de Smit & Sixma, 2014.

En primer lugar, la molécula de ubiquitina debe activarse en un proceso dependiente de energía en el que intervienen la enzima E1 y ATP. La unión del ATP a la enzima E1 mejoraría el acceso de la ubiquitina al sitio de unión en la enzima, al provocar en esta un cambio conformacional (Pickart, 2001). La ubiquitina genera una forma intermedia ubiquitina-AMP para, después, unirse por medio del grupo carboxilo de su glicina 76 al grupo tiol de un residuo de cisteína de la E1 mediante un enlace tioéster. Así, cuando la E1 está plenamente cargada es capaz de portar dos moléculas de ubiquitina a la vez: una en la forma intermedia ubiquitina-AMP y otra formando el enlace tioéster. Esta capacidad es muy importante para el proceso de ubiquitilación, ya que, por lo general, la cantidad de E1 suele ser menor que la de la siguiente enzima de la ruta, por lo que la primera debe actuar eficientemente para no limitar el proceso (Fang & Weissman, 2004).

En segundo lugar, la molécula de ubiquitina es transferida a una enzima E2, la cual posee un dominio para la unión de la E1 y un dominio para conjugar ubiquitina. En concreto, la ubiquitina se une de manera transitoria a un residuo de cisteína del sitio activo de la E2 (Ye & Rape, 2009; Pickart, 2001).

Por último, la enzima E3 se encarga de transferir la ubiquitina cargada en la enzima E2 a la proteína sustrato, actuando de ligasa de ubiquitina. Las E3 son, por tanto, clave en el proceso de ubiquitilación ya que reconocen el sustrato de la reacción, otorgando así la especificidad. Se pueden clasificar en 3 grupos: las E3 de tipo HECT, las de tipo RING (o *RING-finger*) y las de tipo RBR. Las E3 de tipo HECT poseen en su estructura

una región por la que pueden interaccionar con la enzima E2 y otra región con un residuo de cisteína capaz de formar enlace con la molécula de ubiquitina. Así, la principal característica que distingue a este tipo de enzimas E3 es que son capaces de unir la ubiquitina portada por la E2 como paso previo a su adición al sustrato (Sluimer & Distel, 2018). Por su parte, las E3 de tipo RING no llegan a interaccionar con la ubiquitina, sino que la transfieren directamente desde la enzima E2 al sustrato, actuando de puente gracias a su dominio catalítico, denominado dominio RING o U-box (Deshaies & Joazeiro, 2009; Metzger *et al*, 2012). Presentan una gran versatilidad, ya que pueden utilizar una misma enzima E2 durante el proceso de elongación de la cadena de ubiquitinas, o utilizar una E2 para la ubiquitilación inicial y otra diferente para añadir las posteriores ubiquitinas y elongar la cadena (Komander & Rape, 2012; Zheng & Shabek, 2017). Las ligasas de ubiquitina de tipo RING constituyen una extensa familia de proteínas que se puede subdividir en dos categorías: las ligasas de tipo CBL, en las que el dominio catalítico y el que reconoce a los sustratos están integrados en la misma subunidad, y las ligasas de tipo culina-RING (o CRLs), en las que ambos dominios se localizan en subunidades independientes (Joazeiro *et al*, 1999; Petroski & Deshaies, 2005). Finalmente, las E3 de tipo RBR tienen un mecanismo de acción intermedio entre las HECT y las RING. Presentan en su estructura dos dominios RING, uno de los cuales (RING1) facilita la asociación de la E2, mientras que el otro (RING2) permite la unión de la ubiquitina a un residuo de cisteína de la propia E3 como paso previo a la transferencia al sustrato (Smit & Sixma, 2014).

Para revertir el proceso de ubiquitilación también existen enzimas denominadas desubiquitilasas (DUBs), que son peptidasas capaces de escindir las moléculas de ubiquitina a partir de las cadenas generadas o de las propias proteínas sustrato. Estas enzimas están ganando cada vez más relevancia como potenciales dianas terapéuticas, dado que su desregulación se ha relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y procesos inflamatorios (Harrigan *et al*, 2018).

3.3. El complejo ligasa de ubiquitina SCF

Entre las ligasas de ubiquitina E3 de tipo culina-RING destaca el complejo SCF (SKP1/CUL1/proteína F-box), que interviene en procesos celulares tan importantes como la regulación de la proliferación o la supervivencia celular, entre otras muchas funciones. Este complejo está constituido por 3 subunidades constantes: CUL1, SKP1 y RBX1, y una subunidad variable: la proteína F-box, que otorga la especificidad al complejo SCF en su conjunto (Zheng *et al*, 2002).

La estructura del complejo SCF se puede observar en la **Figura 14**. El componente central del complejo es la proteína culina (CUL1) que actúa como un andamio que permite la unión de la subunidad SKP1 a través de su extremo N-terminal y de RBX1 por el extremo C-terminal. SKP1, a su vez, ejerce de puente entre CUL1 y la proteína F-

box. Las proteínas F-box poseen un dominio que se encarga del reconocimiento e interacción con los sustratos específicos que van a ser ubiquitilados, y un dominio F a través del cual se asocian a SKP1. En humanos, existe una gran variedad de proteínas F-box que suelen clasificarse en 3 grupos según la estructura de su dominio de interacción con los sustratos: las FBXW, que poseen repeticiones WD40, un motivo de 40 aminoácidos que suele terminar en el dipéptido triptófano-ácido aspártico; las FBXL, que poseen repeticiones ricas en leucina o LRRs; y las FBXO, que poseen otro tipo de dominio distinto de los anteriores. La subunidad RBX1 es la proteína que se une a la enzima E2 cargada con la ubiquitina. Posee el dominio RING que cataliza la transferencia de la ubiquitina desde la E2 al sustrato reconocido por la proteína F-box. Asimismo, RBX1 también permite la unión de una enzima E2 que se encarga de modificar post-traduccionalmente a la proteína culina. En concreto, posibilita la unión de una proteína similar a la ubiquitina denominada NEDD8, que promueve un cambio conformacional fundamental para la actividad del propio complejo SCF, ya que facilitará la ubiquitilación de las proteínas sustrato (Cardozo & Pagano, 2004; Nakayama & Nakayama, 2006; Skaar *et al*, 2014).

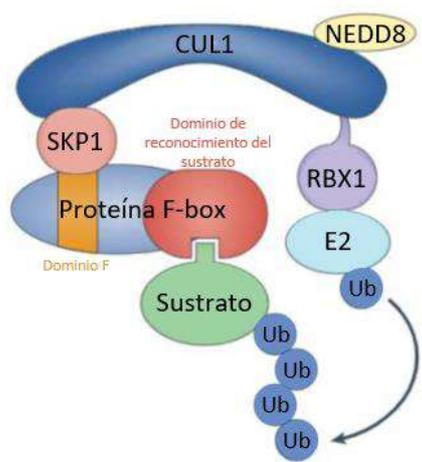


Figura 14. Componentes del complejo ligasa de ubiquitina SCF. Se representan unidos al complejo la enzima E2 cargada con la ubiquitina y la proteína sustrato ubiquitilada. Al tratarse de una ligasa de ubiquitina E3 de tipo culina-RING, la transferencia de la molécula de ubiquitina es directa desde la enzima E2 al sustrato gracias al dominio catalítico localizado en la subunidad RBX1. El sustrato, por su parte, es reconocido por una subunidad diferente del complejo: la proteína F-box. Figura modificada a partir de Skaar *et al*, 2014.

Además de los distintos factores que regulan la actividad del complejo SCF, es fundamental la regulación de la interacción entre la proteína F-box y los sustratos. Esta interacción debe ser rápida y específica para que el complejo SCF pueda llevar a cabo la ubiquitilación de los sustratos correctos en el momento adecuado. Por ello, los propios sustratos están fuertemente regulados, permitiendo o no la interacción con la proteína F-box. Generalmente, las proteínas F-box reconocen unos motivos cortos y específicos en los sustratos que se denominan degrones (Ravid & Hochstrasser, 2008). Para que ocurra el reconocimiento y la interacción es frecuente que el degrón experimente algún tipo de modificación post-traduccional previa que asegure que la interacción ocurra sólo en las condiciones adecuadas (**Figura 15**). Una de las modificaciones más frecuentes es la fosforilación de residuos concretos del degrón, que pasaría a denominarse fosfodegrón. Los residuos que se fosforilan suelen ser

serinas o treoninas, aunque a veces los degrones presentan aminoácidos ácidos que actúan como fosfomiméticos, es decir, simulando un estado de fosforilación constante. En estos casos, la regulación de la interacción estaría fuera del degrón. La fosforilación del degrón puede estar mediada por una única quinasa o por varias cuando existe más de un sitio de fosforilación en el motivo. También puede ocurrir que para que se dé la fosforilación reguladora de la interacción previamente haya tenido que fosforilarse otro residuo (fosforilación cebadora), que puede estar situado en el propio fosfodegrón o fuera de él. Asimismo, pueden darse fosforilaciones en otros motivos ajenos al degrón, pero que sean fundamentales para que la proteína F-box lo reconozca, por ejemplo, cuando la fosforilación provoca un cambio conformacional en el sustrato que deja expuesto el degrón, que antes era inaccesible. En otros casos, sin embargo, la fosforilación del degrón impide que sea reconocido por la proteína F-box, por lo que esta modificación debe retirarse para que pueda ocurrir la interacción (Skaar *et al*, 2013).

Además de la fosforilación, existen otros mecanismos que pueden mediar en el reconocimiento de los sustratos por parte de la proteína F-box, como pueden ser la glicosilación del degrón o la intervención de ciertos cofactores y otras moléculas pequeñas. Para complicar más la cuestión, en algunos casos la proteína F-box puede unirse a la proteína sustrato por medio de ciertos dominios que no siguen el patrón habitual de los degrones (Skaar *et al*, 2013). En otras ocasiones, puede reconocer y unirse a degrones concretos sin que estos requieran modificación previa. En este caso, intervendrían otros tipos de mecanismos para regular la ubicuilitación, como podría ser la diferente localización de la ligasa y el sustrato, que sólo coincidirían en determinadas condiciones (D'Angiolella *et al*, 2012, 2010). Además, también pueden combinarse distintos mecanismos de los mencionados para el reconocimiento de los sustratos (Hao *et al*, 2005). Así, se van añadiendo nuevas capas de regulación que aumentan la complejidad y permiten un control mucho más preciso del reconocimiento del sustrato y su ubicuilitación.



Figura 15. Formas de reconocimiento del sustrato por parte de las proteínas F-box. Para que una proteína F-box reconozca a un sustrato específico en el momento preciso, es frecuente que el degrón deba experimentar ciertas modificaciones post-traduccionales previas. Por ejemplo, la fosforilación de residuos específicos, con o sin fosforilación cebadora. En otros casos, la fosforilación induce un cambio conformacional que hace accesible al degrón. Sin embargo, también es posible que la fosforilación impida el reconocimiento, lo que requiere la intervención de fosfatasas. También pueden darse otras modificaciones como glicosilaciones, o bien ser necesaria la participación de un cofactor o molécula pequeña. Incluso, puede ser que la proteína F-box reconozca degrones sin modificar, o se una a dominios que no sigan el patrón clásico de los degrones. Figura modificada a partir de Skaar *et al*, 2013.

- **La proteína F-box β TrCP**

β TrCP es una de las proteínas F-box mejor caracterizadas. Pertenece al grupo de proteínas F-box de tipo FBXW, al poseer varias repeticiones WD40 en su dominio de interacción con los sustratos, y se encuentra altamente conservada en la evolución. En mamíferos, podemos encontrar dos genes parálogos de β TrCP: β TrCP1 y β TrCP2, el primero localizado en el cromosoma 10, región 10q24, y el segundo en el cromosoma 5, región 5q35 (Fuchs *et al*, 2004). β TrCP1, también conocida como FBXW1, puede presentar 2 isoformas, α y β , mientras que β TrCP2, también llamada FBXW11, puede presentar un total de 3 isoformas, α , β y γ . Todas ellas se obtienen por maduración alternativa del transcrito original de sus respectivos genes (Putters *et al*, 2011). Todas estas isoformas comparten una estructura básica (**Figura 16**): en la región C-terminal

poseen las repeticiones WD40 en tándem, mientras que en la región N-terminal poseen el dominio F y el dominio D o de dimerización, gracias al cual pueden formarse tanto homodímeros como heterodímeros de la proteína, lo que influye de manera sustancial en la especificidad por los sustratos. En el extremo N-terminal se localiza además una región variable cuya secuencia difiere de unas isoformas a otras. Pese a esta diferencia, las distintas isoformas parecen desempeñar funciones fisiológicas y bioquímicas redundantes (Nakayama *et al*, 2003; Suzuki *et al*, 2000).

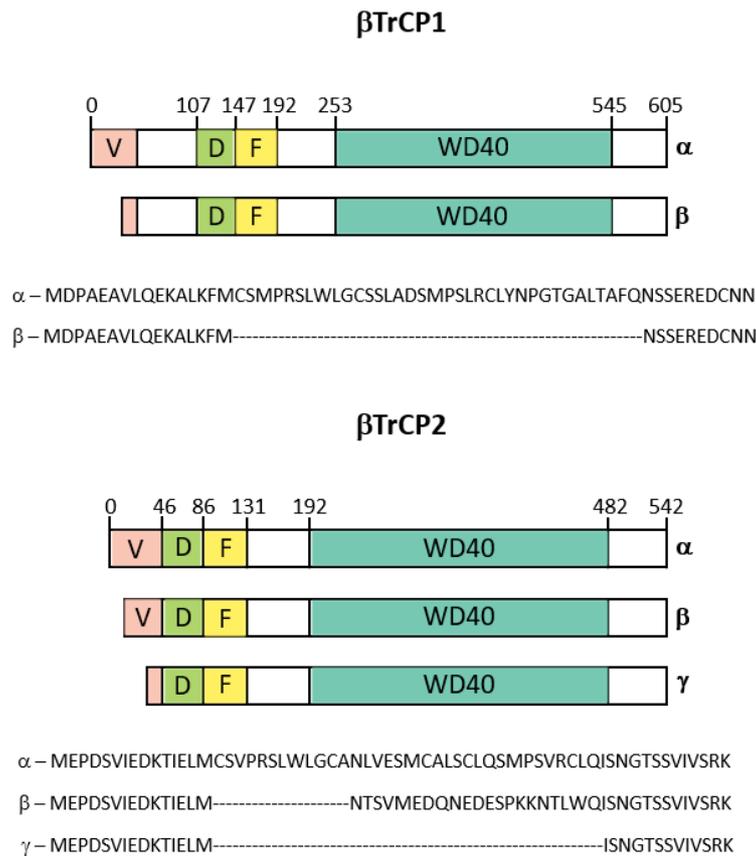


Figura 16. Representación esquemática de los dominios principales de las isoformas de β TrCP1 y β TrCP2. En dirección N-terminal – C-terminal se representan los dominios variables (V), de dimerización (D), F y WD40. Debajo de las isoformas agrupadas se muestran las secuencias aminoacídicas de los dominios V de cada isoforma. Estas se obtienen por maduración alternativa de los transcritos originales de β TrCP1 y β TrCP2. Figura modificada a partir de Putters *et al*, 2011.

○ *Sustratos de SCF(β TrCP) destacables y regulación*

El motivo consenso que reconoce β TrCP en los sustratos es D-S-G-X₂₋₃-S, donde X representa cualquier aminoácido. Esta secuencia, sin embargo, puede presentar múltiples variantes dependiendo del sustrato específico, entre ellas, la más simple que es la sustitución de las serinas por treoninas. Para que el degrón sea correctamente reconocido por β TrCP y tenga lugar la interacción, se requiere que ambas serinas (o treoninas) estén previamente fosforiladas (Frescas & Pagano, 2008; Lau *et al*, 2012). En

la fosforilación de estos residuos pueden intervenir diferentes quinasas, siendo GSK3 la más descrita hasta el momento (Robertson *et al*, 2018).

Los diversos e importantes procesos celulares en los que interviene β TrCP están determinados por la enorme variedad de sustratos con los que interacciona y facilita su ubiquitilación. Señalaremos a continuación algunos ejemplos. En el contexto de la transducción de señales, cabe destacar el papel de β TrCP en la regulación de la vía WNT/ β -catenina, ruta fundamental en el desarrollo embrionario y en ciertos procesos tumorigénicos. Cuando la vía está inactiva, β -catenina es fosforilada, en primer lugar, por la quinasa CK1 α y, en segundo lugar, por GSK3 β en el degrón reconocido por β TrCP, lo que permite su interacción con esta proteína F-box y su consecuente ubiquitilación y en este caso degradación por la vía del proteasoma (Stamos & Weis, 2013; Liu *et al*, 2002). Al activarse la ruta, β -catenina deja de ser fosforilada y evita su degradación. Esto permite que se transloque al núcleo para activar la expresión de determinados genes. Además, también induce un aumento en la expresión de la propia proteína F-box, lo que regula en última instancia la actividad del complejo SCF(β TrCP) (Spiegelman *et al*, 2000). El papel de β TrCP en las rutas de señalización celular no se limita a la vía WNT/ β -catenina, sino que también interviene en otras rutas, como la vía PI3K/AKT/mTOR regulando la degradación de DEPTOR, inhibidor natural de mTOR; la vía ERBB a través de la degradación de ERBB2; o la vía de NF- κ B, mediando en la degradación de I κ B (Zhao *et al*, 2011; Wang *et al*, 2014b; Kroll *et al*, 1999), entre otras.

β TrCP también interviene en la regulación y avance del ciclo celular mediante la degradación de diversos sustratos implicados en este proceso, entre los que podemos señalar WEE1 (Watanabe *et al*, 2004), EMI1 (Guardavaccaro *et al*, 2003), CDC25 (Kanemori *et al*, 2005), ciclina D1 (Wei *et al*, 2008), ciclina F (Mavrommati *et al*, 2018) o PLK1 (Giráldez *et al*, 2017). Asimismo, β TrCP desempeña varios roles en la respuesta a los daños en el ADN. Cuando se detecta una lesión en el ADN, β TrCP favorece la parada del ciclo celular que permite el procesamiento y reparación de los daños. La activación de CHK1 y CHK2 provoca la fosforilación de CDC25, promoviendo su ubiquitilación por SCF(β TrCP) y posterior degradación, provocando así una reducción de los complejos ciclinas-CDKs activos (Jin *et al*, 2003; Busino *et al*, 2003). Por otro lado, SCF(β TrCP) también promueve la degradación de MDM2, regulador negativo de p53, favoreciendo así la acumulación de esta proteína y la consecuente parada del ciclo a través de la inducción de p21 CIP1 (Inuzuka *et al*, 2010). Además, SCF(β TrCP) también juega un papel en la parada del ciclo celular tras radiación UV para reparar los daños, induciendo la degradación de securina (Limón-Mortés *et al*, 2008). Finalmente, una vez que los daños han sido reparados, SCF(β TrCP) induce la degradación de sustratos específicos como WEE1 o claspina, que intervienen en la ruta ATR-CHK1, favoreciendo en este caso el avance del ciclo celular tras daño (Watanabe *et al*, 2004; Mailand *et al*, 2006).

Además, β TrCP también regula sustratos que intervienen en la transcripción de determinados genes, como PER1, PER2 o FOXO3, en fenómenos de migración celular y transición epitelio-mesénquima, como SNAIL o TWIST, en la regulación de la cascada apoptótica, como MCL-1 o la procaspasa 3, en procesos relacionados con la respuesta inmune, como IRAK1 o PD-L1 o en infecciones víricas (Bi *et al*, 2021). De hecho, la degradación de la proteína CD4 en el contexto de la infección por el virus VIH-1 fue la primera actividad que se describió para β TrCP humana (Margottin *et al*, 1998).

Como β TrCP participa en la ubiquitilación de numerosas proteínas, claves en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, sus niveles y su actividad están estrictamente regulados. En ello intervienen múltiples mecanismos, entre los que se incluyen ARNs largos no codificantes (lncRNAs), ARNs pequeños no codificantes (microRNAs), diversas rutas de señalización como la ruta de las quinasas MAP (MAPK), la actividad de las enzimas DUBs o determinados pseudosustratos. Estos últimos son moléculas que se unen a la proteína F-box y regulan su actividad sin necesidad de ser ubiquitilados por la misma (Bi *et al*, 2021), como por ejemplo la proteína nuclear hnRNP-U. La interacción entre β TrCP1 y hnRNP-U estabiliza a la proteína F-box y además permite su translocación del núcleo al citoplasma, donde podrá intervenir en la ubiquitilación de determinados sustratos citoplasmáticos (Davis *et al*, 2002). En relación a esto, la localización subcelular de β TrCP también regula su función, al permitir o no el acceso a sustratos concretos. β TrCP1 presenta una localización fundamentalmente nuclear, mientras que β TrCP2 se localiza tanto a nivel nuclear como citoplasmático (Davis *et al*, 2002; Lassot *et al*, 2001), si bien se requieren estudios más precisos en este ámbito. Por último, los niveles de β TrCP también se regulan mediante su degradación. Curiosamente, β TrCP1 y β TrCP2 son capaces de ubiquitilarse recíprocamente para inducir su propia degradación. Cuando homodimerizan a través de su dominio D, β TrCP1 o β TrCP2 actúan reconociendo sustratos en el complejo SCF, pero cuando forman heterodímeros suelen facilitar su autodegradación (Cui *et al*, 2020a). Sin embargo, existen otras proteínas F-box que también son capaces de reconocer a β TrCP como proteína sustrato para su ubiquitilación y degradación, como puede ser SKP2 (Wei *et al*, 2012).

- *Papel de SCF(β TrCP) en la transformación tumoral*

Como acabamos de describir, β TrCP interviene en procesos celulares esenciales. Por ello, la desregulación de los niveles y/o de la actividad de esta proteína F-box se ha vinculado con distintas enfermedades, entre ellas el cáncer. En esta cuestión, el papel de β TrCP es complejo, ya que puede actuar como oncoproteína o como proteína supresora de tumores (**Figura 17**). Su papel como oncoproteína está apoyado por el hecho de que la sobreexpresión de β TrCP1 se ha detectado en cáncer colorrectal, hepatoblastomas, melanomas y cáncer de páncreas (Ougolkov *et al*, 2004; Koch *et al*,

2005; Mürköster *et al*, 2005; Liu *et al*, 2007). De manera muy similar, la sobreexpresión de βTrCP2 también se ha detectado en cáncer de próstata, mama y estómago (Fuchs *et al*, 2004). Además, SCF(βTrCP) media en la ubiquitilación (y degradación) de proteínas supresoras de tumores, entre las que destaca I κ B, regulador negativo de NF- κ B. Este factor de transcripción interviene en procesos como la inflamación y la respuesta inmune, y promueve la expresión de genes vinculados con la transformación tumoral, por lo que se ha encontrado en niveles altos en distintos tipos de cáncer (Karin & Greten, 2005). Por tanto, la degradación de I κ B promovida por SCF(βTrCP) favorece la actividad de NF- κ B y la tumorigénesis (Liu *et al*, 2007; Dhawan & Richmond, 2002). También podemos citar la degradación de DEPTOR, que conlleva la activación de la vía de mTOR y promueve la proliferación celular y la migración (Cui *et al*, 2020a). No obstante, en ocasiones la degradación de DEPTOR tiene el efecto contrario, jugando un papel más bien de supresora de tumores. Esto se debe a que la vía mTOR integra multitud de señales diferentes y controla numerosos procesos celulares, por lo que puede tener un efecto promotor o supresor de tumores, según el contexto (Zhao *et al*, 2011; Gao *et al*, 2011).

Asimismo, se han documentado mutaciones que generan formas defectuosas de βTrCP en distintos tipos de cáncer, incluyendo de mama, próstata y estómago (Saitoh & Katoh, 2001; Kim *et al*, 2007; Gerstein *et al*, 2002; Wood *et al*, 2007), indicando una función como supresora tumoral. Estas formas no funcionales suelen ser incapaces de interactuar con los sustratos, lo que favorece la estabilización y acumulación de ciertas oncoproteínas, como β -catenina o MDM2, entre otros (Bi *et al*, 2021). Estos han sido sólo algunos ejemplos, pero parece claro que βTrCP ejerce un papel dual en relación a la tumorigénesis según los sustratos sobre los que actúe y el tipo de tumor.

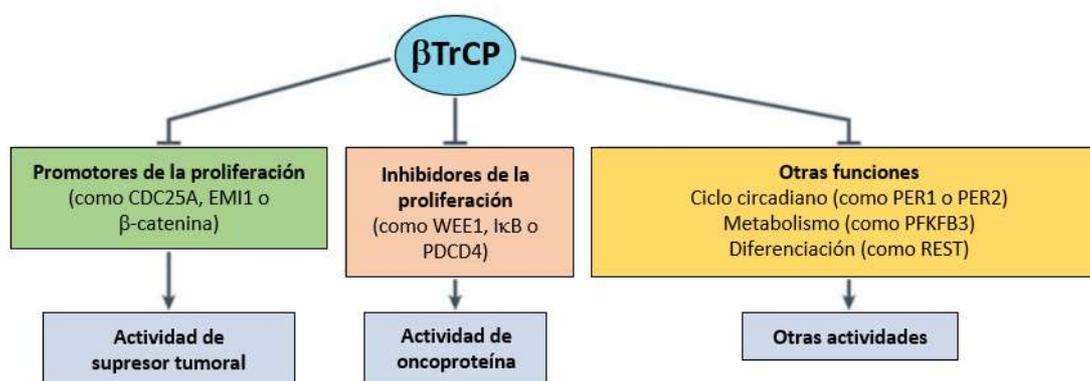


Figura 17. Actividades asociadas a βTrCP según algunos de los sustratos sobre los que actúa. βTrCP puede presentar actividad de supresor tumoral o de oncoproteína dependiendo de si favorece la degradación de proteínas promotoras o inhibidoras de la proliferación, respectivamente. También puede presentar otros tipos de actividades cuando actúa sobre sustratos implicados en contextos diferentes. Figura modificada a partir de Skaar *et al*, 2013.

- **La proteína F-box FBXW7**

FBXW7, denominada también FBW7 o hCDC4, es otra proteína F-box ampliamente estudiada, que pertenece al grupo de las de tipo FBXW. En humanos, *FBXW7* se localiza en el cromosoma 4, concretamente en la región 4q31.3. Este gen codifica 3 isoformas (α , β y γ) que se expresan a partir de promotores diferentes, cada una de ellas con su propio control transcripcional. Las 3 isoformas comparten 10 exones y difieren en el exón inicial, lo que hace que sus regiones N-terminal sean distintas mientras que las regiones C-terminal son comunes a todas (**Figura 18**). Así, en su estructura comparten las repeticiones WD40 en tándem, el dominio F y el dominio D, además de una secuencia de localización nuclear. Sin embargo, el extremo N-terminal variable es el que determina la localización subcelular de cada isoforma: FBXW7 α se localiza fundamentalmente en el nucleoplasma, FBXW7 β en el citoplasma y FBXW7 γ en el nucleolo. La isoforma α posee otra secuencia de localización nuclear en el extremo variable N-terminal, mientras que la isoforma β posee un dominio transmembrana que permite su localización en la membrana del retículo endoplasmático (Yumimoto & Nakayama, 2020; Fan *et al*, 2022). La expresión de cada isoforma varía dependiendo del tejido, de manera que la isoforma α se expresa ubicuamente, la isoforma β se expresa fundamentalmente en cerebro y testículo, y la isoforma γ en el tejido cardíaco y el músculo esquelético (Spruck *et al*, 2002; Matsumoto *et al*, 2006).

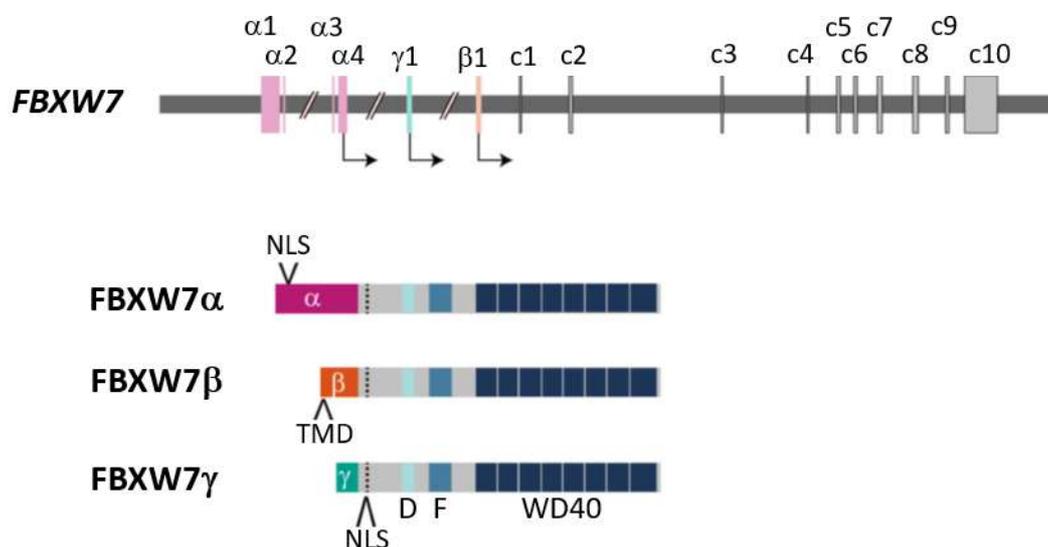


Figura 18. Estructura del gen *FBXW7* y principales dominios de las isoformas que codifica. Todas las isoformas comparten, en dirección N-terminal – C-terminal, una secuencia de localización nuclear (NLS) y los dominios de dimerización (D), F y WD40. Se diferencian en la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal, donde la isoforma α posee otra NLS y la β posee un dominio transmembrana (TMD). Esto es consecuencia de que las 3 isoformas comparten un total de 10 exones ($c 1$ - $c 10$), y varían en el exón inicial. Figura modificada a partir de Yumimoto & Nakayama, 2020.

- *Sustratos de SCF(FBXW7) destacables y regulación*

FBXW7 interacciona con sus sustratos a través de los degrones presentes en ellos, que en este caso se denominan CPDs (del inglés *CDC4-phosphodegron*). Los CPDs suelen presentar la secuencia consenso ϕ -X- ϕ - ϕ -S/T-P-P-X-S/T, donde X representa cualquier aminoácido y ϕ un aminoácido hidrofóbico (Nash *et al*, 2001; Hao *et al*, 2007). Cuando ambas serinas o treoninas del motivo están fosforiladas, el sustrato es reconocido por las repeticiones WD40 de FBXW7 y tiene lugar la interacción. La quinasa que realiza estas fosforilaciones suele ser GSK3 (Heo *et al*, 2016). Sin embargo, la secuencia del CPD admite variaciones según el sustrato, como puede ser la sustitución de los residuos fosforilables (serina/treonina) por aminoácidos fosfomiméticos (ácido aspártico o glutámico). En ocasiones, la secuencia del sitio de interacción se aleja más aún del consenso, siendo entonces un CPD subóptimo, que puede presentar baja afinidad por FBXW7. Algunos sustratos poseen más de un CPD, como es el caso de ciclina E, que posee dos: uno en su región C-terminal que tiene la secuencia óptima, y otro en su región N-terminal que tiene baja afinidad por la proteína F-box (Hao *et al*, 2007).

La mayor parte de los sustratos de SCF(FBXW7) interaccionan y son ubiquitilados en el nucleoplasma, lo que coincide con el hecho de que FBXW7 α sea la isoforma más abundante en la célula. Uno de los sustratos más característicos de esta ligasa de ubiquitina es ciclina E, que desempeña un papel fundamental en el avance del ciclo celular. Esta ciclina forma un complejo con CDK2 que está activo durante un periodo muy breve de tiempo en la transición de la fase G₁ a S. Se encarga de fosforilar multitud de sustratos que facilitan la formación de los complejos de iniciación de la replicación a partir de los complejos de pre-replicación, la reparación de los posibles daños en el ADN y la duplicación y maduración de los centrosomas, entre otras funciones (Deckbar *et al*, 2011). Por tanto, los niveles de la ciclina E deben estar estrictamente regulados evitando así una segunda ronda de replicación en la fase S. Una vez que la célula supera la transición G₁/S, SCF(FBXW7) ubiquitila a la ciclina E, provocando su degradación vía proteasoma (Koepp *et al*, 2001).

En condiciones de estrés genotóxico, FBXW7 promueve la ubiquitilación y degradación de ciertas proteínas esenciales para el avance del ciclo celular y la respuesta a los daños en el ADN, como p53 y PLK1, entre otras. Como hemos explicado anteriormente, el daño en el ADN favorece la estabilización y activación de p53, que induce la parada del ciclo celular. Tras la reparación de los daños, SCF(FBXW7) interviene en la degradación de p53, favoreciendo la recuperación del ciclo y la proliferación celular (Galindo-Moreno *et al*, 2019; Cui *et al*, 2020b; Tripathi *et al*, 2019). La quinasa PLK1, por su parte, lleva a cabo importantes funciones en distintos puntos del ciclo celular, como la regulación de proteínas que intervienen en los complejos pre-replicativos, la maduración de los centrosomas o la separación de las cromátidas hermanas (Strebhardt, 2010; Tsvetkov & Stern, 2005). Cuando se producen

daños en el ADN, FBXW7 promueve la ubiquitilación y degradación de PLK1, evitando la progresión del ciclo y la proliferación con el ADN dañado (Giráldez *et al*, 2014).

Aparte de los mencionados, FBXW7 regula múltiples sustratos implicados en diversos procesos celulares, destacando los factores de transcripción, como c-MYC o c-JUN, las proteínas implicadas en las redes de señalización intracelular, como NOTCH1, mTOR, RICTOR, o presenilina, las proteínas que participan en la cascada apoptótica, como MCL-1, u otros reguladores del ciclo celular, como Aurora A (Yumimoto & Nakayama, 2020; Fan *et al*, 2022; Xu *et al*, 2016).

Los niveles de FBXW7 en la célula se regulan mediante diferentes mecanismos, desde el control transcripcional por determinados factores de transcripción, post-transcripcional mediante microRNAs o lncRNAs, o post-traduccionales por determinadas quinasas que afectan a la estabilidad de la proteína. Además, su función también está modulada por el cambio de localización subcelular o por la actividad de las DUBs (Yumimoto & Nakayama, 2020). Al igual que ocurre con β TrCP, FBXW7 puede formar dímeros que interactúan a través de sus dominios D, lo que afecta tanto al reconocimiento de los sustratos como a la estabilidad de la propia proteína F-box. La dimerización aumenta la afinidad por determinados sustratos que poseen degrones subóptimos, aunque no es imprescindible para la interacción con degrones de elevada afinidad (Welcker *et al*, 2013; Davis *et al*, 2014). La estabilidad de FBXW7 también se ve afectada, ya que facilita la ubiquitilación de la proteína en *trans* (Welcker *et al*, 2013). A su vez, la dimerización está regulada por otras proteínas como LSD1, que interactúa con FBXW7 e impide su dimerización. Esta proteína no es ubiquitilada en este proceso, por lo que actúa como pseudosustrato de la proteína F-box (Lan *et al*, 2019). Otro ejemplo de pseudosustrato lo constituye la proteína EBP2, que se une a la isoforma γ para facilitar su localización en el nucleolo (Welcker *et al*, 2011).

- *Papel de SCF(FBXW7) en la transformación tumoral*

FBXW7 presenta la mayor frecuencia de mutación en cáncer de entre todos los genes de proteínas F-box de su clase. De hecho, se estima que alrededor del 7,8% de los cánceres humanos presentan mutaciones en *FBXW7* (Fan *et al*, 2022), un porcentaje que puede elevarse aún más dependiendo del tipo de tumor, como ocurre con ciertas hemopatías malignas como la leucemia linfoblástica aguda de células T o los tumores endometriales, que presentan mutaciones entre el 10% y el 16% de los casos (Yumimoto & Nakayama, 2020). Asimismo, en un porcentaje elevado de cánceres se detectan deleciones en la región cromosómica donde se localiza *FBXW7* (Knuutila *et al*, 1999). Las formas mutadas de la proteína suelen presentar alteraciones en el dominio de interacción con los sustratos, es decir, en las repeticiones WD40. Son especialmente notables las mutaciones en determinados residuos muy conservados de arginina, que pueden ser importantes para el correcto plegamiento de esta región de

la proteína y, por tanto, para el apropiado reconocimiento de los sustratos (Davis *et al*, 2014; Ikenoue *et al*, 2018). Dado que una gran parte de los sustratos de FBXW7 son considerados oncoproteínas, la acumulación de los mismos favorecería la transformación tumoral. Por ello, FBXW7 es considerada como una proteína supresora de tumores (**Figura 19**). Curiosamente, las mutaciones en *FBXW7* pueden afectar parcialmente a la actividad de la proteína, provocando una degradación selectiva únicamente de algunos de sus sustratos. Así, según el tipo de cáncer, puede darse con mayor frecuencia una determinada mutación que favorezca la acumulación de sustratos concretos, cuya función pro-supervivencia es más necesaria que la de otros sustratos (Fan *et al*, 2022).

Pese a su función primordial como supresora tumoral, no se puede descartar que FBXW7 también tenga un papel dual y favorezca la transformación tumoral, al menos en determinados casos. Así ocurre con la degradación de p100, que actúa como inhibidor de la ruta de señalización de NF- κ B no canónica o alternativa al secuestrar en el citoplasma factores de transcripción de la familia de NF- κ B. En un estudio sobre mieloma múltiple, se comprobó que SCF(FBXW7) promovía la degradación vía proteasoma de p100, permitiendo así la activación de la ruta no canónica de NF- κ B, lo que favorecía la supervivencia celular (Busino *et al*, 2012). Por otro lado, como describimos anteriormente, FBXW7 puede ubicuitar y degradar otro supresor tumoral como p53. En muestras de pacientes con cáncer de mama se encontró que el aumento en la expresión de *FBXW7* correlacionaba con una menor supervivencia en aquellas pacientes que portaban p53 silvestre, lo que no se observaba en las que portaban versiones no funcionales de p53. Esto sugiere que el efecto deletéreo de la sobreexpresión de *FBXW7* ocurre a través de la degradación de p53 funcional (Galindo-Moreno *et al*, 2020, 2019). En conjunto, estos datos reflejan el hecho de que las proteínas F-box no deben encasillarse como supresoras tumorales u oncoproteínas, sino que su papel en la transformación tumoral dependerá en gran medida de los sustratos sobre los que actúen en el contexto celular específico.

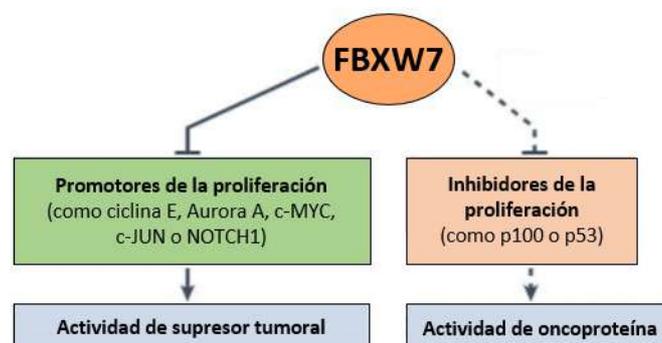


Figura 19. Actividades asociadas a FBXW7 según algunos de los sustratos sobre los que actúa. FBXW7 suele presentar actividad de supresor tumoral ya que favorece la degradación de multitud de proteínas que promueven la proliferación. Sin embargo, en algunas circunstancias puede actuar sobre inhibidores de la proliferación, desempeñando entonces actividad de oncoproteína. Figura modificada a partir de Skaar *et al*, 2013.

3.4. Sistemas de degradación de proteínas dependientes de ubiquitina

Como ya mencionamos anteriormente, uno de los destinos que pueden tener las proteínas ubiquitiladas es su degradación por dos vías diferentes: la vía del proteasoma y la vía de la autofagia/lisosoma. Sin embargo, estas rutas no son excluyentes ni totalmente independientes, sino que están interconectadas. Por ejemplo, la inhibición o bloqueo del proteasoma provoca la activación de la autofagia, lo que permite compensar la acumulación de proteínas sin degradar que a su vez genera niveles bajos de aminoácidos libres (Schreiber & Peter, 2014; Kirkin *et al*, 2009a). La inhibición del proteasoma también puede provocar la acumulación de proteínas mal plegadas que resultan tóxicas para la célula. En estas circunstancias, estas proteínas son agrupadas en estructuras denominadas agresomas, donde resultan menos tóxicas, que serán degradados posteriormente por vía autofágica (Kopito, 2000). Por su parte, la inhibición de la autofagia puede provocar la acumulación de proteínas que son degradadas por el proteasoma, o estimular la actividad del mismo, según el contexto celular (Wang *et al*, 2013b; Korolchuk *et al*, 2009). Incluso, ante ciertas condiciones desfavorables, la célula puede activar ambas rutas, incrementando su tasa de eliminación de proteínas. Además, las dos rutas de degradación comparten ciertos componentes de la maquinaria celular, como la proteína adaptadora p62/SQSTM1, que puede asociarse con sustratos ubiquitilados para dirigirlos hacia una degradación proteasómica o lisosomal. No obstante, la propia proteína p62 se degrada fundamentalmente por la vía de la autofagia (Myeku & Figueiredo-Pereira, 2011; Liu *et al*, 2016b).

- **La vía del proteasoma**

La degradación de proteínas ubiquitiladas a través del proteasoma constituye una vía fundamental para el reciclaje de múltiples sustratos celulares. El proteasoma eucariota 26S es una enorme estructura multiproteica de aproximadamente 2,5 MDa que tiene una importante presencia en la célula, localizándose tanto en el núcleo como en el citoplasma. Suele degradar proteínas reguladoras que tienen una vida media corta, permitiendo así un control eficaz de los procesos de señalización celular (Schreiber & Peter, 2014).

El proteasoma puede subdividirse en dos regiones principales (**Figura 20**): el núcleo proteolítico 20S, que es la unidad central, y la subunidad reguladora 19S, que forma una estructura externa al núcleo proteolítico que limita el acceso al mismo. Esta subunidad 19S tiene una conformación a modo de tapadera y puede presentarse sólo a la entrada del complejo, en cuyo caso se denomina proteasoma 26S, o a la entrada y a la salida, denominándose entonces proteasoma 30S. En la subunidad 19S, a su vez, se pueden distinguir dos zonas: la base y la tapa. La tapa consta de 8 proteínas sin actividad catalítica (RPN3, RPN5-9, RPN12 y RPN15) y la metaloproteasa RPN11, que facilita la escisión y reciclaje de las moléculas de ubiquitina de la proteína sustrato. En

este proceso colaboran DUBs que pueden interactuar con la base. Por su parte, la base consta de 4 proteínas (RPN1, RPN2, RPN10 y RPN13) que actúan a modo de receptores de los sustratos ubiquitilados y otras 6 proteínas con actividad ATPasa (RPT1-6) que generan una estructura en forma de anillo. La base se encarga de desnaturalizar las proteínas a degradar y translocar las cadenas polipeptídicas al núcleo proteolítico. Por tanto, la subunidad 19S, además de regular la apertura del complejo, interviene en el reconocimiento de los sustratos ubiquitilados, elimina las cadenas de ubiquitinas, permite la desnaturalización de las proteínas sustrato (dependiente de ATP) y las transloca al núcleo 20S para su destrucción (Schreiber & Peter, 2014; Lander *et al*, 2012).

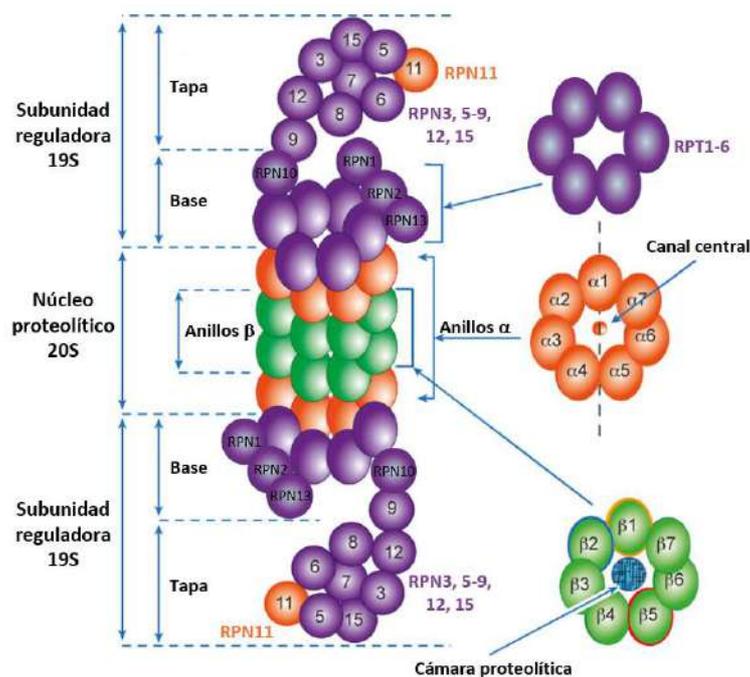


Figura 20. Estructura del proteasoma. El proteasoma 26S consta del núcleo proteolítico 20S y una sola subunidad reguladora 19S, mientras que el proteasoma 30S posee dos subunidades reguladoras 19S: una a la entrada y otra a la salida del núcleo proteolítico. En el anillo β se han marcado en amarillo, azul y rojo las subunidades que poseen las actividades catalíticas responsables de la degradación de las proteínas sustrato. Figura modificada a partir de Gadhav *et al*, 2016.

El núcleo proteolítico 20S posee una estructura cilíndrica que consta de 4 anillos compuestos de 7 proteínas cada uno: dos de ellos están compuestos por subunidades de tipo α y se sitúan en los extremos del cilindro, y otros dos por subunidades de tipo β y se localizan en la región central. La entrada de las cadenas polipeptídicas al núcleo 20S está controlado por los extremos N-terminal de las subunidades α , que cambian de conformación y permiten la entrada cuando la subunidad 19S lo requiere. Los residuos con actividad catalítica se localizan en 3 subunidades de tipo β de los anillos centrales. Las distintas actividades catalíticas abarcan desde las de tipo tripsina o quimiotripsina hasta la hidrólisis de enlaces peptídicos que siguen a aminoácidos con

cadena ramificadas o ácidos. Estos residuos catalíticos se localizan en la cara interna del canal central que se forma en el núcleo 20S, aislados del ambiente exterior (Beck *et al*, 2012). Una vez que las cadenas polipeptídicas son procesadas, se liberan al citosol pequeños fragmentos peptídicos de entre 3 y 25 aminoácidos, que serán degradados hasta aminoácidos individuales por la acción de la proteasa gigante tripeptidil peptidasa (TPP), o procesados a través del lisosoma (Tomkinson & Lindås, 2005).

El proteasoma tiene especial afinidad por las proteínas marcadas con cadenas de al menos 4 ubiquitinas unidas a través de K48, aumentando la afinidad a medida que aumenta la longitud de la cadena (Lander *et al*, 2012). Además, también presenta afinidad por cadenas de ubiquitinas unidas a través de K11, dado que su configuración es similar a las de las cadenas de K48. Otros tipos de conformaciones, sin embargo, son menos afines (Xu *et al*, 2009). Pese a que estas cadenas de ubiquitinas sean reconocidas por el proteasoma y permitan la unión del sustrato a él, en ocasiones la proteína sustrato puede evadir su degradación. Esto es debido a la acción de las DUBs, e incluso la propia RPN11, que escinden las moléculas de ubiquitina del sustrato. Una vez desubicultilado, el sustrato será o no degradado dependiendo de si queda apropiadamente unido al resto de la maquinaria del proteasoma (Collins & Goldberg, 2017).

- **La vía de la autofagia/lisosoma**

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas por el cual se degradan componentes intracelulares en los lisosomas. Por esta vía pueden degradarse un amplio rango de biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos o carbohidratos, así como orgánulos o patógenos intracelulares (Wileman, 2013; Rabinowitz & White, 2010). Por tanto, la autofagia regula los niveles y la calidad de ciertos componentes de la célula evitando la acumulación de proteínas y orgánulos dañados o innecesarios; interviene en la regulación del balance energético celular al permitir el reciclaje de precursores metabólicos; e influye en los fenómenos de supervivencia y muerte celular (King, 2012). Se pueden distinguir varias formas de autofagia según la manera en que el material a degradar, denominado cargo, alcance el lumen del lisosoma (**Figura 21**): la autofagia mediada por chaperonas (CMA), la microautofagia y la macroautofagia.

La CMA y la microautofagia son formas de autofagia menos estudiadas. En la CMA, los sustratos a degradar son proteínas citosólicas que son identificadas y transportadas individualmente al lisosoma con ayuda de una chaperona, habitualmente HSC70, y otras cochaperonas. HSC70 reconoce una secuencia específica en los sustratos (motivo KFERQ), se une a ellos y el complejo chaperona-sustrato es reconocido a su vez por un transportador de la membrana del lisosoma, denominado LAMP2A. Este oligomeriza y permite translocar el sustrato al lumen lisosomal en un proceso en el que interviene

una segunda HSC70 desde el interior del lisosoma (Orenstein & Cuervo, 2010; Cuervo & Wong, 2014). En la microautofagia, por su parte, los sustratos a degradar son componentes citosólicos que acceden directamente al lisosoma a través de invaginaciones o deformaciones locales de la propia membrana del lisosoma (Mijaljica *et al*, 2011).

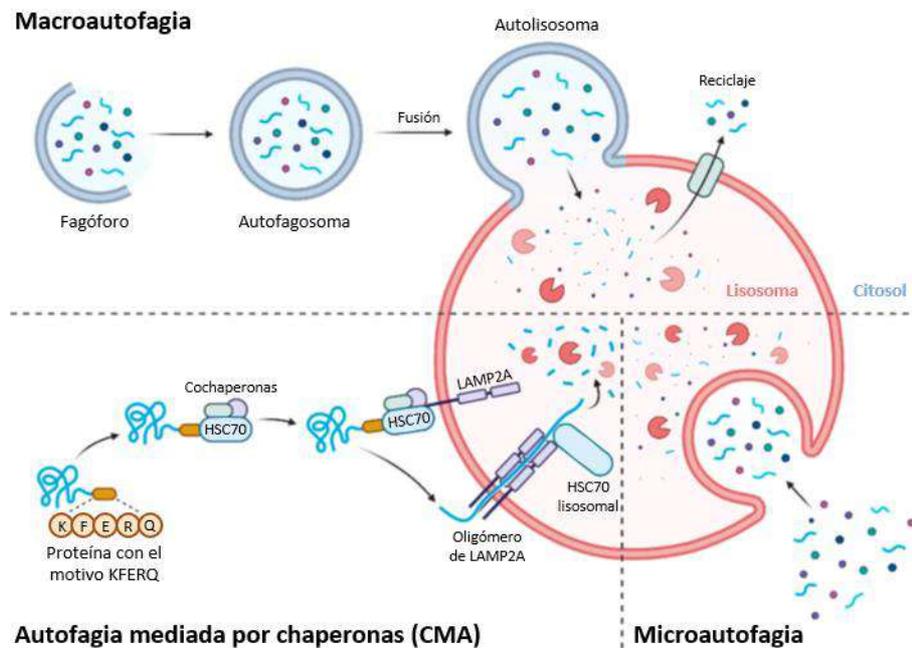


Figura 21. Formas de autofagia características. Dependiendo de la manera en que el cargo sea trasladado hasta el lumen del lisosoma se pueden distinguir 3 tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Figura modificada a partir de Izadi *et al*, 2021.

En la macroautofagia (en adelante denominada sólo “autofagia”), los elementos a degradar son englobados por una doble membrana lipídica de origen diverso, denominada inicialmente fagóforo, que va madurando y creciendo hasta cerrarse por completo, formando entonces el autofagosoma. Este finalmente se fusiona con el lisosoma, denominándose autolisosoma, y todo su contenido se degrada gracias a las enzimas lisosomales. Debido a las características de este fenómeno, puede degradarse una gran variedad de sustratos, desde macromoléculas a estructuras mayores como orgánulos, en un proceso que puede ser selectivo cuando los cargos se seleccionan de manera específica por medio de receptores o adaptadores de la autofagia, o no selectivo cuando se engloba una parte inespecífica del contenido celular. A su vez, existen múltiples tipos de autofagia selectiva, que se denominan según el cargo a degradar: mitofagia, cuando se degradan mitocondrias, pexofagia cuando se degradan peroxisomas, xenofagia cuando se degradan patógenos, etc. (Feng *et al*, 2014).

La formación del autofagosoma es un proceso complejo en el que interviene la maquinaria molecular central de la autofagia. Este proceso abarca varias etapas consecutivas (**Figura 22**). En la etapa de iniciación, el principal evento que tiene lugar

es la activación del complejo ULK, constituido por las proteínas ULK1, ATG13, ATG101 y FIP200. La activación del complejo dependerá de estímulos como la falta de nutrientes o energía, o determinadas situaciones de estrés, que se transmiten a través de redes de señalización celular en las que mTORC1 tiene un papel esencial. Cuando hay abundancia de nutrientes, la autofagia estará inhibida gracias a mTORC1, que inactiva el complejo ULK al fosforilar a ULK1 y ATG13. En cambio, cuando hay escasez de nutrientes como la glucosa, la quinasa AMPK se encarga de promover la autofagia de dos maneras complementarias: inactivando a mTORC1 y activando al complejo ULK mediante la fosforilación de ULK1 (Mizushima, 2010; Kim *et al*, 2011a; Kaushal & Shah, 2016).

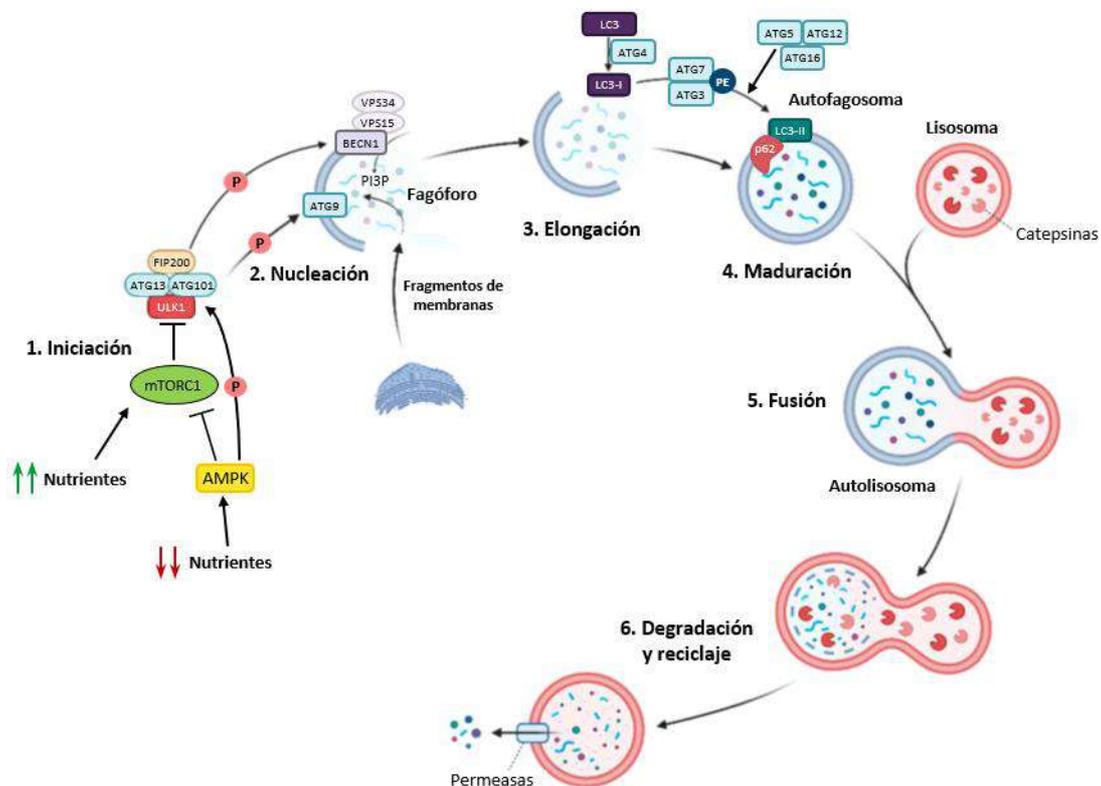


Figura 22. Etapas de la formación del autofagosoma y la degradación de sus cargas. En condiciones de abundancia de nutrientes, mTORC1 se encarga de inactivar al complejo ULK, bloqueando así la autofagia. Ciertas situaciones como la escasez de nutrientes inhiben a mTORC1, lo que permite la activación del complejo ULK (1). Este fosforila diversos sustratos, como ATG9, fundamental para el ensamblaje de fragmentos de membrana durante la etapa de nucleación, o ciertos componentes del complejo PI3K clase III, encargado de producir PI3P (2). El fagóforo crece progresivamente alrededor de los cargos, a la vez que la proteína LC3 es procesada primero a LC3-I y luego lipidada para formar LC3-II (3). Esta se inserta en la membrana del autofagosoma en crecimiento, que termina por cerrarse y dar el autofagosoma maduro, conteniendo los cargos a degradar (4). En la autofagia selectiva de sustratos ubicuitalizados, proteínas como p62 interaccionan con el material a degradar y con LC3-II, garantizando su incorporación al autofagosoma. Los lisosomas cargados de proteasas se fusionan con el autofagosoma (5), permitiendo así la degradación de su contenido. Por último, los productos de la degradación se devuelven al citoplasma gracias a las permeasas de membrana, permitiendo así su reciclaje (6). Figura modificada a partir de Izadi *et al*, 2021.

ULK1 está sujeto a fosforilaciones tanto activadoras como inhibitoras, según el contexto celular. Esta proteína es una quinasa de serina/treonina que ejerce como principal efector del complejo ULK. Entre los sustratos de ULK1 destaca ATG9, que es fundamental en la etapa de nucleación. La nucleación consiste en el ensamblaje de porciones de membranas para formar el fagóforo, la estructura membranosa precursora del autofagosoma. Estos fragmentos de membrana pueden producirse *de novo* o derivar de otras membranas ya formadas tanto de orgánulos como de la membrana plasmática (Tooze & Yoshimori, 2010; Gómez-Sánchez *et al*, 2021). Generalmente, el fagóforo se forma por la fusión de pequeñas vesículas que contienen ATG9 atravesando la membrana, lo que favorece el ensamblaje. Otros de los sustratos de ULK1 son algunos de los componentes del complejo PI3K clase III, formado por las proteínas VPS15, VPS34 y Beclina 1, entre otras (Wang & Kundu, 2017). Este complejo participa en la producción de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), un fosfolípido clave en la formación del autofagosoma (Jaber *et al*, 2012).

A medida que la estructura membranosa inicial va incorporando nuevo material, va creciendo alrededor de los elementos a degradar. En paralelo, la proteasa ATG4 procesa a LC3, otro componente esencial de la maquinaria autofágica, generando la forma LC3-I. A continuación, LC3-I es sometido a un proceso de lipidación por el cual se une covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE), generando así la forma LC3-II. En este proceso operan una serie de enzimas, de manera semejante a la cascada de ubiquitilación. Así, intervienen de manera secuencial las enzimas ATG7, que actúa a modo de enzima E1, ATG3, que actúa a modo de E2, y el complejo formado por las proteínas ATG5, ATG12 y ATG16, que actúa de manera equivalente a la enzima E3 (Lamb *et al*, 2013). LC3-II se inserta entonces en ambos lados de la membrana en crecimiento. Esta continúa su elongación y curvatura hasta cerrarse por completo, formando el autofagosoma maduro, que contiene todo el material a degradar (Reggiori & Ungermann, 2017; Cebollero *et al*, 2012). Finalmente, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, liberando los cargos en su interior. El contenido del autolisosoma resultante se degrada gracias a la acción de diversas proteasas contenidas en el lisosoma, como las catepsinas. Tras la digestión de los cargos, las (macro)moléculas generadas son liberadas al citoplasma a través de las permeasas de la membrana lisosomal, para su posterior reciclado como precursores metabólicos (Rudnik & Damme, 2021; Müller *et al*, 2012; Klionsky *et al*, 2014).

La degradación de sustratos por medio de la autofagia selectiva puede ser dependiente de ubiquitilación o independiente de ella. En este último caso, participan mecanismos alternativos para el reconocimiento de los sustratos que han de ser degradados específicamente, como el uso de proteínas similares a la ubiquitina, motivos que permiten interacciones proteína-proteína concretas o señales basadas en lípidos o azúcares (Khaminets *et al*, 2016). En la degradación selectiva de los sustratos ubiquitilados suelen intervenir receptores o adaptadores de la autofagia, como citamos

anteriormente. Estas proteínas poseen en su estructura un dominio de unión a la ubiquitina (dominio UBD) a través del cual reconocen e interaccionan con las ubiquitinas del cargo, y un dominio de interacción con LC3 (dominio LIR). De esta manera, se unen tanto al cargo a degradar como a la proteína LC3 ya inserta en la membrana del autofagosoma (LC3-II), asegurando así la incorporación al mismo y posterior degradación. La proteína p62/SQSTM1 es el adaptador clásico de la vía autofágica, aunque existen otros como NBR1 o NDP52. p62 reconoce sustratos marcados con cadenas de ubiquitina enlazadas a través de K48 (Chen *et al*, 2016b) o K63, aunque tradicionalmente se ha descrito una mayor afinidad por las segundas (Liu *et al*, 2016b; Lippai & Low, 2014). Experimentalmente, tanto el nivel de p62, que correlaciona inversamente con la actividad autofágica, como la conversión de LC3-I a LC3-II se utilizan como marcadores de autofagia (Slobodkin & Elazar, 2013; Lippai & Low, 2014).

Por último, destacar que la autofagia puede estimularse, además de por la privación de nutrientes anteriormente citada, por estrés oxidativo o daño en el ADN, entre otros, con el fin de preservar la homeostasis celular (Kroemer *et al*, 2010). En el caso del daño en el ADN (**Figura 23**), la activación de ATM provoca la inhibición de mTORC1 vía AMPK, lo que induce la autofagia. ATM y ATR también provocan la estabilización y activación de p53, del que se han descrito papeles tanto en la activación como en la inhibición de la autofagia. Respecto a la estimulación de esta vía, p53 puede por un lado activar AMPK, con el efecto ya descrito, o por otro lado promover la expresión de la proteína moduladora de la autofagia regulada por daño, DRAM, una proteína lisosomal que facilita la autofagia. Asimismo, p53 puede estimular la expresión de la fosfatasa PTEN, un inhibidor de la vía PI3K/AKT. En ambos casos, el resultado es la inhibición de mTORC1 con la consiguiente activación de la vía autofágica (Zhang *et al*, 2015).

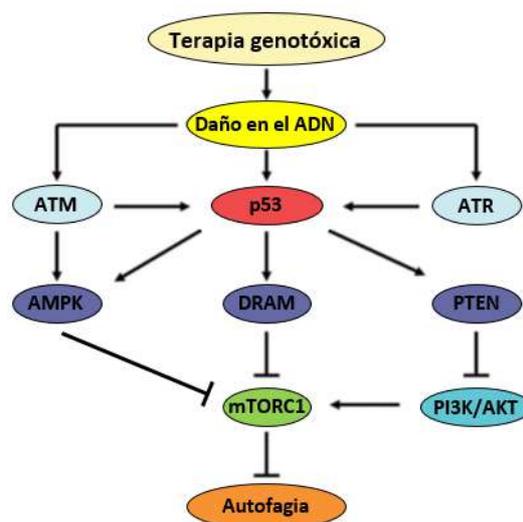


Figura 23. Efecto del tratamiento con agentes genotóxicos sobre la autofagia. El daño en el ADN derivado del tratamiento provoca en última instancia la activación de la autofagia a través de la inhibición por diversas vías de mTORC1. Figura modificada a partir de Zhang *et al*, 2015.

Objetivos

En los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en la identificación y el estudio de nuevos sustratos de las ligasas de ubiquitina SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7), interesándonos especialmente por aquellos que pudieran estar implicados en el proceso tumorigénico. El objetivo general de nuestro trabajo es averiguar la relevancia de esas interacciones en el contexto de la célula cancerosa, ya que se han publicado multitud de estudios que relacionan la desregulación de la estabilidad de las proteínas con el cáncer. Por tanto, la búsqueda de nuevos sustratos y la determinación del posible papel de su regulación por ubiquitilación en la formación o desarrollo de tumores permitirá obtener potenciales dianas terapéuticas contra esta enfermedad.

En esta Tesis nos hemos centrado específicamente en el estudio del complejo MRE11-RAD50-NBS1, tras su identificación como posible sustrato de las ligasas de ubiquitina SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7) en ensayos de espectrometría de masas. Para ello, hemos abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Validar las interacciones entre β TrCP y FBXW7 y las proteínas del complejo MRN, y averiguar si son sustratos de las correspondientes ligasas de ubiquitina.
2. Caracterizar la asociación entre ambas proteínas F-box y el complejo MRN.
3. Analizar desde un punto de vista funcional el papel de la ubiquitilación del complejo MRN llevada a cabo por SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7).

Materiales y métodos

1. Material biológico

1.1. Bacterias

En este trabajo se han empleado las estirpes NEB5 α , DH5 α y DH10B de *Escherichia coli*. Los genotipos de estas estirpes son los siguientes:

- **NEB5 α** : F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ ⁻thi-1 gyrA96 relA1 fhuA2.
- **DH5 α** : F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ ⁻thi-1 gyrA96 relA1.
- **DH10B**: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ ⁻rpsL(Str^R) nupG.

Todas ellas se han utilizado para la producción de plásmidos que portaban genes de interés, así como un gen de resistencia a antibióticos, como marcador de selección. Los cultivos bacterianos se sembraron en el medio rico no definido Luria-Bertani (LB), tanto en medio líquido como sólido, suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido: generalmente 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich), y en algunos casos 40 μ g/mL de kanamicina (Sigma-Aldrich). Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C para un crecimiento óptimo.

Para conservar a largo plazo las bacterias transformadas con plásmidos de interés, se obtuvieron precipitados bacterianos a partir de 20 mL de cultivo líquido, suplementado con el antibiótico correspondiente. Posteriormente, se resuspendieron en 4 mL de una solución de medio LB con glicerol al 20%, se dividieron en dos viales de congelación (Greiner Bio-one) y se guardaron a -80 °C.

Medio LB: 20 g/L de LB-Broth Lennox (Formedium) en H₂O bidestilada. Para medio sólido, añadir 20 g/L de agar. Conservar a temperatura ambiente.

1.2. Células de mamífero

Las líneas celulares que se han utilizado en este trabajo se detallan en la siguiente relación:

Línea celular	Origen	Referencia
A549	Carcinoma pulmonar humano.	ATCC
A549::HA β TrCP	Línea celular derivada de A549 que lleva integrado el gen HA β TrCP por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
Cos-7	Células de riñón de mono verde africano adulto (<i>Cercopithecus aethiops</i>) derivadas de la línea celular CV-1 por transducción con un mutante defectivo del virus SV40.	ATCC

DLD1 <i>FBXW7</i>^{+/+}	Adenocarcinoma colorrectal humano	(Rajagopalan <i>et al</i> , 2004)
DLD1 <i>FBXW7</i>^{-/-}	Línea celular derivada de DLD1 en la que los dos alelos correspondientes al gen <i>FBXW7</i> fueron eliminados por recombinación homóloga.	(Rajagopalan <i>et al</i> , 2004)
HEK293T	Células de riñón de embrión humano.	ATCC
HeLa	Carcinoma cervical humano.	ATCC
HeLa::<i>HA βTrCP</i>	Línea celular derivada de HeLa que lleva integrado el gen <i>HA βTrCP</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
HeLa::<i>HA FBXW7</i>	Línea celular derivada de HeLa que lleva integrado el gen <i>HA FBXW7</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
HeLa::<i>HA FBXW7 ΔF</i>	Línea celular derivada de HeLa que lleva integrado el gen <i>HA FBXW7 ΔF</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
HT1376	Carcinoma de vejiga humano.	Sigma-Aldrich
HT1376::<i>HA βTrCP</i>	Línea celular derivada de HT1376 que lleva integrado el gen <i>HA βTrCP</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
U2OS	Osteosarcoma humano.	ATCC
U2OS::<i>HA βTrCP</i>	Línea celular derivada de U2OS que lleva integrado el gen <i>HA βTrCP</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
U2OS::<i>HA βTrCP ΔF</i>	Línea celular derivada de U2OS que lleva integrado el gen <i>HA βTrCP ΔF</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
U2OS::<i>HA FBXW7</i>	Línea celular derivada de U2OS que lleva integrado el gen <i>HA FBXW7</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis
U2OS::<i>HA FBXW7 ΔF</i>	Línea celular derivada de U2OS que lleva integrado el gen <i>HA FBXW7 ΔF</i> por transducción con lentivirus.	Esta Tesis

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas.

- **Cultivo de líneas celulares**

En general, las líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) High Glucose (Biowest) suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10% (v/v), previa inactivación por calor del sistema del complemento, 2 mM de L-glutamina (Gibco) y mezcla de dos antibióticos (100 µg/mL de estreptomina y 100 U/mL de penicilina, Gibco). Las líneas DLD1 y DLD1 *FBXW7*^{-/-} se cultivaron en medio McCoy's 5A (BioWest) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y la mezcla de los dos antibióticos. Las células, todas con crecimiento adherente, se cultivaron en cajas de 6 pocillos de 3,5 cm de diámetro, o en cajas individuales de 6, 10 ó 15 cm de diámetro con 2, 5, 10 ó 20 mL de medio de cultivo,

respectivamente. Las diferentes líneas se incubaron en condiciones ambientales adecuadas y estables, usando para ello un incubador Heraeus a 37 °C con atmósfera húmeda y CO₂ al 5%.

Con el fin de evitar que las células alcanzaran una confluencia excesiva, los cultivos se diluyeron periódicamente. Para ello, se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Luego, se despegaron añadiendo la décima parte del volumen de medio de cultivo de una solución estéril de tripsina-EDTA (Gibco) al 0,05% en PBS y se incubaron a 37 °C durante 4 – 8 min, según las características del cultivo. Pasado este tiempo, se neutralizó la tripsina añadiendo 10 volúmenes de medio de cultivo. A partir de ahí, las células en suspensión se diluyeron respecto a la caja de partida, conforme a las necesidades experimentales. Las diferentes líneas celulares se renovaron una vez al mes.

Inactivación del sistema del complemento del suero: descongelar el suero en un baño a 37 °C y, luego, calentarlo 30 min a 56 °C. Tras esto, dejarlo atemperar, hacer alícuotas y conservarlo a -20 °C hasta su uso.

PBS 10X: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄·7H₂O y 14 mM KH₂PO₄. Ajustar el pH a 7,3. Para su uso en cultivo, diluir con H₂O bidestilada hasta alcanzar 1X, esterilizar en autoclave y conservar a temperatura ambiente.

- **Descongelación y congelación de células**

Para descongelar los viales de células, estos se incubaron a 37 °C hasta prácticamente su descongelación total. A continuación, el medio de congelación se diluyó con 10 mL de medio de cultivo y se centrifugó 8 min a 1.200 rpm a temperatura ambiente. El precipitado celular resultante se resuspendió luego en el volumen adecuado de medio de cultivo y se distribuyó, a la dilución deseada, en cajas de cultivo.

Para conservar las líneas celulares a largo plazo, las células se congelaron y almacenaron en una atmósfera de nitrógeno líquido. Partiendo de cultivos crecidos inmediatamente tras descongelar, las células fueron despegadas como se ha descrito anteriormente y la suspensión celular se centrifugó 8 min a 1.200 rpm a temperatura ambiente. El precipitado celular obtenido se resuspendió en 2 mL de medio de congelación por cada vial de congelación (Greiner Bio-one) para alcanzar una proporción de, aproximadamente, 5x10⁶ células por vial. Posteriormente, los viales se mantuvieron a 4 °C durante 30 min, a -20 °C durante 2 h, a -80 °C entre 15 – 24 h y, por último, se guardaron en atmósfera de nitrógeno líquido.

Medio de congelación: 10% de DMSO estéril y 90% de suero fetal bovino. Conservar a -20 °C.

- **Tratamiento con diversos compuestos**

En determinados experimentos fue necesario tratar los cultivos celulares en condiciones estériles con alguno(s) de los compuestos que se relacionan a continuación:

Compuesto	Casa comercial	Preparación	Uso <i>in vivo</i>	Función
Blasticidina	InvivoGen	10 mg/mL en tampón HEPES	2,5 – 40 μ g/mL	Marcador de selección
CHIR-99021	Selleck Chemicals	10 mM en DMSO	10 μ M	Inhibición de GSK3
Cisplatino	Sigma-Aldrich	1 mM en H ₂ O bidestilada	1 – 70 μ M	Estrés genotóxico
Cloruro de amonio (NH₄Cl)	Sigma-Aldrich	2 M en H ₂ O bidestilada	40 mM	Inhibición de las enzimas lisosomales
Concanamicina A	Sigma-Aldrich	50 μ M en DMSO	50 nM	Inhibición de la bomba de H ⁺ lisosomal
Doxorrubicina	Sigma-Aldrich	20 mM en H ₂ O bidestilada	0,25 – 2,5 μ M	Estrés genotóxico
MG132	Santa Cruz Biotechnology	20 mM en DMSO	20 μ M	Inhibición del proteasoma
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	LabKem	33% (9,7 M)	30 – 300 μ M	Estrés oxidativo
PF-4708671	TOCRIS	6,67 mM en DMSO	10 μ M	Inhibición de p70S6K
Rapamicina	Sigma-Aldrich	1 mM en DMSO	10 μ M	Inhibición de mTORC1
TBB	TOCRIS	50 mM en DMSO	75 μ M	Inhibición de CK2
Trehalosa	Sigma-Aldrich	Se disuelve la cantidad adecuada directamente en medio de cultivo	100 mM	Estimular la autofagia

Tabla 2. Compuestos utilizados para el tratamiento de las células en cultivo.

Por otro lado, en algunos experimentos fue necesario someter las células a privación de suero. Con este fin, partiendo de cajas con cultivos subconfluentes, se retiró el medio y se realizaron 3 lavados con PBS. Posteriormente, se añadió medio de cultivo fresco suplementado con suero fetal bovino al 0,15% y se recolectaron las células tras 3 días de privación.

2. Manipulación de ácidos nucleicos

2.1. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta Tesis se citan a continuación:

Plásmido	Descripción	Referencia
pLenti 6.3/V5-DEST	Plásmido del sistema de producción de lentivirus. Permite clonar el gen de interés bajo el promotor constitutivo CMV. Además, porta el gen de resistencia a blasticidina para seleccionar células transducidas. Presenta los elementos necesarios para su empaquetamiento en la cápsida vírica durante el ensamblaje del virión: señal de empaquetamiento psi y regiones LTR. Este plásmido fue cedido por el Dr. S. I. Reed (Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA).	Addgene
pRSV-Rev	Plásmido del sistema de producción de lentivirus. Codifica la proteína REV, que facilita la exportación de los ARN virales del núcleo al citoplasma celular. Este plásmido fue cedido por el Dr. S. I. Reed (Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA).	Addgene
pMDLg/pRRE	Plásmido del sistema de producción de lentivirus. Codifica GAG y POL, proteínas estructurales internas y retrotranscriptasa e integrasa, respectivamente. Este plásmido fue cedido por el Dr. S. I. Reed (Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA).	Addgene
pMD2.G	Plásmido del sistema de producción de lentivirus. Codifica ENV, proteínas de la envoltura vírica responsable del reconocimiento de determinados receptores de la célula, permitiendo así la infección. Este plásmido fue cedido por el Dr. S. I. Reed (Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA).	Addgene
pLenti HA βTrCP	Vector derivado de pLenti 6.3/V5-DEST que lleva clonado el ADNc de β TrCP humano fusionado a HA.	Esta Tesis
pLenti HA βTrCP ΔF	Vector derivado de pLenti 6.3/V5-DEST que lleva clonado el ADNc de β TrCP Δ F humano fusionado a HA. Actúa como dominante negativo de β TrCP al ser capaz de unirse a sus sustratos pero no a SKP1.	Esta Tesis
pLenti HA FBXW7	Vector derivado de pLenti 6.3/V5-DEST que lleva clonado el ADNc de FBXW7 humano fusionado a HA.	Esta Tesis
pLenti HA FBXW7 ΔF	Vector derivado de pLenti 6.3/V5-DEST que lleva clonado el ADNc de FBXW7 Δ F humano fusionado a HA. Actúa como dominante negativo de FBXW7 α al ser capaz de unirse a sus sustratos pero no a SKP1.	Esta Tesis
pCDNA3 Flag FBXW7	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de FBXW7 humano fusionado a Flag. Este plásmido fue cedido por el Dr. P. Wang (Institute of Biomedical Sciences and School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China).	(Liu <i>et al</i> , 2010)

pCMV HA	Vector de expresión en células de mamífero que incorpora <i>HA</i> . Este plásmido fue cedido por el Dr. K. Irie (Department of Molecular Cell Biology, University of Tsukuba, Japan).	(Fukuda <i>et al</i> , 2009)
pCMV HA FBXW7	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>FBXW7</i> humano fusionado a <i>HA</i> .	(Giráldez <i>et al</i> , 2014)
pCMV HA FBXW7 ΔF	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>FBXW7 ΔF</i> humano fusionado a <i>HA</i> .	(Giráldez <i>et al</i> , 2014)
pCS2 HA βTrCP	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>βTrCP</i> humano fusionado a <i>HA</i> . Este plásmido fue cedido por la Dra. F. Margottin-Goguet (Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Paris V, Paris, France).	(Margottin <i>et al</i> , 1998)
pCS2 HA βTrCP ΔF	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>βTrCP ΔF</i> humano fusionado a <i>HA</i> . Este plásmido fue cedido por la Dra. F. Margottin-Goguet (Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Paris V, Paris, France).	(Margottin <i>et al</i> , 1998)
pFlag CMV2	Vector de expresión en células de mamífero que incorpora <i>Flag</i> . Este plásmido fue cedido por el Dr. C. Spruck (Sydney Kimmel Cancer Center, San Diego, California, USA).	(Klotz <i>et al</i> , 2009)
pFlag CMV2 βTrCP	Vector derivado de pFlag CMV2 que lleva clonado el ADNc de <i>βTrCP</i> humano fusionado a <i>Flag</i> .	Esta Tesis
pHeBo CMV NBS1	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>NBS1</i> humano. Este plásmido fue cedido por el Dr. K. J. Wu (Department of Medical Genetics, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan).	(Chiang <i>et al</i> , 2003)
pCMV HA NBS1	Vector derivado de pCMV HA que lleva clonado el ADNc de <i>NBS1</i> humano fusionado a <i>HA</i> .	Esta Tesis
pCMV HA NBS1 T273A	Vector derivado de pCMV HA NBS1 en el que se ha cambiado el aminoácido Thr 273 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV HA NBS1 T337A	Vector derivado de pCMV HA NBS1 en el que se ha cambiado el aminoácido Thr 337 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV HA NBS1 S343A	Vector derivado de pCMV HA NBS1 en el que se ha cambiado el aminoácido Ser 343 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV HA NBS1 $\Delta$$\beta$T	Vector derivado de pCMV HA NBS1 T273A en el que se han cambiado los aminoácidos Thr 276 por Ala y Ser 278 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV HA NBS1 ΔFB	Vector derivado de pCMV HA NBS1 T337A en el que se han cambiado los aminoácidos Ser 341 por Gly y Ser 343 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCDNA3 RAD50 Flag	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>RAD50</i> humano fusionado a <i>Flag</i> . Este plásmido fue cedido por el Dr. M. F. Lavin (Radiation Biology and Oncology Laboratory, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland, Australia).	(Gatei <i>et al</i> , 2011)
pCMV HA RAD50	Vector derivado de pCMV HA que lleva clonado el ADNc de <i>RAD50</i> humano fusionado a <i>HA</i> .	Esta Tesis
pCMV HA RAD50 S784G	Vector derivado de pCMV HA RAD50 en el que se ha cambiado el aminoácido Ser 784 por Gly mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis

pCMV HA RAD50 S913G	Vector derivado de pCMV HA RAD50 en el que se ha cambiado el aminoácido Ser 913 por Gly mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV HA RAD50 $\Delta\beta$T	Vector derivado de pCMV HA RAD50 S784G en el que se ha cambiado el aminoácido Thr 790 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV HA RAD50 ΔFB	Vector derivado de pCMV HA RAD50 S913G en el que se han cambiado los aminoácidos Glu 916 por Gly, Thr 917 por Ala y Thr 918 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV6 MRE11 MycFlag	Vector de expresión en células de mamífero que lleva clonado el ADNc de <i>MRE11</i> humano fusionado a <i>Myc-Flag</i> .	OriGene
pCMV6 MRE11 T597A MycFlag	Vector derivado de pCMV6 MRE11 MycFlag en el que se ha cambiado el aminoácido Thr 597 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCMV6 MRE11 $\Delta\beta$T MycFlag	Vector derivado de pCMV6 MRE11 T597A MycFlag en el que se han cambiado los aminoácidos Glu 600 por Gly, Thr 601 por Ala, Ser 602 por Ala y Thr 603 por Ala mediante mutagénesis dirigida.	Esta Tesis
pCW7 (pRBG4 Myc Ub)	Plásmido que expresa el gen de la ubiquitina fusionado a <i>Myc</i> .	ATCC

Tabla 3. Plásmidos utilizados.

2.2. Aislamiento de plásmidos de bacterias

El aislamiento de plásmidos de cultivos bacterianos obtenidos a partir de colonias aisladas se realizó con diferentes kits comerciales dependiendo de la cantidad de ADN plasmídico que se quisiera obtener. Para obtener cantidades pequeñas de ADN plasmídico, partimos de cultivos bacterianos de hasta 4 mL y realizamos minipreparaciones utilizando el kit *Isolate II Plasmid Mini Kit* (BioLine), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener grandes cantidades de ADN plasmídico de elevada pureza, partimos de cultivos bacterianos de 200 mL y realizamos maxipreparaciones utilizando el kit *FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Maxi Kit* (Favorgen), siguiendo también las indicaciones del producto. Una vez obtenidas las diferentes preparaciones plasmídicas, medimos la concentración y pureza del ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific).

2.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción se utilizaron según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Cuando se requería gran cantidad de ADN digerido, la restricción se prolongaba en el tiempo y se añadía más endonucleasa a mitad del proceso.

2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Las muestras de ADN se mezclaron con la cantidad correspondiente de tampón de carga 6X, y se cargaron en geles preparados con una concentración de agarosa entre 0,5 y 1,5% (según el tamaño del fragmento a visualizar o aislar) en tampón TAE 0,5X y 0,4 µg/mL de bromuro de etidio (stock de 10 mg/mL, Sigma-Aldrich). Las muestras se acompañaron con un marcador con diferentes fragmentos de ADN de tamaño conocido (escalera de 1 kb, Gibco). La electroforesis se realizó en un equipo iMupid, de Eurogentec, utilizando el mismo tampón TAE 0,5X (sin bromuro de etidio) como electrolito, basándonos en el método descrito por Maniatis y colaboradores (Maniatis *et al*, 1982). Tras la migración, las bandas de ADN se visualizaron utilizando un transiluminador equipado con lámpara ultravioleta (GelDoc-2000, BioRad) y se fotografiaron con una videocámara. Por último, las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Quantity One de BioRad.

Tampón de carga 6X: 40% (p/v) sacarosa, 0,25% (p/v) azul de bromofenol y 6 mM EDTA pH 8. Conservar a 4 °C.

Tampón TAE: 40 mM Tris-acetato pH 8, 5 mM acetato sódico y 2 mM EDTA. Conservar a temperatura ambiente.

2.5. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Con el fin de aislar y purificar fragmentos de ADN concretos previamente separados por electroforesis en gel de agarosa, utilizamos el kit *Isolate II PCR and Gel kit* (BioLine), siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante.

2.6. Purificación mediante precipitación fenólica

Para purificar el ADN y extraer las proteínas, por ejemplo, tras una restricción, en primer lugar, añadimos a la muestra un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Tras agitar la mezcla, centrifugamos durante 5 min a 14.000 rpm y temperatura ambiente. De esta manera, se obtuvo una fase acuosa que contenía el ADN libre de contaminación proteica. A continuación, precipitamos dicho ADN añadiendo la décima parte del volumen de la fase acuosa de acetato de sodio 3 M pH 5,2, 2,2 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C y 1,5 µL de glucógeno (20 mg/mL, Roche) si la cantidad de ADN a precipitar era pequeña. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante al menos 30 min y posteriormente se centrifugó durante otros 30 min a 14.000 rpm y 4 °C. El precipitado de ADN resultante se lavó con etanol al 70% a -20 °C y, por último, se secó y se resuspendió en H₂O bidestilada.

2.7. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se realizó con la ligasa de T4 siguiendo las indicaciones del fabricante (New England Biolabs). Para estas reacciones usamos una relación vector/inserto de 1 a 7.

Las ligaciones se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el ADN se purificó mediante precipitación fenólica y se resuspendió en un volumen de 5 μ L de H₂O bidestilada estéril. Después, utilizamos 1 μ L para transformar *E. coli* por electroporación.

2.8. Reacciones de PCR

- **Oligonucleótidos cebadores**

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en las distintas reacciones de PCR, todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich, fueron los siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia
FBW7-S	5' ACGTGAATTCAATCAGGAAGCTCTCTGTGG 3'
FBW7-R	5' ACGTGTCGACTCACTTCATGTCCACATCAAAGT 3'
Lenti bTrCP-S	5' ACGTACTAGTCCACCATGTACCCATACGATGTTTC 3'
Lenti FBXW7-S	5' ACGTCTGCAGCCGCCATGGGCCGCATCTTTTACCCA TACGATG 3'
Lenti FBXW7Spe1-S	5' ACGTACTAGTCCGCCATGGGCCGCATCTTTTACCCATACGATG 3'
MRE11-mut.597-S	5' AAGAGCAGACGCTGGTCTGGA 3'
MRE11-mut.597-R	5' CCTCTTGAGACCCTCCTC 3'
MRE11-mut.600/3-S	5' GCTGCCCGTAGCAGGAAGCTCAAAG 3'
MRE11-mut.600/3-R	5' AGCCCCAGACCAGCGTCTGCTC 3'
NBS1-S	5' ACGTGTCGACGTGGAAAGCTGCCCCGCCG 3'
NBS1-R	5' ACGTGTCGACTTATCTTCTCTTTTAAATAAGGATTGT 3'
NBS1-mut.273-S	5' TGTTGTTGATGCAGGAATAACAAACTCAC 3'
NBS1-mut.273-R	5' CACGTTCCCGGAGCCAAA 3'
NBS1-mut.337-S	5' AAAGACAACAGCTCCAGGACC 3'
NBS1-mut.337-R	5' AATCCTGTACTGGGATGG 3'
NBS1-mut.343-S	5' ACCAAGCCTTGACACAAGGCGT 3'
NBS1-mut.343-R	5' CCTGGAGTTGTTGTCTTTAATCCTG 3'
NBS1-mut.276/8-S	5' ACGCACAGACCTTAATTCCTG 3'
NBS1-mut.276/8-R	5' TTGCTATTCCTGCATCAACAAC 3'
NBS1-mut.341/3-S	5' CTCCAGGACCAGGCCTTGACAAGGCGTG 3'
NBS1-mut.341/3-R	5' CTGTTGTCTTTAATCCTGTACTGGGATGG 3'
pLenti-R	5' GTACGCGTAGAATCGAGACCG 3'
RAD50-S	5' ACGTGAATTCTCCCGATCGAAAAGATGAGCATTG 3'
RAD50-R	5' ACGTCTCGAGTTAATGAACATTGAATCCAGGGAGCTAA 3'
RAD50-mut.784-S	5' TGAAGAAGAAGGTGCCAAAGTATG 3'
RAD50-mut.784-R	5' GGCATTATTGTACCCAAG 3'
RAD50-mut.913-S	5' AGAGCAGGTAGGCCCTTTGGA 3'
RAD50-mut.913-R	5' TTAGCATCCTTTATCTCTGTAC 3'

RAD50-mut.790-S	5' AGTATGCCTGGCAGATGTTAC 3'
RAD50-mut.790-R	5' TTGGCACCTTCTTCTCAG 3'
RAD50-mut.916/8-S	5' GGCCCTTTGGGAGCAGCATTGGAAAAG 3'
RAD50-mut.916/8-R	5' TACCTGCTCTTTAGCATC 3'
Trcp-R2	5' ACGTGTCTGACTTATCTGGAGATGTAGGTGTATGTTTC 3'

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.

- **Amplificación de fragmentos de ADN para clonación**

Ciertos fragmentos de ADN de interés se amplificaron por PCR a partir de un vector de partida con el fin de clonarlos en otro vector de expresión. Estas reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 μ L, conteniendo 20 ng de ADN molde, 1 μ L de cada oligonucleótido cebador (a 100 μ M), 1 μ L de la mezcla de los 4 nucleótidos (dNTP, 10 mM), 0,5 μ L de *Phusion High-Fidelity DNA Polimerase* (New England Biolabs) y 10 μ L del tampón 5X de la polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400.

- **Análisis de transformantes por PCR**

Para identificar las bacterias transformadas con una determinada construcción se realizó una PCR a partir de las colonias obtenidas tras la transformación. Para ello, dichas colonias se picaron con palillos estériles en otra placa con el mismo medio, para conservar las bacterias, y en tubos de PCR previamente preparados con 25 μ L de la mezcla de reacción. Por último, la presencia del producto de la PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, y la fidelidad de la clonación por secuenciación.

2.9. Mutagénesis puntual

Con el fin de generar versiones mutantes de RAD50, NBS1 y MRE11 utilizamos el kit *Q5 site-directed mutagenesis Kit* de New England Biolabs, siguiendo las indicaciones del fabricante. El primer paso fue diseñar los oligonucleótidos cebadores (recogidos en la **Tabla 4**) en los que se incorporaron los cambios de bases para producir los cambios de aminoácidos deseados. Después, se realizó una reacción de PCR utilizando como ADN molde los plásmidos correspondientes. Los productos de la PCR se incubaron con una mezcla enzimática que contenía una quinasa y una ligasa, necesarias para circularizar los plásmidos neoformados, y la enzima de restricción *DpnI*, que degradaba el ADN metilado (ADN molde) y hemimetilado (híbrido entre ADN molde y producto de la PCR), quedando solo los plásmidos amplificados en la PCR ya circularizados. Por último, para la transformación, se utilizaron bacterias quimiocompetentes y 5 μ L de la mezcla anterior. Tras una incubación de 30 min en hielo, la mezcla se sometió a un

choque térmico de 30 seg a 42 °C. Luego, se incubó de nuevo en hielo durante 5 min y se añadió 1 mL de medio LB. A continuación, la mezcla se mantuvo a 37 °C durante 1 h en agitación suave, y se cultivó en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente al marcador de selección del plásmido utilizado. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR y algunos de los clones positivos se mandaron a secuenciar para comprobar que los cambios introducidos en las secuencias de nucleótidos eran los correctos.

2.10. Transformación de bacterias electrocompetentes

Para transformar bacterias con los plásmidos de interés, habitualmente recurrimos a la electroporación. Las diferentes estirpes de *E. coli* electrocompetentes se transformaron siguiendo las instrucciones del fabricante del electroporador (Gene Pulser II, BioRad). Se utilizaron 40 µL de bacterias y 1 µL de ADN, correspondiente a 100 ng como máximo. Las electroporaciones se llevaron a cabo en cubetas de 0,2 cm de grosor (BioRad), con las siguientes condiciones: 2,5 kV, 200 Ω y 25 µF, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Tras incubar las bacterias en 1 mL de medio LB a 37 °C, se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente al marcador de selección del plásmido. Finalmente, las colonias obtenidas se analizaron mediante PCR.

2.11. Secuenciación

Las construcciones obtenidas tras los procesos de clonación y mutagénesis puntual se secuenciaron en centros especializados para comprobar que estuvieran libres de errores antes de usarlas en los diferentes ensayos. La comparación entre las secuencias obtenidas y las esperadas se realizó utilizando el programa BLAST (Altschul *et al*, 1990).

Los oligonucleótidos empleados en las secuenciaciones, todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich, fueron los siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia
MRE11Seq	5' CAGCAGCAACCAACAAAGG 3'
NBS1Seq	5' GGGGAAGCTAGGTTGATAAC 3'
RAD50Seq	5' GCTGGGACTTGTGCCCAT 3'

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación.

2.12. Transfección transitoria de células de mamíferos

Para los ensayos de transfección se usaron preparaciones de ADN plasmídico obtenidas según los protocolos mencionados anteriormente. Se siguieron diferentes métodos de transfección:

- **Transfección por electroporación**

Las transfecciones por electroporación se realizaron en la línea celular Cos-7, utilizando para cada transfección 10^7 células procedentes de cultivos no saturados. Las células se despegaron como se ha descrito anteriormente y se contabilizaron con una cámara de Petroff-Hauser (Marienfeld Superior), se centrifugaron a 1.000 rpm durante 8 min y se resuspendieron en medio de electroporación a razón de 10^7 células por cada 200 μ L.

El ADN usado en las electroporaciones (40 μ g como máximo) se llevó a un volumen final de 50 μ L con H₂O bidestilada estéril y NaCl a una concentración final de 200 mM. A esta mezcla se añadieron 200 μ L de la suspensión celular previa y todo el conjunto se pasó a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de grosor (BioRad). Se utilizó un electroporador Gene Pulser II (BioRad) con las siguientes condiciones: 200 V, resistencia en infinito y 950 μ F. Tras el pulso eléctrico, las células se pasaron a un tubo con 10 mL de medio de electroporación fresco y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 8 min. Para acabar, se resuspendieron en medio de cultivo y se realizaron las diluciones apropiadas.

En general, la expresión de los ADNc transfectados con este método alcanzaba su pico máximo entre 18 – 24 h tras la transfección, bajando considerablemente a partir de ese momento.

Medio de electroporación: medio de cultivo suplementado con 15 mM de HEPES sódico a pH 7,4.

- **Transfección con sistemas lipídicos**

Las transfecciones con sistemas lipídicos se realizaron en la línea celular HEK293T utilizando el kit Xfect (Takara), siguiendo las indicaciones del fabricante. Estos ensayos se realizaron en cajas de 6 pocillos a partir de cultivos subconfluentes (entre 50 y 70% de ocupación).

El ADN utilizado (7,5 μ g como máximo) se diluyó en tampón para ADN (*Xfect reaction buffer*) y se añadió la cantidad adecuada de polímero (*Xfect polymer*). Posteriormente, se dejó reposar mínimo 10 min para asegurar la interacción polímero-ADN. Por último, la mezcla se añadió al medio de cultivo en que se encontraban las células.

El tiempo óptimo de transfección fue de 48 h, aunque algunos ensayos se hicieron a tiempos distintos según las necesidades experimentales.

2.13. Producción de lentivirus

Una vez que clonamos los genes de interés (*HA βTrCP*, *HA βTrCP ΔF*, *HA FBXW7* y *HA FBXW7α ΔF*) en pLenti 6.3/V5-DEST, nos aseguramos en primer lugar que las construcciones se expresaban apropiadamente. Para ello, se transfectaron estos vectores en células HEK293T utilizando el kit Xfect (Takara), según lo descrito en el apartado *Transfección con sistemas lipídicos*. Comprobada la correcta expresión de estas construcciones mediante *Western blot*, pasamos a la producción de los lentivirus correspondientes. Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pLenti 6.3/V5-DEST (con el gen de interés), pRSV-Rev, pMDLg/pRRE y pMD2.G, en una relación 4:1:2,6:1,4. Tras 48 h, se habían formado los lentivirus y liberado al medio de cultivo. Retiramos dicho medio y lo centrifugamos a 1.200 rpm y 4 °C durante 20 min para descartar posibles contaminantes celulares. El sobrenadante obtenido con la suspensión de lentivirus se filtró con ayuda de una jeringuilla a través de un disco Puradisc de 25 mm y 0,45 μm de tamaño de poro (Cytiva). A continuación, añadimos a este filtrado un tercio de su volumen de Lenti-X-concentrator (Clontech) y lo mantuvimos en agitación a 4 °C durante 4 h. Después, la mezcla se centrifugó a 1.500 g y 4 °C durante 1 h, descartamos el sobrenadante y el precipitado obtenido, que contenía los lentivirus, se resuspendió en 200 μL de PBS 1X. Por último, titulamos los virus utilizando Lenti-X-GoStix (Clontech), obteniendo un título superior a 5×10^5 ifu o unidades infecciosas/mL. La suspensión de lentivirus se almacenó a -80 °C en alícuotas de un solo uso.

2.14. Transducción con lentivirus

Antes de realizar la transducción se determinó la dosis mínima de blasticidina capaz de matar a las células no transducidas. Para ello, se trataron cultivos de células subconfluentes con un rango amplio de dosis del fármaco (2,5 – 40 μg/mL) y se observó su evolución hasta un máximo de 7 días. Así, se determinó que la dosis apropiada de blasticidina para las líneas celulares utilizadas en este trabajo era 20 μg/mL.

Para realizar las transducciones con los lentivirus, las líneas celulares de interés se cultivaron en cajas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 70%. Se añadió entonces una alícuota de 10 μL de lentivirus concentrados al medio de cultivo celular, manteniendo siempre un pocillo sin lentivirus como control de la transducción. Tras 24 h de infección, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo con 20 μg/mL de blasticidina, tanto a las células transducidas como al control. Las células seleccionadas

con la blastidina se amplificaron escalonadamente, manteniendo la presencia del antibiótico en el medio de cultivo en todo momento, y se congelaron cuando alcanzaron el crecimiento adecuado. La correcta expresión de los genes transducidos se comprobó mediante *Western-blot* tanto en el proceso de amplificación como en las líneas celulares establecidas y congeladas.

2.15. ARNs pequeños de interferencia (siRNAs)

Los ARNs pequeños de interferencia fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. En los ensayos de silenciamiento génico transitorio se emplearon los siguientes siRNAs:

siRNA	Secuencia	Referencia
EGFP	5' CCUACGCCACCAUUUCGU 3'	(Lee <i>et al</i> , 2007)
FBXW7 α	5' GUGAAGUUGUUGGAGUAGA 3'	(van Drogen <i>et al</i> , 2006)
HA β TrCP	5' CUUAUGAUGUACCGACUA 3'	Esta Tesis
LC3	5' GAAGGCGCUUACAGCUCAA 3'	(Gao <i>et al</i> , 2010)
p62	5' GUAAGCCUAGGUGUUGUCA 3'	(Pursiheimo <i>et al</i> , 2009)

Tabla 6. ARNs pequeños de interferencia utilizados. Se muestra la secuencia 5'-3' de la cadena sentido del dúplex de ARN.

2.16. Silenciamiento génico transitorio

Con el fin de inhibir la expresión de determinados genes de interés, se realizaron ensayos de silenciamiento génico transitorio con 50 nM de ARNs pequeños de interferencia (siRNA, ver la **Tabla 6**), utilizando lipofectamina (Invitrogen) como reactivo de transfección. Las células empleadas generalmente fueron U2OS, que debían presentar una confluencia del 65 – 75%. Se incubaron en medio de cultivo OPTI-MEM (Gibco) un mínimo de 3 h previo a la interferencia. A continuación, diluimos por separado tanto los ARNs pequeños de interferencia como la cantidad adecuada de lipofectamina en medio OPTI-MEM. Incubamos 5 min a temperatura ambiente, mezclamos entre sí ambos componentes e incubamos otros 20 min para asegurar la interacción polímero-ARN. La mezcla se añadió al medio de cultivo y se mantuvo durante un mínimo de 4 – 5 h. Finalmente, se retiró y se añadió medio de cultivo fresco. Las células se recogieron a las 48 h de la interferencia.

3. Análisis de proteínas

3.1. Preparación de extractos celulares

Se han realizado diferentes tipos dependiendo de la finalidad y las necesidades experimentales.

- **Extractos totales**

Para extraer la totalidad de las proteínas celulares, incluyendo las proteínas unidas a ácidos nucleicos, utilizamos tampón RIPA con alta concentración de sal (420 mM NaCl), suplementado con inhibidores de proteasas. Los precipitados celulares se resuspendieron con ayuda de un agitador tipo vórtex en un volumen estimado del tampón. Después, se sonicaron utilizando un sonicador Bandelin SONOPLUS mini20 al 50% de potencia, durante 1,5 min en pulsos de 0,5 seg con pausas de 1 seg. Posteriormente, las muestras se mantuvieron un mínimo de 30 min en agitación a 4 °C. Para finalizar, se centrifugaron 30 min a 14.000 rpm y 4 °C, y los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -80 °C para su uso posterior.

Tampón RIPA con 420 mM NaCl e inhibidores de proteasas: 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS), 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 420 mM NaCl, CLAP y PMSF.

Mezcla de inhibidores de proteasas (CLAP 500X): preparar los siguientes stocks: quimostatina (Sigma-Aldrich, 5 mg/mL en DMSO), pepstatina (Sigma-Aldrich, 0,5 mg/mL en metanol), leupeptina (Sigma-Aldrich, 0,5 mg/mL en H₂O bidestilada), aprotinina (Sigma-Aldrich, 0,5 mg/mL en PBS 1X). Para generar la mezcla 500X, combinar volúmenes iguales de los cuatro inhibidores y completar con H₂O bidestilada si fuera necesario. Conservar a -20 °C.

PMSF 100X: 100 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo(PMSF, Sigma-Aldrich) en etanol absoluto. Conservar a -20 °C.

- **Extractos celulares NP-40**

Para los ensayos de inmunoprecipitación, los precipitados celulares se lisaron en tampón NP-40 con alta concentración de sal (420 mM NaCl) para obtener también las proteínas unidas a ácidos nucleicos, suplementado con inhibidores de proteasas. Se resuspendieron en un volumen estimado de tampón de lisis y se mantuvieron un mínimo de 30 min en agitación a 4 °C. Después, las muestras se centrifugaron 30 min a 14.000 rpm. Los sobrenadantes obtenidos se diluyeron con tampón NP-40 sin sal suplementado con inhibidores de proteasas, para rebajar la concentración de sal del extracto hasta 150 mM. Finalmente, los extractos obtenidos se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Tampón NP-40 con 420 mM NaCl e inhibidores de proteasas: 1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 420 mM NaCl, CLAP y PMSF.

Tampón NP-40 sin sal con inhibidores de proteasas: 1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, CLAP y PMSF.

- **Fraccionamiento subcelular**

Se han aplicado varios protocolos de fraccionamiento subcelular, que se detallan a continuación:

- *Obtención de extractos citosólicos y nucleares*

Para obtener los extractos citosólicos y nucleares seguimos el protocolo de Dignam y colaboradores (Dignam *et al*, 1983) con ligeras modificaciones. Los precipitados celulares fueron resuspendidos en 5 volúmenes (respecto al volumen del precipitado) de tampón A, hipotónico, para favorecer la rotura de la membrana plasmática. Después, se centrifugaron y se resuspendieron en 2 volúmenes del mismo tampón A. Se sometieron entonces a presión mecánica con ayuda de un pistón automático (Kimble Chase) para favorecer la rotura de las membranas citoplasmáticas y la liberación de su contenido. Cada cierto tiempo, las muestras se fueron analizando al microscopio en preparaciones con azul de tripano para distinguir la presencia de células enteras (no teñidas) y de núcleos intactos (teñidos de azul). Cuando la proporción de núcleos intactos superó considerablemente la de células enteras, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante correspondió a la fracción citosólica y el precipitado a la fracción enriquecida en núcleos.

Al sobrenadante se le añadieron 0,11 volúmenes (respecto al volumen obtenido tras la centrifugación) de tampón B y se incubó en agitación a 4 °C durante un mínimo de 30 min. Tras esto, se centrifugó a 14.000 rpm y 4 °C durante 1 h. El sobrenadante resultante se denominó S100 y se conservó a -80 °C.

El precipitado enriquecido en núcleos se centrifugó 20 min a 14.000 rpm y 4 °C para eliminar los restos de citosol presentes. Luego, se resuspendió en un volumen estimado de tampón C y se incubó en agitación a 4 °C durante un mínimo de 30 min. Tras esto, se centrifugó a 14.000 rpm y 4 °C durante otros 30 min. El sobrenadante resultante se denominó extracto nuclear (EN) y se conservó a -80 °C.

Para los ensayos de inmunoprecipitación realizados en extractos nucleares fue necesario rebajar la concentración de sal hasta 150 mM, para lo cual utilizamos tampón C sin sal.

Tampón A: 10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM KCl, CLAP, PMSF y 0,5 mM DTT.

Tampón B: 0,3 M HEPES pH 7,9, 30 mM MgCl₂·6H₂O, 1,4 M KCl, 9% NP-40, 20% glicerol, CLAP y PMSF.

Tampón C: 20 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂·6H₂O, 10% glicerol, 420 mM NaCl, 1% NP-40, 0,2 mM EDTA, CLAP, PMSF y 0,5 mM DTT.

Tampón C sin sal: 20 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂·6H₂O, 10% glicerol, 1% NP-40, 0,2 mM EDTA, CLAP, PMSF y 0,5 mM DTT.

- *Obtención de extractos cromatínicos*

Para conseguir extractos cromatínicos nos basamos en el protocolo de Yim y Erikson (Yim & Erikson, 2009) modificado. Los precipitados celulares se resuspendieron en un volumen estimado de tampón CSK y se incubaron en hielo durante 15 min. Posteriormente, se centrifugaron a 5.000 *g* y 4 °C durante 5 min. El sobrenadante resultante, que contenía todas las proteínas celulares no unidas a la cromatina, se denominó fracción soluble y se conservó a -80 °C.

El precipitado obtenido se resuspendió de nuevo en tampón CSK con ayuda de un agitador tipo vórtex y se centrifugó bajo las mismas condiciones para eliminar los restos de la fracción anteriormente aislada. Descartamos el sobrenadante y el precipitado, que contenía la cromatina y las proteínas unidas a ella, se trató con tampón RIPA con alta concentración de sal (420 mM NaCl), suplementado con inhibidores de proteasas. El extracto así obtenido se denominó fracción cromatínica y se conservó a -80 °C para su uso posterior.

Tampón CSK: 0,5% Tritón X-100, 300 mM sacarosa, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM HEPES sódico pH 7,4, 100 mM NaCl, CLAP y PMSF.

- *Obtención de fracciones enriquecidas en lisosomas*

Para la obtención de extractos enriquecidos en lisosomas nos basamos en el protocolo de Li y colaboradores (Li *et al*, 2013) modificado. Los precipitados celulares se resuspendieron en 3 volúmenes (respecto al volumen del precipitado) de tampón A. Después, se sometieron a presión mecánica con ayuda de un pistón automático para provocar la rotura de las membranas citoplasmáticas, comprobando al microscopio el estado de las células cada cierto tiempo con azul de tripano. Cuando las muestras alcanzaron la máxima proporción de núcleos intactos, se centrifugaron a 1.000 *g* y 4 °C durante 10 min para separar el citoplasma (sobrenadante) de los núcleos o fracción F1 (precipitado). Estos se lisaron con tampón RIPA con alta concentración de sal (420 mM NaCl), suplementado con inhibidores de proteasas.

La fracción citoplásmica completa se centrifugó a 12.000 *g* y 4 °C durante 10 min, tras lo cual separamos el sobrenadante (citosol o fracción F2) del pequeño precipitado compuesto por la fracción microsomal celular, enriquecida en lisosomas (fracción F3). Posteriormente, la fracción F2 fue tratada con 1% Tritón X-100, se mantuvo un mínimo de 30 min en agitación a 4 °C y se centrifugó 30 min a 14.000 rpm y 4 °C. El sobrenadante obtenido se conservó a -80 °C.

Por su parte, la fracción F3, enriquecida en lisosomas, se resuspendió por inversión en tampón B para eliminar los restos de citosol, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se disolvió en tampón C, se mantuvo un mínimo de 30 min en agitación a 4 °C y se centrifugó 30 min a 14.000 rpm y 4 °C. El sobrenadante resultante se conservó a -80 °C hasta su uso.

Tampón A: 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 2mM EGTA y 10 mM HEPES pH 7,5.

Tampón B: 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 2mM EGTA y 10 mM HEPES pH 7,5.

Tampón C: 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método descrito por Ausubel y colaboradores (Ausubel *et al*, 1989). En una cubeta de espectrofotometría diluimos 1 µL del extracto celular en 99 µL de H₂O bidestilada y añadimos 1 mL de solución Bradford. A continuación, medimos la densidad óptica del preparado a 595 nm. Por último, calculamos la concentración de proteínas de la muestra a partir de una recta de calibrado trazada con cantidades crecientes de una solución patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

Bradford 5X: Disolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich) en 50 mL de etanol al 95%. Añadir 100 mL de ácido ortofosfórico al 85%. Ajustar el volumen hasta 200 mL con H₂O bidestilada. Conservar a 4 °C, protegido de la luz. Filtrar la solución 1x antes de su uso.

Stock BSA: 10 mg/mL de BSA en H₂O bidestilada. Conservar en alícuotas a -20 °C.

3.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Para analizar los extractos proteicos obtenidos anteriormente se realizaron electroforesis monodimensionales en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras de proteínas se desnaturalizaron con tampón de carga Laemmli 2X o 4X, incubándolas 6 min a 95 °C. Posteriormente, se separaron por tamaño utilizando geles de poliacrilamida al 7,5 – 12%, según el peso molecular de las proteínas de interés a analizar. La migración se realizó con una unidad PowerPAC 300 (BioRad) a 10 mA por gel alrededor de 20 min, para asegurar el correcto empaquetamiento de las muestras, y luego se subió el amperaje cuidando que el voltaje asociado no superase los 160 V. La migración se cortó, por lo general, cuando el azul de bromofenol salió del gel. En este proceso se utilizó como electrolito el tampón de migración, y distintos patrones de peso molecular (BioRad o Cytiva) según las necesidades.

Tampón de Laemmli 4X: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 20% β-mercaptoetanol y 0,2% (p/v) azul de bromofenol. Conservar a -20 °C.

Tampón del gel concentrador 4X: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 y 0,4% SDS. Conservar a temperatura ambiente.

Tampón del gel separador 4X: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 y 0,4% SDS. Conservar a temperatura ambiente.

Stock de acrilamida/bisacrilamida: solución 37,5:1 de acrilamida:bisacrilamida (BioRad). Conservar a 4 °C.

Gel concentrador: tampón concentrador, 4% (v/v) stock de acrilamida:bisacrilamida, 0,1% (p/v) persulfato amónico (APS) y 0,1% (v/v) N,N,N',N'-tetrametiletildiamida (TEMED). Preparar antes de usar.

Gel separador: tampón separador, porcentaje variable del stock de acrilamida:bisacrilamida según las necesidades, 0,1% (p/v) APS y 0,04% (v/v) TEMED. Preparar antes de usar.

Tampón de migración: 3,03 g/L Trizma base, 14,4 g/L glicina y 1 g/L SDS, pH 8,3. Conservar a temperatura ambiente.

3.4. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez migradas las muestras de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS, en la mayoría de los casos se realizó la transferencia de las mismas a membranas de nitrocelulosa (Cytiva) con una unidad Criterion Cell (BioRad). Aplicamos un voltaje constante de 100 V durante 50 min.

Tampón de transferencia: 3,03 g/L Trizma base, 14,4 g/L glicina, 1 g/L SDS y 20% de metanol, pH 8,3. Conservar a 4 °C.

3.5. Fijación de proteínas

En algunos ensayos, tras transferir las muestras de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se realizó la fijación de proteínas de bajo peso molecular para evitar su elución en pasos posteriores. Para ello, incubamos en agitación suave, durante 15 min y a temperatura ambiente el fragmento o la membrana correspondiente en una solución de glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 1% en TBS-Tween 20. Después, se realizaron 2 – 3 lavados abundantes con TBS-Tween 20 de 10 min cada uno, tras lo cual teñimos la membrana con rojo Ponceau S.

Hay que tener en cuenta que este tratamiento puede dificultar el reconocimiento antigénico de ciertos anticuerpos en la inmunodetección posterior.

Tampón TBS-Tween 20 10X: 24,2 g/L Trizma base, 80 g/L NaCl y 1% Tween 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano). Ajustar a pH 7,6. Conservar a 4 °C.

3.6. Tinción con rojo Ponceau

Para visualizar las proteínas previamente transferidas a membranas de nitrocelulosa, incubamos los filtros en agitación suave durante 5 min con solución de rojo Ponceau S. Después, eliminamos el exceso de colorante destiñendo la membrana con H₂O bidestilada.

Solución rojo Ponceau 10X: 2 g rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich) y 30 g ácido tricloroacético en 100 mL de H₂O bidestilada. Conservar a temperatura ambiente protegido de la luz.

3.7. Inmunodetección de proteínas

Las membranas de nitrocelulosa se saturaron, en primer lugar, con tampón de bloqueo para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, incubándolas durante un mínimo de 40 min en agitación suave a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se incubaron con el anticuerpo primario preparado a la dilución adecuada en PBS toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 20 de 10 min cada uno, siempre en agitación suave. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente a la concentración adecuada.

Por lo general, se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo conjugados a peroxidasa (Cytiva), salvo para el anticuerpo primario anti-HA que ya estaba conjugado a ella. A continuación, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se realizaron 6 lavados con TBS-Tween 20 de 5 min cada uno. Por último, para el revelado se utilizó ECL Prime (*Enhanced ChemiLuminescence*, Cytiva) siguiendo las instrucciones del fabricante, y películas radiográficas (ThermoFisher Scientific). El revelado se realizó manualmente utilizando revelador y fijador para películas (ILFORD).

Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas de interés se relacionan en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Clonidad/especie	Casa comercial	Concentración
α -actinina	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
α -tubulina	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:20.000
β -actina	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:20.000
β -catenina	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:3.000
BRCA1	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Caspasa 3 activa	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:500
Ciclina E	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
CtIP	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Flag	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:2.500
γ -H2AX	Monoclonal de ratón	EMD Millipore	1:5.000
HA peroxidasa	Monoclonal de rata	Roche	1:3.000
Histona H1	Monoclonal de ratón	Abcam	1:1.000
LAMP-1	Policlonal de conejo	Novus Biologicals	1:500
LC3	Policlonal de conejo	Novus Biologicals	1:3.000
MCL-1	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	1:1.000
MRE11	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:1.000
NBS1	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:3.000
p-p70S6K (T389)	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:500
p21	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:500
p53	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
p62	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:1.000
p62	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1:5.000
PARP	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:750
PLK1	Monoclonal de ratón	EMD Millipore	1:15.000
RAD50	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:750
RAD50	Monoclonal de ratón	GeneTex	1:2.000
Ubiquitina K48	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:1.000
Ubiquitina K63	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:500
WEE1	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:1.000

Tabla 7. Anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección de proteínas.

Tampón de bloqueo 10X: disolver 10 g del reactivo de bloqueo (Blocking Reagent, Roche) en 100 mL de tampón maleico, a 65 °C con agitación. Conservar a 4 °C

Tampón maleico: 0,1 M ácido maleico y 0,15 M NaCl en H₂O bidestilada. Ajustar a pH 7,5. Conservar a temperatura ambiente.

Tampón de bloqueo: 10% tampón de bloqueo 10X y 0,5% Tween 20 en Tris-HCl 0,05 M pH 7,5. Conservar a 4 °C.

3.8. Transcripción-traducción *in vitro*

Para los experimentos de transcripción-traducción *in vitro* utilizamos los kits TNT® SP6 Coupled Transcription/Translation Systems y TNT® T7 Coupled Transcription/Translation Systems (Promega), siguiendo las instrucciones de uso. Estos kits utilizan extractos de reticulocitos de conejo para la producción *in vitro* de proteínas. Para llevar a cabo estos ensayos, usamos plásmidos cuyas construcciones se expresaban bajo promotores SP6 ó T7, respectivamente, así como una mezcla de metionina y cisteína marcadas radiactivamente con azufre ³⁵S (Met+Cys³⁵S). La reacción de transcripción-traducción *in vitro* se realizó mezclando 8 µl de extractos de reticulocitos (SP6 ó T7) con 0,2 µg de la construcción de interés y 1 µl de Met+Cys³⁵S, e incubando la mezcla a 30 °C durante 1 h 30 min.

3.9. Ensayos de ubiquitilación

Se han realizado ensayos de ubiquitilación *in vitro* e *in vivo*, como se detalla a continuación.

- **Ubiquitilación *in vitro***

Tras producir mediante transcripción-traducción *in vitro* en extractos de reticulocitos la proteína sustrato marcada radiactivamente con Met+Cys³⁵S, realizamos los ensayos de ubiquitilación *in vitro*. Para ello, utilizamos los complejos SCF(βTrCP) y SCF(FBXW7α) producidos de manera recombinante en células de insecto Sf21 (EMD Millipore). La reacción se llevó a cabo con 1-2 µL de sustrato (según la eficacia de la producción previa), 0,5 µg del complejo SCF correspondiente, 1 µL de la subunidad E1 (His₆-E1, 15 ng/µL), 1 µL de la subunidad E2-UbcH3 (His₆-UbcH3, 100 ng/µL), 1 µL de la subunidad E2-UbcH5a (His₆-UbcH5a, 100 ng/µL), 1 µL de ubiquitina (25 mg/mL), 1 µL de ubiquitina aldehído (10 µM), todas ellas de Boston Biochem, 1 µL de tampón de ubiquitilación 10X y 2 µL de ATP (10 mM). La mezcla resultante se incubó a 30 °C durante 1 h.

Tampón de ubiquitilación 10X: 500 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂ y 6 mM DTT. Conservar a -20 °C.

- *Migración y tinción con azul de Coomassie*

La reacción de ubiquitilación *in vitro* se detuvo añadiendo el volumen correspondiente de tampón de carga Laemmli 4X e incubando 6 min a 95 °C. Las

muestras desnaturalizadas se migraron en geles de poliacrilamida al 7,5% hasta que la proteína sustrato de la reacción de ubiquitilación hubo alcanzado la parte inferior del gel. Posteriormente, los geles se incubaron durante 30 min en una solución acuosa de azul de Coomassie, con agitación suave. En algunos casos, tras la tinción, incubamos los geles en una solución amplificadora de señal comercial (Amplify™, Cytiva) durante 15 – 30 min con el fin de mejorar la detección posterior de las proteínas marcadas con ³⁵S. Finalmente, para eliminar el exceso de colorante, los geles se lavaron con solución decolorante hasta alcanzar la coloración deseada.

Solución de azul de Coomassie: 50% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético, 40% (v/v) H₂O bidestilada y 0,5 g/L azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250, Sigma-Aldrich). Disolver el azul de Coomassie en etanol y luego añadir ácido acético y H₂O bidestilada. Filtrar y conservar a temperatura ambiente.

Solución decolorante: 40% etanol, 10% ácido acético y 50% H₂O bidestilada. Conservar a temperatura ambiente.

- *Secado de geles y autorradiografía*

Los geles previamente teñidos con azul de Coomassie se secaron durante 2 h a 80 °C al vacío en un secador de geles (BioRad), y se expusieron a películas radiográficas a -80 °C. Tras los tiempos de exposición requeridos, el revelado se realizó manualmente utilizando revelador y fijador para películas. En la película revelada, la ubiquitilación se detectó con la aparición de bandas y/o sombreado por encima de la banda correspondiente a la proteína en estudio.

- **Ubiquitilación *in vivo***

Los ensayos de ubiquitilación *in vivo* se realizaron en células HEK293T mediante transfecciones transitorias con el kit Xfect, siguiendo el protocolo descrito en el apartado *Transfección con sistemas lipídicos*. Se transfectaron, en un primer paso, los plásmidos que codificaban la proteína de estudio y Myc-ubiquitina. Las células transfectadas se recogieron y mezclaron para que todos los puntos en estudio tuvieran la misma expresión de las proteínas. En un segundo paso, se transfectaron los plásmidos codificantes para la F-box de interés. Las células se recogieron pasadas 48 h de la segunda transfección. Antes de la recolección, fueron tratadas con MG132 o NH₄Cl durante 4 h.

Los precipitados celulares obtenidos se lisaron bajo fuertes condiciones desnaturalizantes siguiendo el protocolo descrito por Tempé y colaboradores (Tempé *et al*, 2006). Las muestras celulares se resuspendieron en un volumen estimado de tampón de lisis y se calentaron a 95 °C durante 15 min. Después, se sonicaron durante 1,5 min en pulsos de 0,5 seg con pausas de 1 seg al 50% de potencia. A continuación, las muestras se mantuvieron un mínimo de 30 min en agitación y se centrifugaron 30 min a 14.000 rpm, todo a temperatura ambiente. Tras esto, los sobrenadantes obtenidos se diluyeron con tampón de lisis sin sal ni SDS con el fin de rebajar la

concentración de sal del extracto hasta 150 mM y la concentración de SDS hasta el 1%. De esta manera, posibilitamos la interacción anticuerpo-proteína de interés durante el ensayo de inmunoprecipitación posterior. Finalmente, los extractos obtenidos se conservaron a -80 °C para su uso futuro.

En todos los casos se realizó la inmunoprecipitación de la proteína sustrato de estudio y sus formas ubiquitiladas se detectaron en un *Western blot* posterior con los anticuerpos apropiados.

Tampón de lisis para ubiquitilación *in vivo*: 1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 420 mM NaCl, 5% SDS, 10 mM iodoacetamida (Sigma-Aldrich), CLAP y PMSF.

Tampón de lisis para ubiquitilación *in vivo* sin sal ni SDS: 1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 10 mM iodoacetamida, CLAP y PMSF.

3.10. Ensayos de co-inmunoprecipitación

Con esta técnica pudimos detectar interacciones entre proteínas *in vivo*. Consiste en utilizar anticuerpos para reconocer e inmunoprecipitar una proteína específica en un extracto para, posteriormente, analizar mediante *western blot* las proteínas que vienen asociadas a ella (las proteínas que co-inmunoprecipitan). Los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se realizaron en extractos obtenidos por diferentes métodos, como se ha visto anteriormente, pero siempre asegurando una concentración de NaCl final de 150 mM. Para cada inmunoprecipitación se utilizó entre 1 y 2 mg de proteína total.

En primer lugar, realizamos una etapa de limpieza de interacciones inespecíficas o *preclearing* con IgG de la especie del anticuerpo primario, incubando los extractos celulares con IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology) o conejo (suero total de conejo) durante 30 min a 4 °C en agitación. A continuación, se añadieron 20 µL de proteína A-sefarosa (para anticuerpos producidos en conejo) o proteína G-sefarosa (para anticuerpos producidos en ratón), ambas de Cytiva, y se incubaron durante 45 min en las mismas condiciones. Tras esto, las muestras se centrifugaron 2 min a 5.000 rpm y se reservaron los sobrenadantes.

En segundo lugar, realizamos la inmunoprecipitación propiamente dicha, añadiendo a la mitad de los sobrenadantes el anticuerpo contra la proteína de interés e incubamos las muestras durante 2 h a 4 °C en agitación. Como control, incubamos la otra mitad del extracto con la IgG correspondiente, utilizando una cantidad en µg equivalente al anticuerpo primario en las mismas condiciones. Después, se añadieron 20 µL de proteína A/G-sefarosa y se incubaron durante 1 h más. De nuevo, las muestras se centrifugaron 2 min a 5.000 rpm y los sobrenadantes se descartaron o se conservaron a -80 °C.

Por último, las matrices de proteína A/G-sefarosa obtenidas anteriormente se lavaron 6 veces con el mismo tampón utilizado para la extracción de proteínas en cada

experimento. Las proteínas inmunoprecipitadas se solubilizaron añadiendo tampón de carga Laemmli 4X e incubando 6 min a 95 °C. Finalmente, las muestras se analizaron mediante *Western blot*. En algunas ocasiones también se analizaron los extractos celulares antes y después de realizar la inmunoprecipitación para comprobar la eficacia de ésta.

Los anticuerpos empleados para inmunoprecipitar las diferentes proteínas de interés se relacionan en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Clonidad/especie	Casa comercial	Concentración
βTrCP	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:200
FBXW7α	Policlonal de conejo	Bethyl Laboratories	1:100
Flag	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:100
HA.11	Monoclonal de ratón	BioLegend	1:200
MRE11	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:100
MRE11	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:50
NBS1	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:100
RAD50	Policlonal de conejo	Novus Biologicals	1:100
RAD50	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:50

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar proteínas.

4. Técnicas celulares

4.1. Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron con cultivos de células adherentes crecidas sobre cubreobjetos, tanto en las condiciones habituales de crecimiento como tras diversos tratamientos.

Para empezar, las células se lavaron con PBS, precalentado a 37 °C, para eliminar los restos de medio de cultivo. Luego, se fijaron con metanol puro conservado a -20 °C durante 10 min, manteniendo las preparaciones en hielo este tiempo. Después de otro lavado con PBS, se permeabilizaron con una solución al 0,25% de Tritón X-100 durante 10 min. Tras esto, incubamos las preparaciones con solución de bloqueo durante 1 h y preparamos los anticuerpos primarios diluidos a las concentraciones apropiadas en la misma solución de bloqueo. Las muestras se incubaron 1 h en una cámara húmeda con la mezcla del anticuerpo primario y luego se lavaron con PBS. A continuación, se cubrieron con una preparación de anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína o rodamina (*Alexa Fluor 488 dye* y *Alexa Fluor 555 dye*, ThermoFisher Scientific), a las concentraciones recomendadas por el fabricante, en solución de bloqueo y se incubaron 35 – 45 min. Tras un nuevo lavado con PBS, se deshidrataron en etanol absoluto durante 2 min. Por último, se utilizó medio de montaje líquido (*ibidi Mounting Medium With DAPI*, ibidi), que tenía incorporado DAPI para contrateñir el ADN, y se sellaron los márgenes de las preparaciones con laca de uñas. Los cubreobjetos ya montados se conservaron a 4 °C hasta su análisis al microscopio.

Las preparaciones se observaron con un microscopio Leica DMI8 con objetivo de inmersión PlanApo 63X y las imágenes obtenidas se procesaron posteriormente con el programa informático ImageJ.

Los anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia se relacionan en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Clonicidad/especie	Casa comercial	Concentración
LAMP-1	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
LC3	Policlonal de conejo	Novus Biologicals	1:400
MRE11	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:500
NBS1	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	1:100
p62	Policlonal de conejo	Novus Biologicals	1:2.000
RAD50	Monoclonal de ratón	GeneTex	1:200

Tabla 9. Anticuerpos empleados en ensayos de inmunofluorescencia.

Solución de bloqueo: 1% BSA y 0,1% Tween 20 en PBS.

4.2. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo

Para evaluar la muerte celular por apoptosis en poblaciones de células en cultivo tras determinados tratamientos recurrimos al análisis por citometría de flujo utilizando el kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, de BD Biosciences. Este kit nos permite detectar las células apoptóticas gracias a la interacción entre la proteína anexina V y la fosfatidilserina que las células apoptóticas exponen en la cara externa de su membrana plasmática.

Para preparar los controles de marcaje, mezclamos en 3 tubos independientes 200 μ L de suspensión celular de cada una de las condiciones del ensayo. Estos junto con las demás muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 min y los precipitados celulares obtenidos se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se centrifugaron a 3.000 rpm 10 min y se resuspendieron en el volumen adecuado de tampón 1X de unión a anexina. Después, se añadieron 5 μ L de anexina V y 5 μ L de yoduro de propidio a cada una de las muestras celulares, mientras que de los 3 controles de marcaje a uno no se le añadió nada, a otro se le añadió anexina V y al último yoduro de propidio. Todas las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 15 min. Por último, se ajustó el volumen final de cada una añadiendo la cantidad adecuada de tampón 1X de unión a anexina, y se examinaron las células mediante un citómetro de flujo analítico FACSCanto II (BD Biosciences). Los resultados se analizaron mediante el software Diva.

Todos los reactivos necesarios fueron aportados por el kit. Para la realización de estos ensayos contamos con la colaboración de los Dres. Miguel Ángel Japón y Carmen Sáez, del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla).

4.3. Análisis de actividad β -galactosidasa en células senescentes

Con el fin de detectar células senescentes en cultivo tras tratamientos específicos utilizamos el kit *Senescence β -Galactosidase Staining Kit*, de Cell Signaling Technology. Con él podemos reconocer células senescentes gracias a que éstas presentan actividad enzimática β -galactosidasa lisosomal, detectable a pH 6. Así, son capaces de procesar X-gal, un sustrato análogo de la lactosa cuya hidrólisis genera un compuesto azul insoluble. Este tiñe las células que expresan esa enzima, y que son, por tanto, células senescentes.

Para realizar estos ensayos partimos de células dispuestas en cajas de 3,5 cm de diámetro (μ -Dish, Ibidi). En primer lugar, retiramos el medio de cultivo y lavamos con PBS para eliminar los restos de medio. A continuación, cubrimos las células con 1 mL de solución fijadora e incubamos durante 10 – 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, lavamos 2 veces con PBS y cubrimos con 1 mL de solución de tinción de β -galactosidasa. Sellamos las placas con parafilm para evitar la evaporación

e incubamos a 37 °C en una estufa sin CO₂, protegidas de la luz. El tiempo de incubación fue variable dependiendo de la intensidad del marcaje resultante, aunque por lo general este comenzó a observarse a partir de las 4 h de incubación. Una vez obtenido el marcaje adecuado, se analizó directamente al microscopio o se retiró la solución de tinción de β-galactosidasa y las células se conservaron a 4 °C cubiertas con glicerol al 70% hasta su análisis. Todos los reactivos necesarios fueron aportados por el kit, y las soluciones se prepararon justo antes de utilizarlas.

Las preparaciones se observaron con un microscopio Olympus BX61 con objetivo de 10X y las imágenes obtenidas se procesaron posteriormente con el programa informático ImageJ.

Solución fijadora 1X: diluir el reactivo *10X Fixative Solution* en H₂O bidestilada. Preparar la cantidad justa para agotar en el ensayo.

Solución de tinción 1X: diluir el reactivo *10X Staining Solution* en H₂O bidestilada. Preparar la cantidad justa para agotar en el ensayo.

X-gal: disolver 20 mg en 1 mL de dimetilformamida. Conservar a -20 °C protegido de la luz.

Solución de tinción de β-galactosidasa: 93% de solución de tinción 1X, 5% de X-gal 20 mg/mL, 1% del reactivo *100X solution A* y 1% del reactivo *100X solution B*. Ajustar a pH 6.

5. Cuantificación y análisis estadístico

En ciertos ensayos se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas por *Western blot* para comprobar si determinadas condiciones experimentales provocaban cambios sustanciales en los niveles de las proteínas estudiadas. Para el análisis densitométrico de las imágenes se utilizó el programa informático ImageJ y para los cálculos posteriores el paquete informático Microsoft Excel.

Para el análisis estadístico, los experimentos se realizaron al menos tres veces y los datos obtenidos se examinaron con el programa informático GraphPad Prism y el test *t de Student* de muestras desapareadas para analizar las diferencias entre dos condiciones. Estas diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor *p* inferior a 0,05.

Resultados

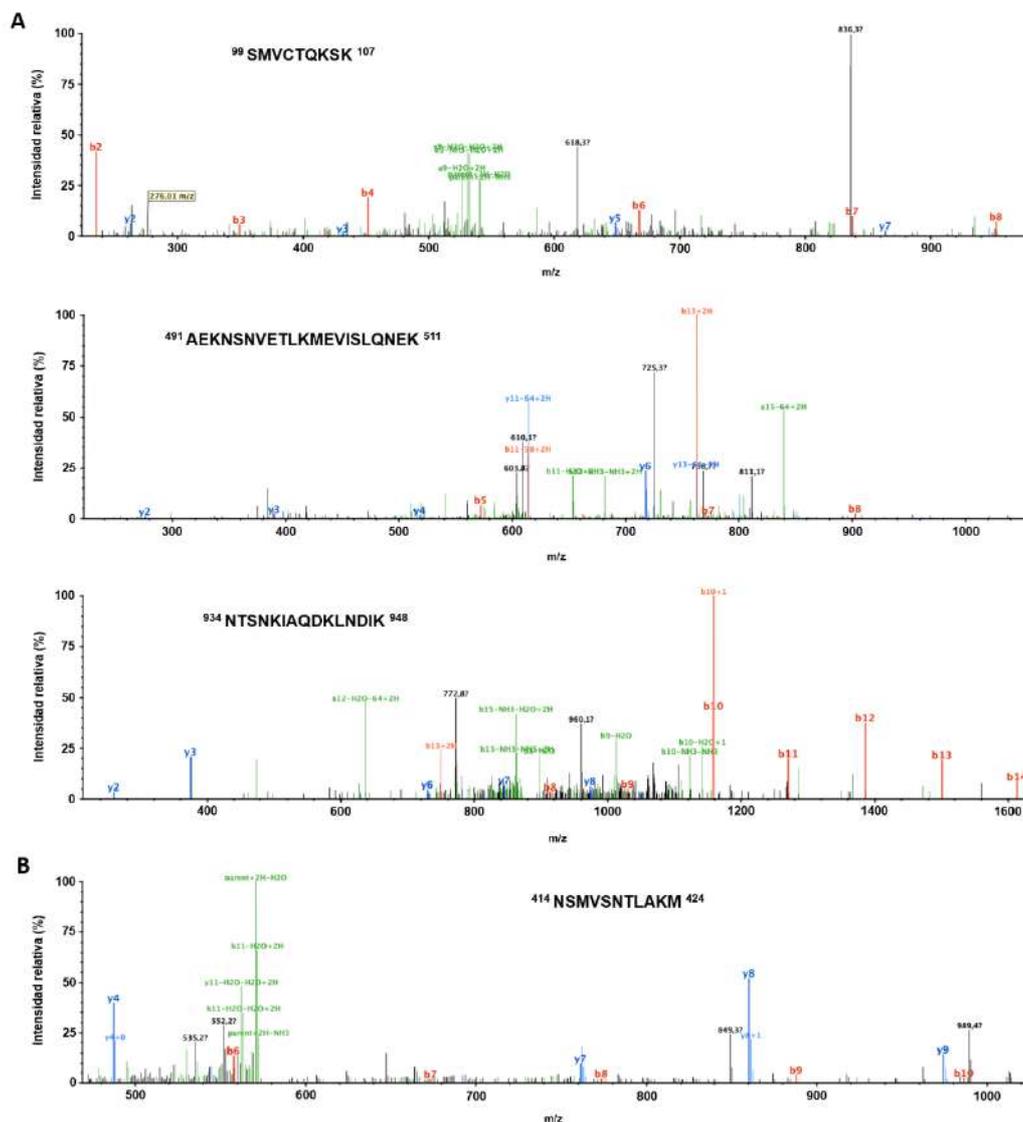


Figura 25. Identificación de péptidos únicos pertenecientes a RAD50 y NBS1 en la inmunoprecipitación de HA β TrCP mediante espectrometría de masas en tándem. En la figura se presentan los perfiles con los patrones de los fragmentos obtenidos para cada uno de los péptidos identificados, cuyas secuencias se muestran también, en el caso de RAD50 (A) y NBS1 (B).

Para confirmar estos datos preliminares, nos dispusimos a repetir las inmunoprecipitaciones previas, pero analizando la co-inmunoprecipitación de las proteínas del complejo mediante *Western-blot*. Para ello, transfectamos por electroporación células Cos-7 con pCS2HA β TrCP y pCDNA3 Flag FBXW7, por separado. Tras esperar a que las construcciones alcanzaran su máxima expresión, recogimos las células y preparamos extractos citosólicos y nucleares, según se describe en *Materiales y Métodos*. Posteriormente, inmunoprecipitamos las proteínas F-box utilizando los anticuerpos anti-HA y anti-Flag, respectivamente, y analizamos las proteínas co-inmunoprecipitadas con los anticuerpos apropiados. En la **Figura 26** se observa que la

inmunoprecipitación de HA β TrCP trae consigo a RAD50 y NBS1, como esperábamos, pero también a MRE11.

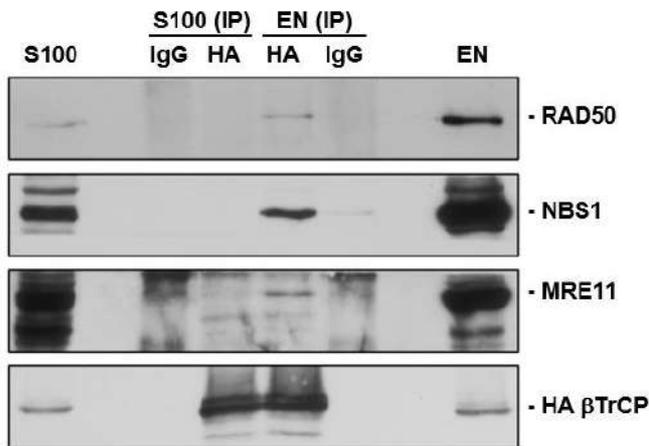


Figura 26. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con HA β TrCP en el núcleo de células de mamífero. Las células Cos-7 fueron transfectadas con pCS2HA β TrCP. Tras 18h, se prepararon extractos citosólicos (S100) y nucleares (EN) e inmunoprecipitamos HA β TrCP en ellos (IP). Como control se utilizó IgG de ratón. El resultado del ensayo se analizó por *Western-blot*. El ensayo se repitió al menos 3 veces.

De igual manera, en la **Figura 27** se aprecia que la inmunoprecipitación de Flag FBXW7 precipitó a MRE11, así como a RAD50 y a NBS1. Además, en ambos casos determinamos que estas asociaciones sólo se detectaban en la fracción nuclear de las células utilizadas.

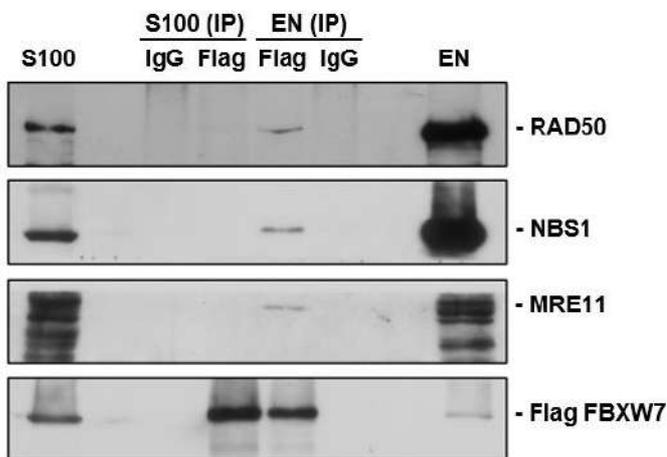


Figura 27. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con Flag FBXW7 en el núcleo de células de mamífero. El ensayo se realizó como se ha indicado en la figura anterior, pero transfectando en este caso pCDNA3 Flag FBXW7, e inmunoprecipitando Flag FBXW7. Como control se utilizó IgG de ratón. El ensayo se repitió al menos 3 veces.

Como experimentos complementarios, estudiamos las inmunoprecipitaciones inversas, es decir, inmunoprecipitamos independientemente cada una de las proteínas del complejo MRN e intentamos detectar la presencia de las proteínas F-box mediante *Western-blot*. Así, al igual que en los ensayos anteriormente descritos, electroporamos las células Cos-7 con pCS2HA β TrCP y pCDNA3 Flag FBXW7, preparamos extractos citosólicos y nucleares, y empleamos únicamente los nucleares para las inmunoprecipitaciones, de acuerdo con los resultados previamente obtenidos. En la **Figura 28** se muestra que las inmunoprecipitaciones independientes de cada una de

las proteínas del complejo MRN no solo precipitan el resto de las proteínas del complejo, sino también a HA β TrCP.

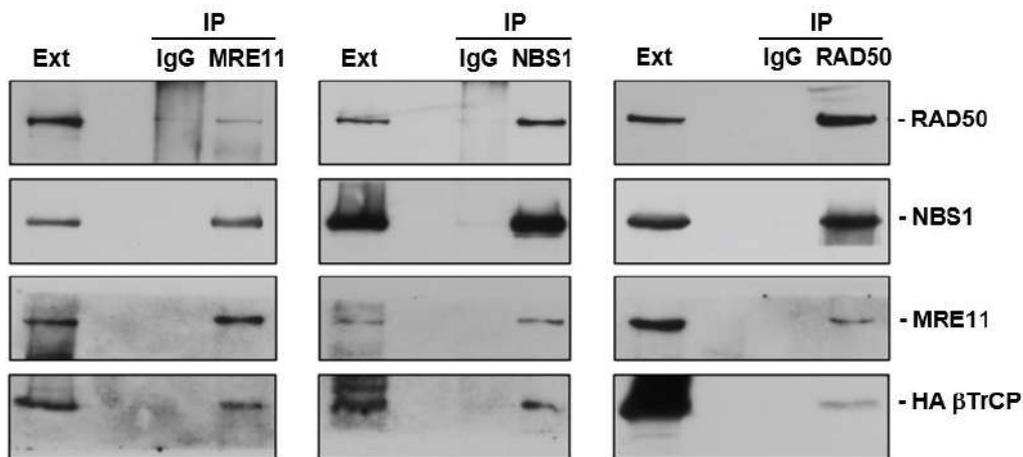


Figura 28. La inmunoprecipitación de las proteínas del complejo MRN trae consigo a HA β TrCP. Las células Cos-7 fueron transfectadas con pCS2HA β TrCP. Tras el fraccionamiento, inmunoprecipitamos MRE11, NBS1 y RAD50 en los extractos nucleares en ensayos independientes. Como control se utilizó IgG de conejo. Los resultados se analizaron por *Western-blot*. Los ensayos se repitieron al menos 3 veces. Ext: muestra del extracto nuclear empleado para la IP.

Del mismo modo, en la **Figura 29** se observa que Flag FBXW7 viene co-inmunoprecipitado en las inmunoprecipitaciones de MRE11, NBS1 y RAD50. Todo ello demuestra que las versiones transfectadas de β TrCP y FBXW7 se asocian *in vivo* a las proteínas endógenas del complejo MRN.

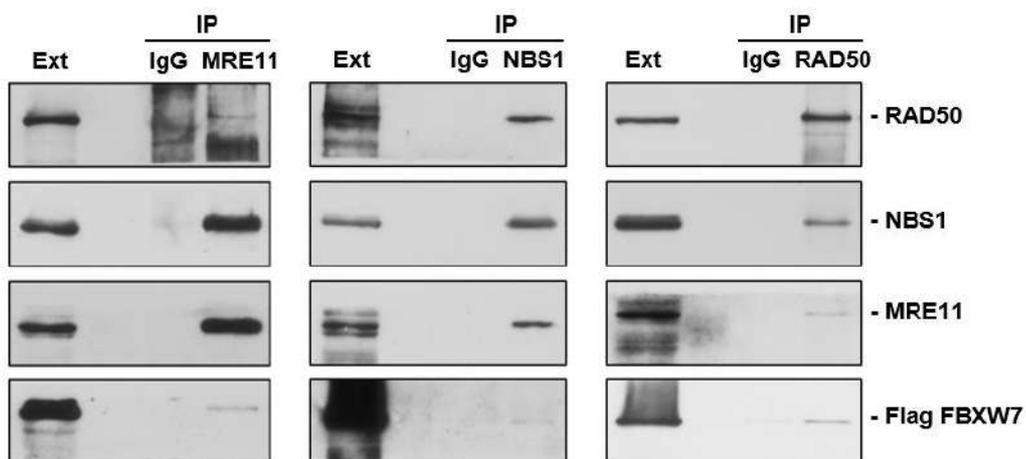


Figura 29. La inmunoprecipitación de las proteínas del complejo MRN trae consigo a Flag FBXW7. Los ensayos se realizaron como se ha indicado en la figura anterior, pero transfectando en este caso pCDNA3 Flag FBXW7. Los ensayos se repitieron al menos 3 veces. Ext: muestra del extracto nuclear empleado para la IP.

Para comprobar si esas interacciones ocurrían también con las proteínas F-box endógenas buscamos anticuerpos comerciales a tal efecto. Sin embargo, ninguno de ellos era suficientemente sensible para detectar β TrCP o FBXW7 en *Western-blot*, al menos en nuestras condiciones y/o modelos celulares. No obstante, sí encontramos uno para cada proteína F-box que inmunoprecipitaba apropiadamente. Por tanto, en esta ocasión, preparamos extractos celulares NP-40 que nos permitieran confirmar las inmunoprecipitaciones de las proteínas F-box con sustratos conocidos no necesariamente nucleares. Las inmunoprecipitaciones con anti- β TrCP y anti-FBXW7 α nos permitieron detectar las tres proteínas del complejo MRN en cada caso (**Figuras 30** y **31** respectivamente). Como controles de las inmunoprecipitaciones usamos β -catenina para β TrCP (Hart *et al*, 1999), y PLK1 para FBXW7 (Giráldez *et al*, 2014).

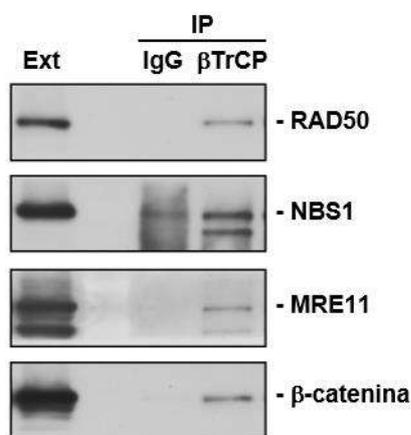


Figura 30. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con la forma endógena de β TrCP. Los extractos celulares NP-40 obtenidos de células Cos-7 fueron utilizados para inmunoprecipitar la proteína β TrCP endógena. Como control se usó IgG de conejo. El resultado del ensayo se analizó por *Western-blot*. El ensayo se repitió al menos 3 veces. Ext: muestra del extracto celular NP-40 empleado para la IP.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que existe una interacción *in vivo* entre las proteínas del complejo MRN y las proteínas F-box β TrCP y FBXW7. Además, esta asociación tiene lugar en la fracción nuclear de la célula. Como MRN constituye un complejo proteico que funciona como tal, no podemos afirmar si la asociación con las proteínas F-box se debe a una proteína concreta del complejo, a dos o a las tres, porque en las inmunoprecipitaciones es muy probable que se precipite el complejo completo. No obstante, sí se demuestra que son interacciones que ocurren naturalmente en las células.

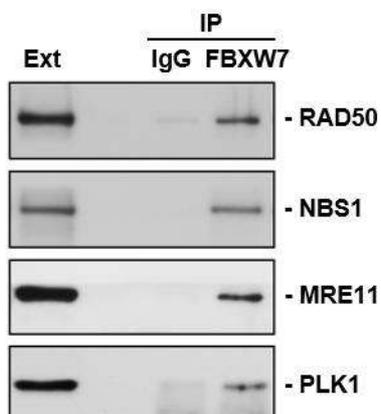


Figura 31. Las proteínas del complejo MRN co-inmunoprecipitan con la forma endógena de FBXW7. El ensayo se realizó como se ha indicado en la figura anterior, pero inmunoprecipitando la proteína FBXW7 endógena. Como control se usó IgG de conejo. El ensayo se repitió al menos 3 veces. Ext: muestra del extracto celular NP-40 empleado para la IP.

1.2. SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7) ubiquitilan proteínas del complejo MRN tanto *in vitro* como *in vivo*.

La siguiente cuestión que teníamos que abordar consistía en averiguar si las proteínas del complejo MRN eran sustratos de las ligasas de ubiquitina SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7), ya que, en ocasiones, el que una proteína se asocie a una ligasa no implica necesariamente que se ubiquitile. Así, por ejemplo, podría modular la actividad o localización de la ligasa (Lan *et al*, 2019; Welcker *et al*, 2011; Davis *et al*, 2002), o servir de puente para la ubiquitilación de otros sustratos (Margottin *et al*, 1998). Por tanto, realizamos ensayos de ubiquitilación *in vitro* e *in vivo*.

Para los ensayos *in vitro*, en primer lugar, empleamos un kit de transcripción/traducción en extractos de reticulocitos usando ADN de los plásmidos pCMV6 MRE11 MycFlag, pCMVHA RAD50 y pCMVHA NBS1 como fuentes de los correspondientes ADNc. Una vez obtenidas las proteínas marcadas con ^{35}S (Met+Cys ^{35}S), para el ensayo de ubiquitilación *in vitro* añadimos las enzimas E1 y E2, ubiquitina y los complejos proteicos completos de cada una de las ligasas producidos en células de insecto. En la **Figura 32** se observa que SCF(β TrCP) fue capaz de ubiquitilar eficientemente a las 3 proteínas del complejo MRN comparando las bandas (o sombreado) de alto peso molecular que aparecen en presencia de la ligasa respecto a los controles sin ligasa o sin E1+E2+Ub.

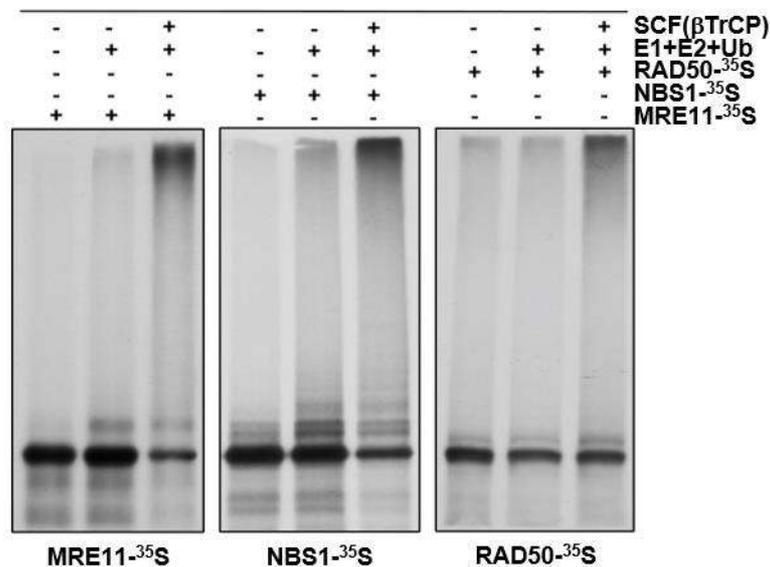


Figura 32. SCF(β TrCP) ubiquitila *in vitro* a los componentes del complejo MRN. Para los ensayos de ubiquitilación *in vitro*, utilizamos las proteínas del complejo MRN marcadas con ^{35}S (Met+Cys ^{35}S), la enzima E1, las enzimas E2-UbcH3 y E2-UbcH5a y ubiquitina (Ub), así como el complejo SCF(β TrCP) recombinante. Las mezclas se incubaron a 30°C durante 1h y se migraron en geles de poliacrilamida-SDS. En las películas radiográficas, la ubiquitilación se observa a modo de bandas y/o sombreado en regiones de alto peso molecular por encima de la banda correspondiente a cada una de las proteínas del complejo MRN. Los ensayos se realizaron por triplicado.

En cambio, en la **Figura 33** observamos que SCF(FBXW7) sólo fue capaz de ubiquitilar *in vitro* a MRE11, dado que únicamente en este ensayo se muestran bandas o sombreado adicionales respecto a los controles.

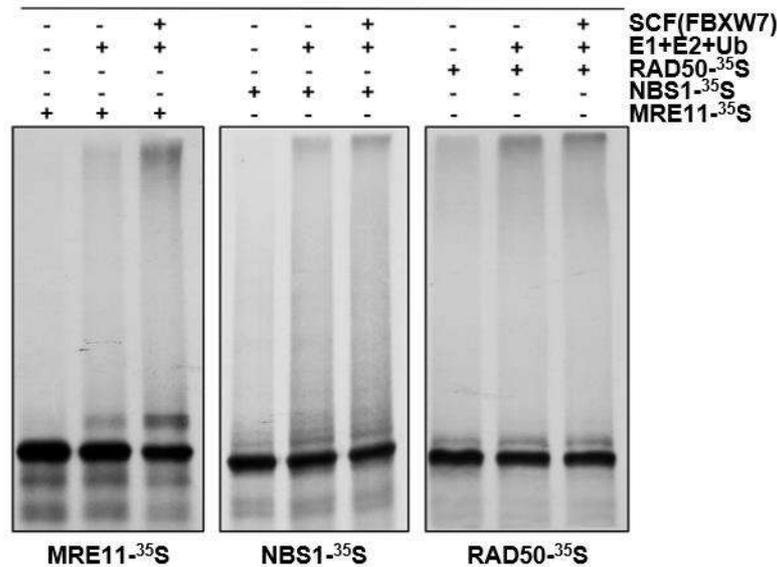


Figura 33. SCF(FBXW7) ubiquitila *in vitro* a MRE11. Los ensayos se realizaron como se ha indicado en la figura anterior, utilizando en esta ocasión el complejo recombinante SCF(FBXW7). Los ensayos se realizaron por triplicado.

A continuación, analizamos si las ligasas de ubiquitina de nuestro estudio eran también capaces de ubiquitilar a las proteínas del complejo MRN *in vivo*. Para realizar estos ensayos, transfectamos células HEK293T en dos pasos sucesivos. En el primer paso transfectamos con el plásmido que codificaba cada proteína y pRBG4 Myc Ub. Mezclamos las células para garantizar que era un conjunto homogéneo y lo dividimos en dos para que cada uno fuera transfectado, en el segundo paso, con el plásmido que codifica la proteína F-box o únicamente el vector. Posteriormente, se prepararon extractos bajo fuertes condiciones desnaturalizantes e inmunoprecipitamos la proteína correspondiente del complejo MRN utilizando los anticuerpos anti-HA o anti-Flag, según el caso. Las inmunoprecipitaciones se analizaron mediante *Western-blot*, estudiando la presencia de poliubiquitilaciones con un anticuerpo anti-ubiquitina K48, que detecta cadenas de ubiquitinas unidas entre sí a través de la lisina 48 de las ubiquitinas, la más comúnmente estudiada en el ámbito de la estabilidad de las proteínas. Así, observamos que SCF(β TrCP) no fue capaz de poliubiquitilar las proteínas del complejo *in vivo* (resultados no mostrados), mientras que SCF(FBXW7) poliubiquitiló a las tres proteínas (**Figura 34**).

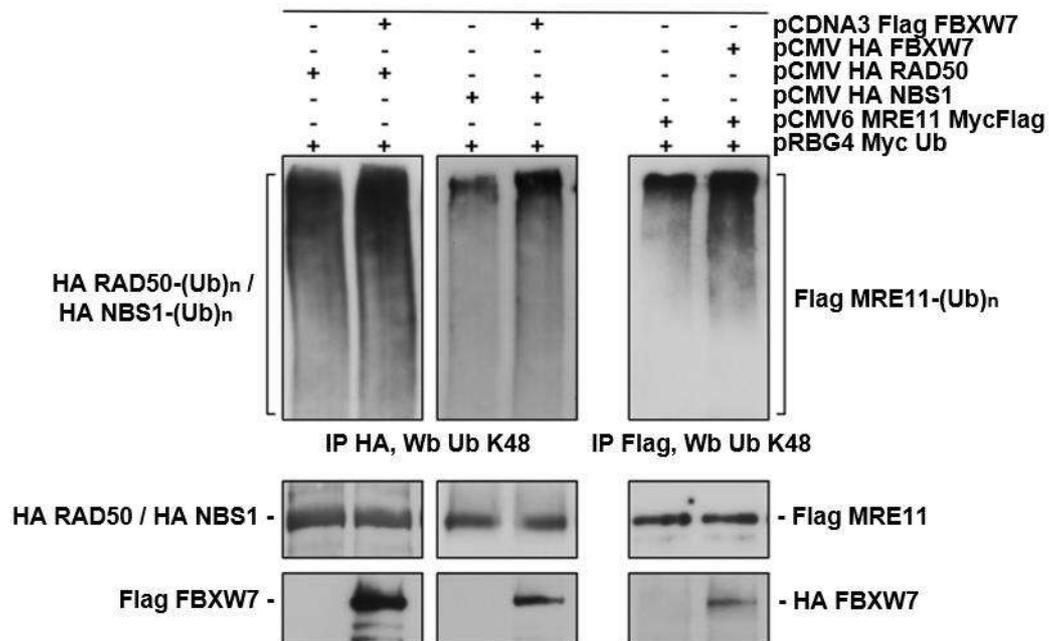


Figura 34. Los componentes del complejo MRN son ubiquitilados *in vivo* por SCF(FBXW7) mediante ubiquitinas unidas a través de la lisina 48. Las células HEK293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados. Tras preparar los extractos apropiados, según se describe en *Materiales y Métodos*, inmunoprecipitamos las proteínas del complejo MRN, y estudiamos las posibles poliubiquitilaciones de tipo K48 mediante *Western-blot*. Los corchetes señalan las formas poliubiquitiladas de alto peso molecular. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Como SCF(FBXW7) solo poliubiquitila *in vitro* a MRE11 e *in vivo* a las tres, podríamos pensar que MRE11 fuera el punto de unión de FBXW7 al complejo, y una vez unido SCF(FBXW7) poliubiquitilara también a RAD50 y NBS1; *in vitro* no podría hacerlo probablemente por carecer de suficiente MRE11 en el extracto de reticulocitos. En lo que se refiere a SCF(β TrCP), los resultados no descartan que pudiera ubiquitilar *in vivo* a las proteínas del complejo, pero no sería a través de uniones lisina 48. Por tanto, se requieren más estudios para comprobar estas hipótesis.

1.3. Búsqueda de motivos consenso de interacción con β TrCP y FBXW7 en el complejo MRN.

Para profundizar en el estudio de la asociación entre las proteínas F-box y las del complejo MRN, nos decidimos a buscar potenciales motivos de unión a β TrCP y FBXW7 en las proteínas del complejo. Realizamos un análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de MRE11, RAD50 y NBS1 usando la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin de localizar motivos que se asemejaran a los sitios de interacción descritos en la literatura. En todo caso, había que tener presente que no siempre esos motivos

consenso se encuentran en todos los sustratos conocidos de SCF(β TrCP) o SCF(FBXW7) (Wang *et al*, 2014c; Yumimoto & Nakayama, 2020).

El motivo consenso de unión a β TrCP generalmente aceptado es: D-S-G-X₂₋₃-S, siendo X cualquier aminoácido. Sobre este motivo se han aceptado algunas variantes (Wang *et al*, 2014c):

- Ácido glutámico (E), en lugar de ácido aspártico (D), en la primera posición.
- Treonina (T), en lugar de serina (S), en las posiciones segunda y última.
- Alanina (A), en lugar de glicina (G), en la posición tercera.
- En ocasiones, también son válidos aminoácidos ácidos (fosfomiméticos) en lugar de serinas o treoninas fosforiladas.

Estas combinaciones y variantes, que lo alejan en mayor o menor medida de la secuencia estándar, dificultan su identificación. Asimismo, se han documentado sustratos de SCF(β TrCP) en los que no ha sido posible determinar la secuencia del debrón (Wang *et al*, 2014c).

Con este planteamiento logramos seleccionar un motivo potencial en cada una de las 3 proteínas del complejo MRN (ver **Tabla 10**).

Proteína	Motivo identificado	Primeros mutantes		Segundos mutantes	
		Nombre	Nuevo motivo	Nombre	Nuevo motivo
MRE11	⁵⁹⁶ DTGLETST ⁶⁰³	T597A	⁵⁹⁶ DAGLETST ⁶⁰³	MRE11 $\Delta\beta$ T	⁵⁹⁶ DAGLGAAA ⁶⁰³
RAD50	⁷⁸³ ESAKVCLT ⁷⁹⁰	S784G	⁷⁸³ EGAKVCLT ⁷⁹⁰	RAD50 $\Delta\beta$ T	⁷⁸³ EGAKVCLA ⁷⁹⁰
NBS1	²⁷² DTGITNS ²⁷⁸	T273A	²⁷² DAGITNS ²⁷⁸	NBS1 $\Delta\beta$ T	²⁷² DAGIANA ²⁷⁸

Tabla 10. Motivos de unión a β TrCP identificados y mutados en los componentes del complejo MRN. En los motivos identificados se han incluido y mutado algunos aminoácidos cercanos por si su proximidad pudiera permitir la interacción tras el cambio de los aminoácidos del propio motivo. En negrita se destacan los aminoácidos cambiados.

Mediante mutagénesis dirigida, generamos versiones mutantes de las 3 proteínas cambiando la primera serina o treonina del motivo por alanina o glicina. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación. Para conocer cómo afectaban *in vivo* esas mutaciones a la asociación con β TrCP, estudiamos si se perdía, o como mínimo disminuía, la co-inmunoprecipitación entre los mutantes y la proteína F-box. Transfectamos las células Cos-7 con los plásmidos que codificaban las versiones silvestre y mutante de cada proteína del complejo MRN, respectivamente. Tras recoger las células y preparar extractos NP-40, inmunoprecipitamos β TrCP endógena y analizamos las co-inmunoprecipitaciones mediante *Western-blot*. Desafortunadamente, ninguna de las proteínas mutadas perdía la interacción con β TrCP, así que decidimos generar nuevos mutantes a partir de los anteriores

cambiando la segunda serina o treonina (o aminoácido ácido) igualmente a alanina o glicina. Además, los nuevos mutantes incluían mutaciones en otros aminoácidos potencialmente fosforilables o ácidos localizados próximos al motivo. En la **Tabla 10** se recogen todos esos cambios en las secuencias de aminoácidos de MRE11, RAD50 y NBS1. Una vez confirmados los nuevos cambios, repetimos los ensayos de transfección e inmunoprecipitación como se ha descrito anteriormente. En esta ocasión, tampoco obtuvimos pérdida de interacción con los mutantes RAD50 $\Delta\beta T$ y NBS1 $\Delta\beta T$, pero sí con el mutante MRE11 $\Delta\beta T$.

Como se observa en la **Figura 35**, al inmunoprecipitar $\beta TrCP$ en las células transfectadas con pCMV6 MRE11 MycFlag vienen asociadas todas las proteínas del complejo MRN. Sin embargo, en las células transfectadas con pCMV6 MRE11 $\Delta\beta T$ MycFlag no se observa co-inmunoprecipitación de MRE11 $\Delta\beta T$, disminuyendo también la asociación de RAD50 y NBS1. Como control de la inmunoprecipitación utilizamos PLK1 (Giráldez *et al*, 2017). Esto nos indica que existe una interacción directa entre MRE11 y $\beta TrCP$ a través del motivo identificado. No obstante, el hecho de que SCF($\beta TrCP$) ubiquitile *in vitro* a las 3 proteínas del complejo sugiere que NBS1 y RAD50 también poseen sitios de interacción que no hemos localizado.

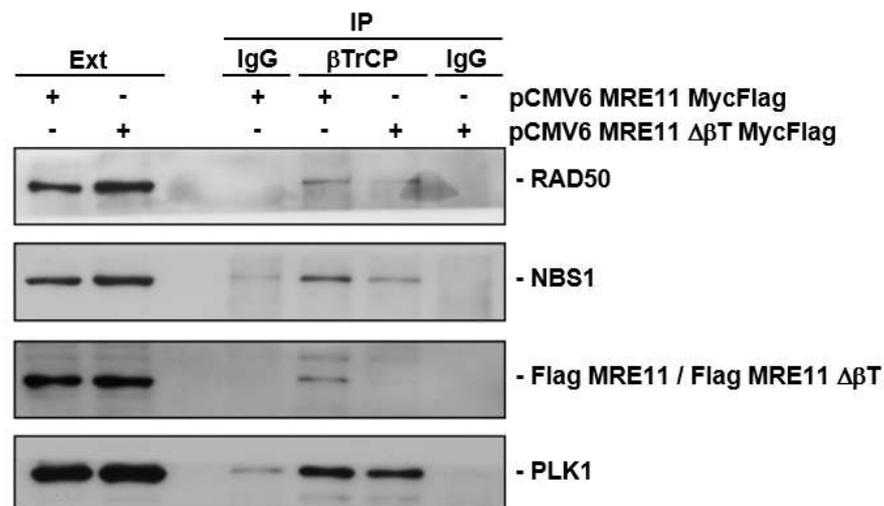


Figura 35. El mutante MRE11 $\Delta\beta T$ pierde la asociación con $\beta TrCP$. Las células Cos-7 fueron transfectadas con los plásmidos indicados. Tras preparar los extractos, inmunoprecipitamos $\beta TrCP$ y analizamos por *Western-blot* la asociación o pérdida de ella con las formas silvestre y mutante de MRE11. Como control se utilizó IgG de conejo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Ext: muestras de los extractos celulares empleados para las IPs.

Respecto a FBXW7, el motivo consenso establecido es: ϕ -X- ϕ - ϕ - ϕ -S/T-P-P-X-S/T, siendo X cualquier aminoácido y ϕ un aminoácido hidrofóbico. Sobre este esquema se pueden aceptar variantes:

- Un aminoácido cualquiera en lugar de la segunda prolina (P).
- Aminoácidos ácidos (fosfomiméticos) en lugar de serinas o treoninas fosforiladas.

Como ocurría anteriormente con la secuencia del fosfodegrón de β TrCP, hay que tener en cuenta que el motivo de interacción puede variar más aún respecto a esta secuencia consenso. Incluso, puede que algunos sustratos carezcan de secuencias que se asemejen a la misma (Yumimoto & Nakayama, 2020).

Con estas indicaciones, en la secuencia de MRE11 no encontramos ningún motivo que se pareciera al consenso, mientras que en RAD50 y NBS1 pudimos seleccionar un motivo en cada proteína (ver **Tabla 11**).

Proteína	Motivo identificado	Primeros mutantes		Segundos mutantes	
		Nombre	Nuevo motivo	Nombre	Nuevo motivo
RAD50	⁹¹² VSPLETT ⁹¹⁸	S913G	⁹¹² VGPLETT ⁹¹⁸	RAD50 ΔFB	⁹¹² VGPLGAA ⁹¹⁸
NBS1	³³⁷ TPGPSLS ³⁴³	T337A	³³⁷ APGPSLS ³⁴³	NBS1 ΔFB	³³⁷ APGPGLA ³⁴³
		S343A	³³⁷ TPGPSLA ³⁴³		

Tabla 11. Motivos de unión a FBXW7 identificados y mutados en los componentes del complejo MRN. En los motivos identificados se han incluido y mutado algunos aminoácidos cercanos por si su proximidad pudiera permitir la interacción tras el cambio de los aminoácidos del propio motivo. En negrita se destacan los aminoácidos cambiados.

Siguiendo el proceso anteriormente descrito, generamos por mutagénesis puntual versiones de estas dos proteínas con cambios en la primera serina o treonina del consenso. Además, en el caso de NBS1, generamos otro mutante en la serina 343, que está localizada junto al potencial CPD y es diana de la quinasa ATM (Lim *et al*, 2000; Gatei *et al*, 2000). Tras confirmar por secuenciación los cambios incorporados, repetimos el proceso anterior para averiguar si se perdía la co-inmunoprecipitación entre la proteína F-box y los mutantes generados. Por desgracia, las proteínas mutadas no perdieron la interacción con FBXW7, así que generamos nuevos mutantes a partir de los previos. En el caso de NBS1, el nuevo mutante englobaba las dos mutaciones construidas anteriormente, e incluía la mutación de una serina adicional. En la **Tabla 11** se recogen todos estos cambios en las secuencias de aminoácidos tanto de RAD50 como de NBS1.

Repetimos los ensayos de transfección y de inmunoprecipitación de la ligasa endógena, pero estos no aportaron resultados claros. El hecho de que no se hayan obtenido resultados positivos con ninguna de las proteínas sugiere que deben existir otros motivos no consenso responsables de la interacción.

1.4. Estudio de las potenciales quinasas implicadas en la asociación proteína F-box/sustrato.

Como señalamos anteriormente, para que las proteínas F-box reconozcan a sus sustratos suele ser necesario que el degrón experimente ciertas modificaciones post-traduccionales. Entre estas modificaciones destaca la fosforilación de residuos específicos del propio degrón, denominado entonces fosfodegrón (Skaar *et al*, 2013). Por ello, para seguir con la caracterización de las interacciones detectadas, quisimos estudiar qué quinasa mediaba en las asociaciones. Dado que la asociación entre β TrCP y FBXW7 y el complejo MRN se detectó en células cultivadas en condiciones normales de crecimiento, se podía pensar que la quinasa que mediara esta asociación debía ser una quinasa que actuara en condiciones basales, lo que restringía las posibilidades, sin descartar que otras quinasas pudieran intervenir en otras condiciones. En primer lugar, decidimos estudiar la posible implicación de GSK3, quinasa que clásicamente fosforila sustratos que van a ser reconocidos y poliubiquitilados por SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7) (Robertson *et al*, 2018; Heo *et al*, 2016).

Para estudiar el potencial papel de GSK3 en la asociación β TrCP/MRN, utilizamos CHIR-99021, compuesto que activa la vía WNT/ β -catenina inhibiendo a GSK3 (Galindo-Moreno *et al*, 2019). Electroporamos células Cos-7 con pCS2 HA β TrCP y las cultivamos posteriormente en presencia y ausencia de CHIR-99021. Inmunoprecipitamos la proteína F-box sobreexpresada y observamos que en las células cultivadas en condiciones control co-inmunoprecipitaban las 3 proteínas del complejo MRN, mientras que en aquellas tratadas con CHIR-99021 la interacción se reducía notablemente (**Figura 36**). Como control del experimento utilizamos β -catenina, cuya interacción con β TrCP depende de GSK3 (Hart *et al*, 1999), por lo que también se redujo con el tratamiento. También utilizamos WEE1, en este caso como control negativo, ya que su interacción con β TrCP depende de otras quinasas (Watanabe *et al*, 2004, 2005). Confirmamos así que el tratamiento con CHIR-99021 no afectaba a su asociación con la proteína F-box.

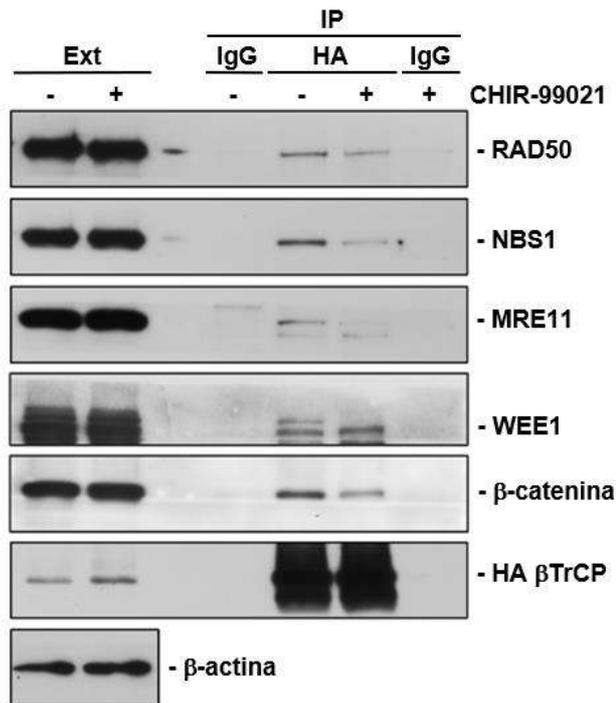


Figura 36. El tratamiento con CHIR-99021, inhibidor de la quinasa GSK3, reduce la asociación entre las proteínas del complejo MRN y HA βTrCP. Las células Cos-7 fueron transfectadas con pCS2 HA βTrCP, y parte de ellas tratadas con CHIR-99021 durante 24h. Tras inmunoprecipitar HA βTrCP, analizamos la asociación al complejo MRN mediante *Western-blot*. Como control se usó IgG de ratón. El ensayo se realizó por duplicado. Ext: muestras de los extractos celulares empleados para las IPs.

En segundo lugar, estudiamos CK2, quinasa que participa en procesos biológicos fundamentales como la regulación del ciclo celular, la apoptosis o la respuesta a daños en el ADN, entre otros. Generalmente, se considera que esta quinasa actúa de manera constitutiva, aunque también existen evidencias de que la fosforilación de determinados sustratos está regulada de diversas formas (Roffey & Litchfield, 2021). Dado que CK2 participa en la fosforilación de algunos de los sustratos de SCF(βTrCP) (Watanabe *et al*, 2005), quisimos estudiar su posible implicación en la interacción de esta ligasa de ubiquitina con el complejo MRN. Con este fin, utilizamos TBB, un inhibidor de CK2 de gran especificidad (Watanabe *et al*, 2005). Seguimos el mismo procedimiento del ensayo anterior, cultivando en este caso las células electroporadas en presencia y ausencia de TBB. Sin embargo, tras inmunoprecipitar la proteína F-box, comprobamos que no había diferencia en la interacción βTrCP/MRN entre las células control y las tratadas con el inhibidor de CK2 (resultados no mostrados), descartando así que esta quinasa pudiera tener un papel en la asociación en nuestras condiciones.

Por último, estudiamos la implicación de la quinasa p70S6K. Se ha publicado que esta quinasa fosforila a MRE11 en la treonina 597 (Piscitello *et al*, 2018), residuo que se encuentra en el fosfodegrón que hemos identificado para βTrCP. Por ello, pensamos que p70S6K podría intervenir en la asociación entre βTrCP y MRN, a través de la fosforilación de MRE11. Para comprobar esta hipótesis, utilizamos PF-4708671, un inhibidor de p70S6K (Piscitello *et al*, 2018). Transfectamos por electroporación células Cos-7 con pCS2 HA βTrCP y las cultivamos en presencia y ausencia de PF-4708671. Igual que antes, inmunoprecipitamos HA βTrCP y observamos que la co-inmunoprecipitación de MRN fue ligeramente inferior tras el tratamiento con PF-

4708671 respecto a la condición sin tratar (**Figura 37**). Como control de la actividad del compuesto, utilizamos la forma fosforilada e inactiva de la quinasa (p-p70S6K). En conjunto, estos resultados sugieren que al menos las quinasas GSK3 y p70S6K tendrían un papel en la asociación de β TrCP con el complejo MRN.

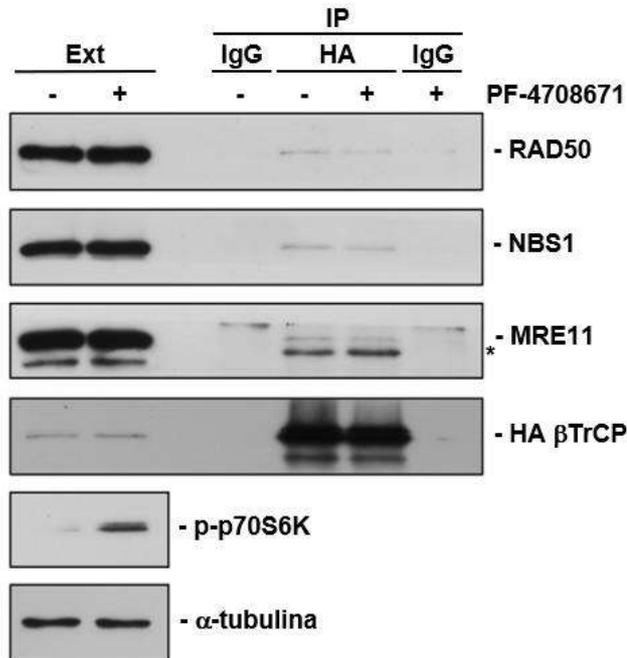


Figura 37. El tratamiento con PF-4708671, inhibidor de la quinasa p70S6K, afecta a la asociación entre las proteínas del complejo MRN y HA β TrCP. El ensayo se realizó como se ha indicado en la figura anterior, pero tratando en este caso las células con PF-4708671 durante 24h. El ensayo se realizó por duplicado. Ext: muestras de los extractos celulares empleados para las IPs. *: banda inespecífica.

Respecto a la asociación FBXW7/MRN, volvimos a poner el foco sobre GSK3. Electroporamos células Cos-7 con pCDNA3 Flag FBXW7 y, al igual que en los ensayos anteriores, las cultivamos en presencia y ausencia de CHIR-99021. Inmunoprecipitamos Flag FBXW7 y observamos la co-inmunoprecipitación de las 3 proteínas del complejo en condiciones control, y una disminución de todas ellas tras el tratamiento con CHIR-99021 (**Figura 38**). Este resultado sugiere una implicación de GSK3 también en la asociación de FBXW7 con el complejo MRN.

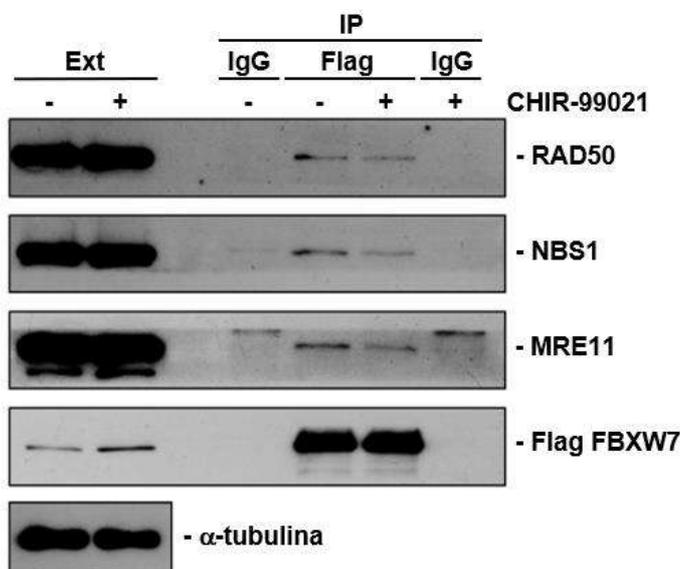


Figura 38. El tratamiento con CHIR-99021 reduce la asociación entre las proteínas del complejo MRN y Flag FBXW7. En esta ocasión, las células Cos-7 fueron transfectadas con pCDNA3 Flag FBXW7, y tratadas con CHIR-99021 durante 24h. La inmunoprecipitación de Flag FBXW7 fue analizada por *Western-blot*. Como control se usó IgG de ratón. El ensayo se realizó por duplicado. Ext: muestras de los extractos celulares empleados para las IPs.

Finalmente, estudiamos el efecto de la inhibición de CK2 sobre la asociación del complejo MRN con FBXW7, ya que se ha publicado que interviene en la fosforilación de otros sustratos de esta proteína F-box (Chen *et al*, 2011). Sin embargo, en este caso el tratamiento con TBB tampoco alteró la asociación entre FBXW7 y las 3 proteínas del complejo (resultados no mostrados). Por tanto, de acuerdo con los ensayos realizados, consideramos a GSK3 como quinasa responsable de la interacción FBXW7/MRN.

2. Función de la asociación de las proteínas F-box con el complejo MRN.

En este segundo bloque de resultados, nos vamos a centrar en analizar el papel que cumple la interacción entre las proteínas F-box de nuestro estudio y MRN, exponiendo por separado los resultados obtenidos para β TrCP y para FBXW7.

2.1. Papel de la asociación entre SCF(β TrCP) y el complejo MRN.

Para intentar clarificar el papel de β TrCP respecto al complejo MRN, en primer lugar, estudiamos la posible poliubiquitilación *in vivo* del mismo, en este caso mediada por ubiquitinas unidas a través de K63, ya que previamente comprobamos que no se detectaban poliubiquitilaciones de tipo K48. Para realizar estos ensayos, seguimos la misma metodología anteriormente descrita. Tras preparar los extractos, inmunoprecipitamos la proteína correspondiente del complejo MRN y analizamos mediante *Western-blot* la presencia de poliubiquitilaciones con un anticuerpo anti-ubiquitina K63. Así, observamos que SCF(β TrCP) fue capaz de poliubiquitilar a MRE11, pero no a RAD50 ni NBS1 (**Figura 39**).

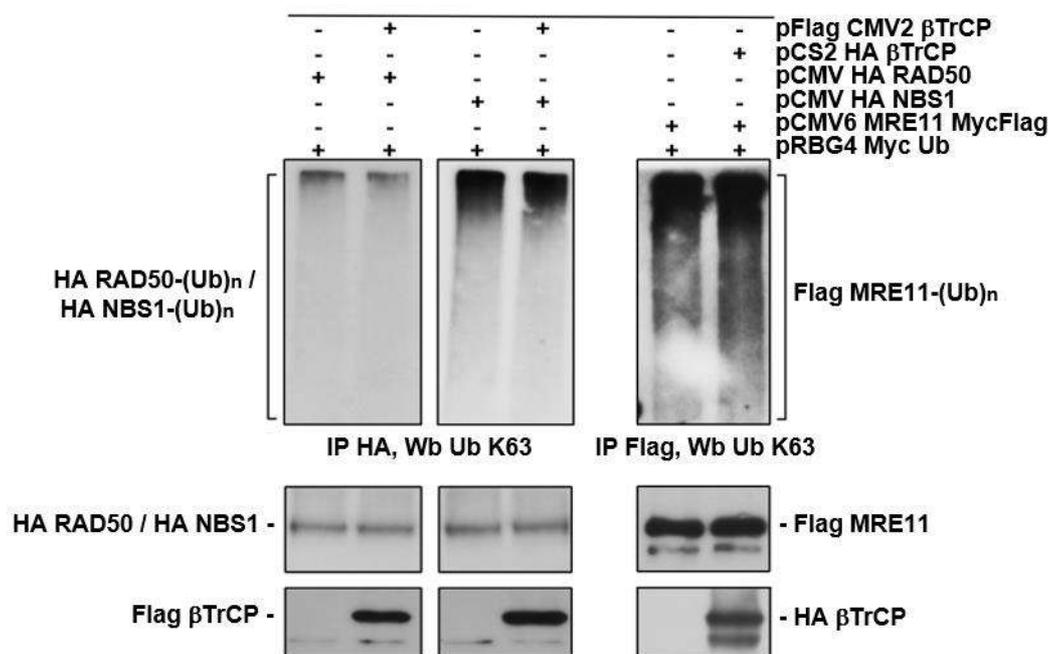


Figura 39. MRE11 es ubiquitilado *in vivo* por SCF(β TrCP) mediante ubiquitinas unidas a través de la lisina 63. Los ensayos se realizaron como se ha indicado en apartados previos. Los corchetes señalan las formas poliubiquitiladas de alto peso molecular, con uniones ubiquitina-ubiquitina a través de K63. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Como se ha indicado en la *Introducción*, las cadenas de ubiquitina que presentan enlaces de tipo K63 suelen estar implicadas en procesos de señalización, modificando la localización de proteínas específicas o interviniendo en rutas de reparación de daños

en el ADN, entre otras (Pickart & Fushman, 2004; Haglund & Dikic, 2005). Dado que el complejo MRN actúa como sensor de daños en el ADN, decidimos averiguar cómo afectaba a los niveles de dicho complejo el daño en el ADN producido por cisplatino, agente genotóxico de amplio uso en quimioterapia. Cultivamos células U2OS en presencia de 10 μ M de cisplatino (Yu *et al*, 2016) durante 12, 24 y 48 h, observando que, en estas condiciones, no había cambios sustanciales en los niveles de las proteínas del complejo (**Figura 40A**). Igualmente, cultivamos con cisplatino las células U2OS::HA β TrCP, que sobreexpresaban constitutivamente HA β TrCP, y tampoco se detectaron cambios de relevancia en los niveles de MRN (**Figura 40B**). Estos resultados unidos a la poliubiquitilación *in vivo* de MRE11 mediada por ubiquitinas enlazadas a través de la lisina 63 anteriormente descrita, nos llevaron a pensar que, quizá, la poliubiquitilación mediada por β TrCP tendría un papel en la localización del complejo MRN.

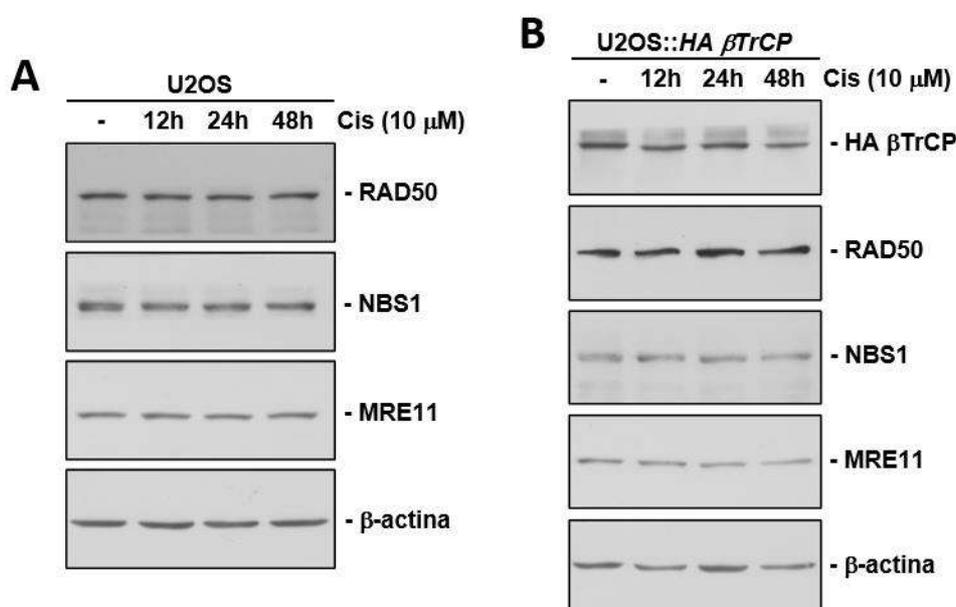


Figura 40. El tratamiento con 10 μ M de cisplatino no altera los niveles del complejo MRN, independientemente de la sobreexpresión de HA β TrCP. (A) Las células U2OS fueron tratadas con cisplatino a la dosis y tiempos indicados. Se prepararon extractos totales y analizamos mediante *Western-blot* la evolución de las proteínas del complejo MRN. (B) Como en el apartado A, pero utilizando la línea celular U2OS::HA β TrCP para comprobar si la sobreexpresión de la proteína F-box afectaba a la estabilidad del complejo en esas condiciones. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para averiguarlo, preparamos extractos cromatínicos según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos* a partir de las células U2OS y U2OS::HA β TrCP. Como control de especificidad, utilizamos la línea U2OS::HA *FBXW7*, que sobreexpresa HA *FBXW7* constitutivamente. Analizamos si la distribución de las 3 proteínas del complejo MRN variaba entre las fracciones cromatínicas y solubles con la sobreexpresión de alguno de los genes que codificaban las proteínas F-box. La **Figura 41** muestra que la sobreexpresión de HA β TrCP provocó un incremento de la localización del complejo en

la cromatina, siendo específico de esta proteína F-box, ya que no ocurrió con la sobreexpresión de *HA FBXW7*. Sea por el incremento de MRN en la cromatina o por la acción directa de *HA βTrCP*, también observamos un incremento de CtIP en la cromatina, otra proteína implicada en la cascada de reparación de daños en el ADN.

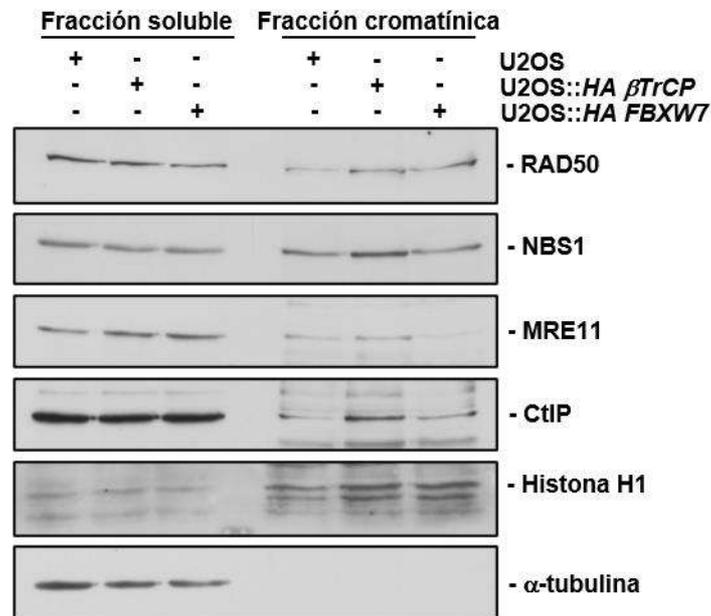


Figura 41. La sobreexpresión de *HA βTrCP* favorece la localización en la cromatina del complejo MRN. A partir de cultivos de las líneas U2OS, U2OS::*HA βTrCP* y U2OS::*HA FBXW7* en condiciones normales de crecimiento se prepararon extractos cromatínicos y se estudió mediante *Western-blot* la distribución de las proteínas indicadas. Como marcadores de pureza de las fracciones obtenidas, y también a modo de control de carga, utilizamos las proteínas Histona H1 para la fracción cromatínica, y α-tubulina para la fracción soluble. El ensayo se realizó por triplicado.

Este resultado fue confirmado utilizando la línea celular U2OS::*HA βTrCP ΔF*, que sobreexpresa la versión dominante negativa de *HA βTrCP*. Tras preparar de nuevo extractos cromatínicos, comprobamos que la sobreexpresión de *HA βTrCP* provocaba una acumulación de MRN en la cromatina que no se observaba al sobreexpresar *HA βTrCP ΔF* (**Figura 42**). En consecuencia, estos datos sugieren que βTrCP interviene en la localización del complejo MRN en la cromatina.

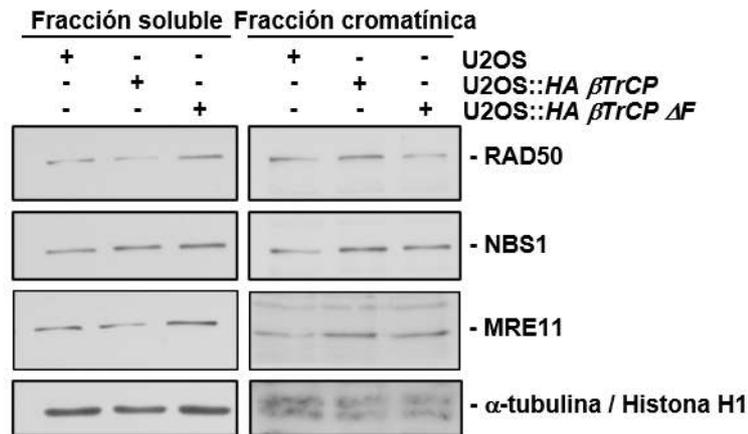


Figura 42. La sobreexpresión de *HA βTrCP ΔF* reduce la presencia del complejo MRN en la cromatina en comparación con la observada al sobreexpresar *HA βTrCP*. El ensayo se realizó como se ha indicado en la figura anterior, pero incorporando en este caso la línea U2OS::*HA βTrCP ΔF*. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

En conjunto, nuestros resultados indican que SCF(β TrCP) provoca la poliubiquitilación K63 de MRE11 favoreciendo la localización del complejo MRN en la cromatina, si bien es cierto que se requieren estudios más profundos para clarificarlo completamente.

2.2. Estudio funcional de la ubiquitilación del complejo MRN por SCF(FBXW7).

Como describimos anteriormente, existe una asociación *in vivo* entre FBXW7 y las proteínas del complejo MRN mediada por GSK3 en el núcleo celular. Además, las 3 proteínas del complejo son sustratos de la ligasa de ubiquitina. Partiendo de estos resultados, vamos a profundizar en la finalidad de esta interacción.

- **SCF(FBXW7) promueve la degradación del complejo MRN a través de la vía de la autofagia/lisosoma.**

Como hemos indicado, SCF(FBXW7) es capaz de poliubiquitilar *in vivo* a MRE11, RAD50 y NBS1, formando cadenas de ubiquitinas unidas a través de la lisina 48 (**Figura 34**). Habitualmente, este tipo de cadenas de ubiquitina suelen marcar los sustratos para su posterior degradación (Li & Ye, 2008), lo que nos llevó a estudiar cómo influía SCF(FBXW7) en la estabilidad del complejo MRN. Para averiguarlo, comparamos los niveles de MRE11, RAD50 y NBS1 en las líneas celulares U2OS y las que sobreexpresan constitutivamente *HA FBXW7* y *HA FBXW7 ΔF*, respectivamente. Preparamos extractos totales y analizamos los niveles de MRN mediante *Western-blot*. Como muestra la **Figura 43**, la sobreexpresión de *HA FBXW7* provoca una disminución de los niveles de

MRE11, RAD50 y NBS1, mientras que la sobreexpresión de *HA FBXW7 ΔF* mantiene o incluso incrementa estos niveles respecto a la línea silvestre. Analizamos el nivel de ciclina E, cuya estabilidad se ve reducida por SCF(FBXW7) (Koepp *et al*, 2001), a modo de control de la eficacia de las construcciones estudiadas, obteniendo el resultado esperado.

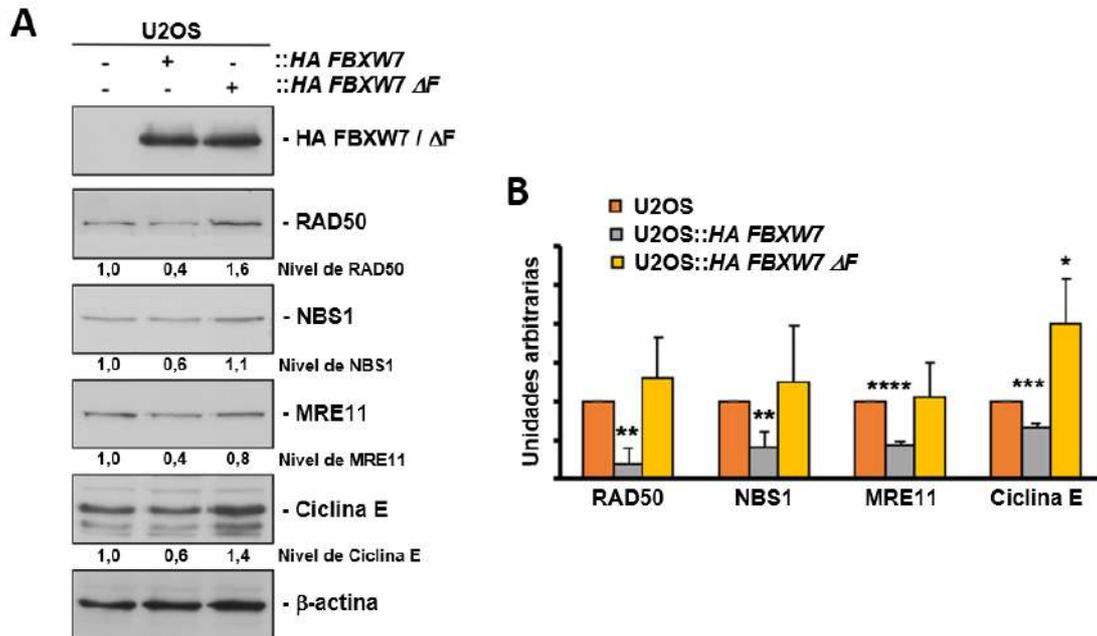


Figura 43. La sobreexpresión de *HA FBXW7* y *HA FBXW7 ΔF* afecta a los niveles de las proteínas del complejo MRN. (A) Los extractos totales de las células U2OS, U2OS::*HA FBXW7* y U2OS::*HA FBXW7 ΔF* se obtuvieron a partir de cultivos en condiciones normales de crecimiento. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN y de ciclina E se determinaron en relación al control de carga (β -actina). (B) Representación gráfica de los niveles de las proteínas mostradas en A. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar los niveles presentes en las líneas U2OS::*HA FBXW7* y U2OS::*HA FBXW7 ΔF* respecto a los de la línea silvestre. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Dado que SCF(FBXW7) promueve la degradación del complejo MRN, quisimos averiguar a través de qué ruta se producía esta degradación: por la vía del proteasoma o por la vía de la autofagia/lisosoma. Para ello, en primer lugar, analizamos la estabilidad del complejo en condiciones basales. Tratamos las células U2OS con inhibidores de las dos rutas de degradación, y analizamos si el complejo MRN se acumulaba en alguno de los casos. Para bloquear la degradación vía proteasoma, tratamos las células con MG132 y observamos que no se produjo una acumulación de las proteínas del complejo (**Figura 44**).

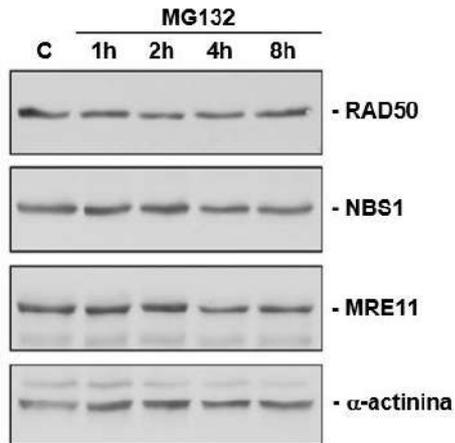


Figura 44. El bloqueo de la vía del proteasoma no altera sustancialmente los niveles del complejo MRN. A partir de células en condiciones control (C) y tratadas con MG132 a diferentes tiempos se prepararon extractos totales y se analizaron mediante *Western-blot* las proteínas señaladas. El ensayo se realizó por duplicado.

En cambio, al tratar las células con concanamicina A, que inhibe las enzimas lisosomales, sí observamos una acumulación del complejo. Para confirmar este resultado, tratamos las células con NH_4Cl , que eleva el pH lisosomal inhibiendo sus enzimas, y preparamos extractos citosólicos y nucleares. Observamos que efectivamente se acumulan las proteínas del complejo MRN, y además que esta acumulación se produce en la fracción nuclear de la célula. Complementariamente, tratamos células con rapamicina o trehalosa, dos activadores diferentes del flujo autofágico, y comprobamos que provocaban una ligera disminución de las proteínas del complejo (**Figura 45**). Como control de estos ensayos utilizamos BRCA1, otra proteína nuclear cuyo nivel se ve afectado por alteraciones del flujo autofágico (Blagosklonny *et al*, 1999).

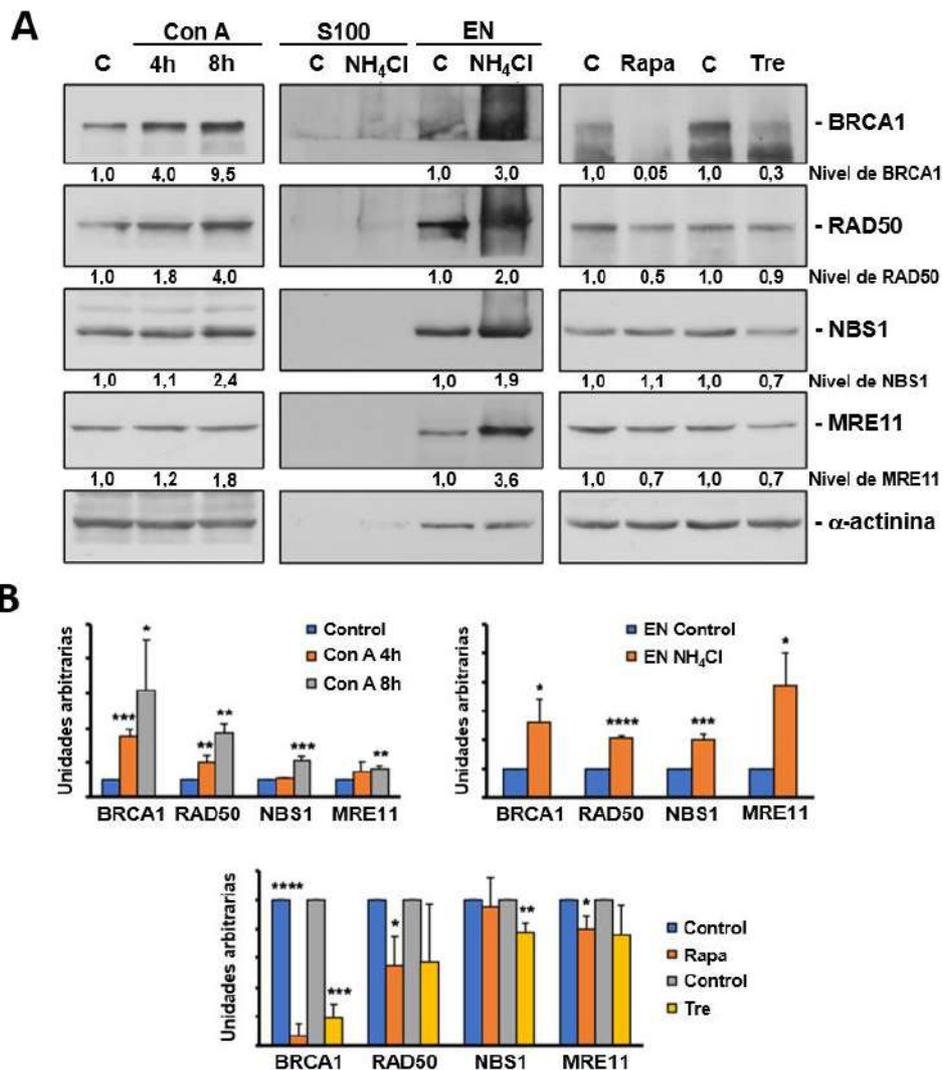


Figura 45. El bloqueo o estímulo de la vía de la autofagia/lisosoma afecta a los niveles de las proteínas del complejo MRN. (A) Las células U2OS fueron sometidas a diferentes condiciones: control (C), de 4 a 8h de concanamina A y 24h de NH₄Cl, rapamicina o trehalosa, y se prepararon extractos totales o citosólicos/nucleares, según el caso. Posteriormente, analizamos mediante *Western-blot* la evolución de las proteínas del complejo MRN y BRCA1. Los niveles cuantitativos de estas proteínas se determinaron en relación al control de carga (α -actinina). (B) Representaciones gráficas de los niveles de las proteínas mostradas en A, separadas por ensayo. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar los niveles de proteínas obtenidos tras cada tratamiento respecto a los de la condición control. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Una vez establecido que existía una degradación basal del complejo MRN por vía autofágica, nos interesamos en averiguar si la degradación inducida por FBXW7 también ocurría por esta vía. Para ello, decidimos tratar con concanamina A las células U2OS::HA FBXW7 y U2OS::HA FBXW7 ΔF . Como muestra la **Figura 46**, el nivel de MRN que presentan las células que sobreexpresan HA FBXW7, y que por tanto estarían degradando activamente las proteínas del complejo, incrementa notablemente al inhibir las enzimas lisosomales. Sin embargo, aquellas células que sobreexpresan HA FBXW7 ΔF , que incluso reducen la degradación endógena del

complejo MRN mediada por FBXW7 al ser un mutante dominante negativo, mantienen constantes los niveles de las proteínas del complejo tanto en presencia como en ausencia de concanamicina A. Todos estos resultados indican que SCF(FBXW7) estimula la degradación de las proteínas del complejo MRN, y que esta degradación ocurre a través de la vía de la autofagia/lisosoma.

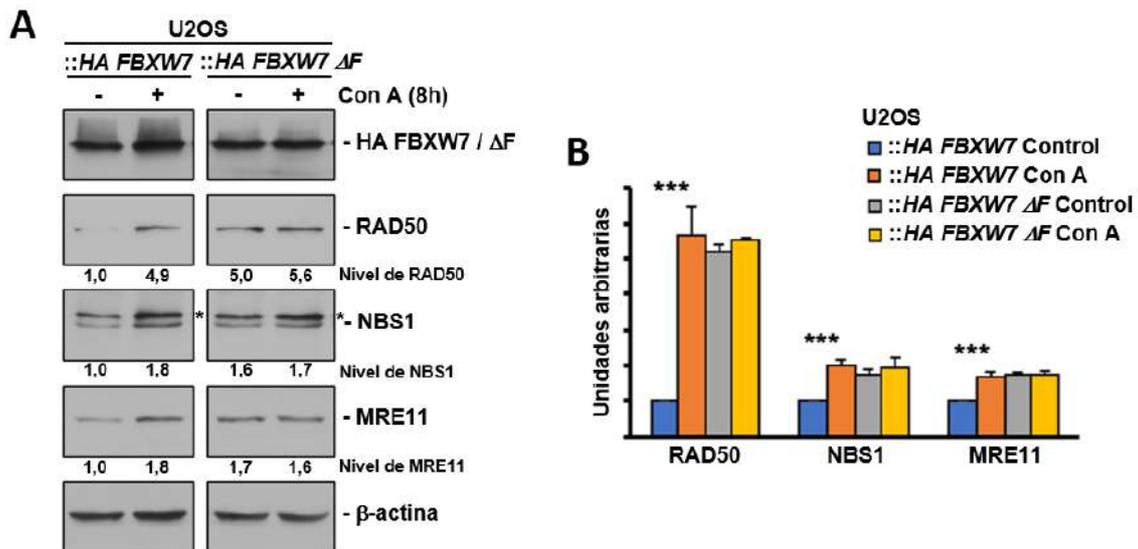


Figura 46. El bloqueo de la vía autofágica incrementa los niveles del complejo MRN en la línea celular que sobreexpresa HA FBXW7. (A) Los extractos totales obtenidos a partir de las células U2OS::HA FBXW7 y U2OS::HA FBXW7 ΔF con y sin tratamiento fueron analizados por *Western-blot*. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN se determinaron en relación al control de carga (β -actina). *: banda inespecífica. (B) Representación gráfica de los niveles de las proteínas mostradas en A. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar los niveles de MRN obtenidos tras el bloqueo de la autofagia respecto a los de la condición control en cada línea celular de manera independiente. ***: $p < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

- **El complejo MRN se asocia con p62/LC3 en el núcleo celular tras ser ubiquitilado por SCF(FBXW7).**

En la degradación autofágica de sustratos ubiquitilados suelen intervenir proteínas adaptadoras como p62, que se unen a estos sustratos ubiquitilados y a la proteína LC3-II. Esta última está inserta en la membrana del autofagosoma, el cual se fusionará con el lisosoma para degradar los cargos (Lippai & Low, 2014). Para averiguar si estas proteínas fundamentales en la maquinaria autofágica intervenían en la degradación del complejo MRN, realizamos ensayos de silenciamiento génico transitorio con ARNs pequeños de interferencia (siRNA). Comprobamos que el silenciamiento de *p62* o *LC3* provocaba un incremento significativo de los niveles de MRE11, RAD50 y NBS1 (**Figura 47**). Utilizando esta misma estrategia, confirmamos la implicación de FBXW7 en la degradación de MRN ya que su silenciamiento incrementaba significativamente los niveles de las proteínas del complejo. Como control de este último siRNA utilizamos de nuevo ciclina E.

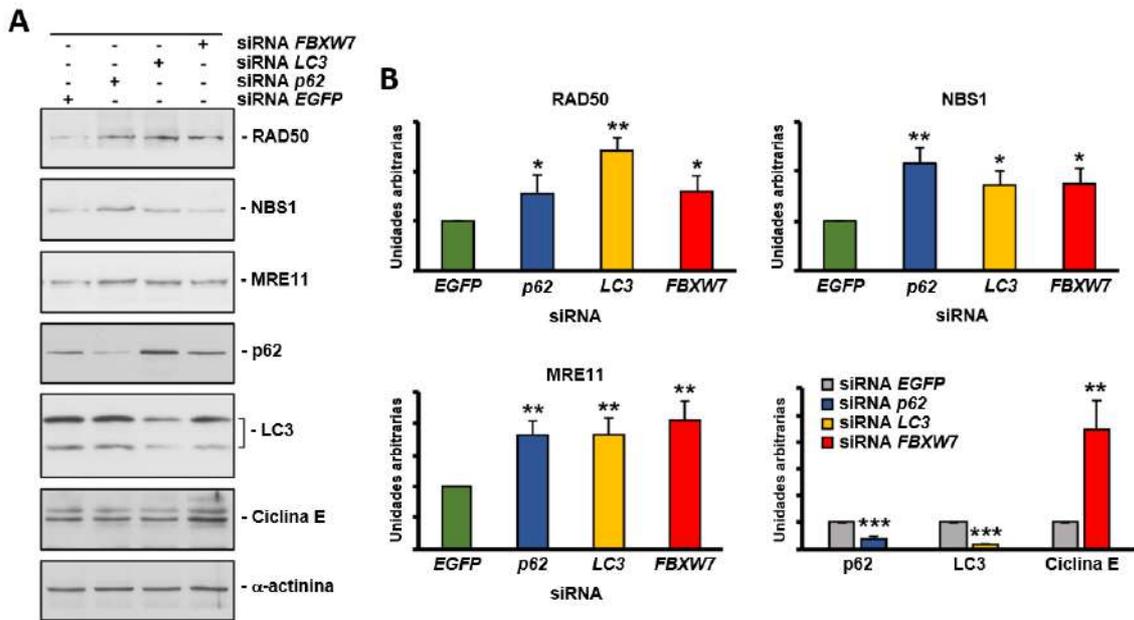


Figura 47. El silenciamiento génico transitorio de mediadores del flujo autofágico y de *FBXW7* permite una acumulación de las proteínas del complejo MRN. (A) Las células U2OS fueron interferidas con los siRNAs indicados. Pasadas 48h, las células fueron recogidas, se prepararon extractos totales y se analizaron mediante *Western-blot*. (B) Representaciones gráficas derivadas del ensayo anterior. Se muestran los niveles de cada componente del complejo MRN individualmente, además de los de las proteínas utilizadas como control en cada interferencia. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar los niveles de cada proteína tras las interferencias respecto a los que presentan en la interferencia control (siRNA *EGFP*). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Además, la línea celular DLD1 *FBXW7*^{-/-}, carente de ambas copias del gen *FBXW7*, también presentaba niveles más elevados de esas proteínas en comparación con la línea DLD1 *FBXW7*^{+/+} (Figura 48).

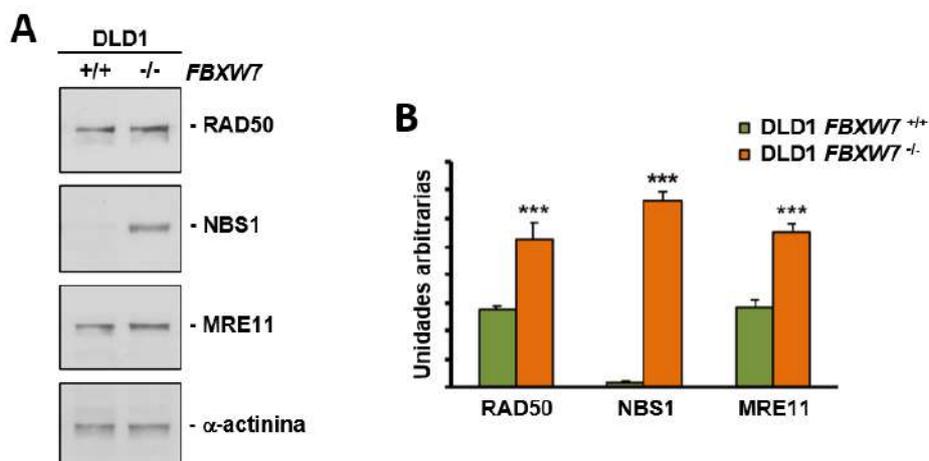


Figura 48. Los componentes del complejo MRN se acumulan en la línea celular DLD1 carente del gen *FBXW7*. (A) Los extractos totales de las células DLD1 *FBXW7*^{+/+} y DLD1 *FBXW7*^{-/-} se obtuvieron a partir de cultivos en condiciones normales de crecimiento. Se analizaron por *Western-blot* las proteínas

indicadas. (B) Representación gráfica de los niveles de las proteínas mostradas en A. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar los niveles presentes en ambas líneas. ***: $p < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=5$).

Por tanto, no sólo FBXW7 sino también p62 y LC3 están implicados en la degradación del complejo MRN. Quisimos averiguar entonces si podíamos detectar la interacción *in vivo* entre las proteínas del complejo MRN y las de la maquinaria autofágica. Cultivamos las células U2OS en condiciones control o tratadas con NH_4Cl y preparamos extractos celulares NP40. Inmunoprecipitamos cada una de las proteínas del complejo y estudiamos la asociación a p62 y LC3 mediante *Western-blot*. Así, pusimos de manifiesto que MRE11, RAD50 y NBS1 se asociaban tanto a p62 como a LC3, y que esta asociación sólo se podía observar cuando se bloqueaba el flujo autofágico, probablemente porque de lo contrario MRN estaría siendo degradado por esta vía (**Figura 49**).

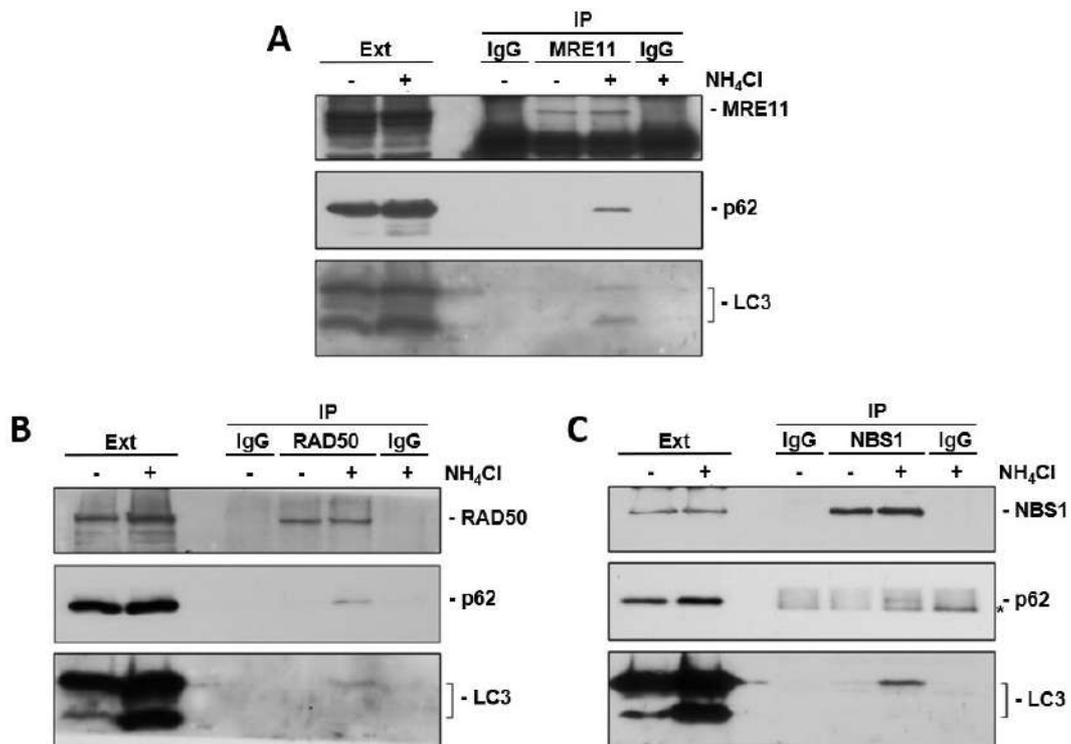


Figura 49. Las proteínas del complejo MRN interaccionan con p62 y LC3. Los extractos obtenidos a partir de células U2OS con o sin bloqueo de la autofagia fueron utilizados para inmunoprecipitar individualmente MRE11 (A), RAD50 (B) y NBS1 (C). La asociación con mediadores del flujo autofágico fue analizada por *Western-blot*. Como control se usaron IgGs de ratón o conejo según el caso. Los ensayos se realizaron por triplicado. Ext: muestras de los extractos celulares empleados para las IPs. *: banda inespecífica.

El complejo MRN se localiza esencialmente en el núcleo celular (Vissinga *et al*, 2009), mientras que p62 y LC3 se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma (Drake *et al*, 2010; Pankiv *et al*, 2010). Por tanto, para conocer donde ocurría esta

asociación, preparamos extractos citosólicos y nucleares de las células U2OS tratadas con NH_4Cl , e inmunoprecipitamos el complejo MRN en ambas fracciones utilizando el anticuerpo anti-NBS1, elegido por su eficacia en este tipo de ensayo. Así, en la **Figura 50** se observa que NBS1, que trae consigo a MRE11 y RAD50, co-inmunoprecipitó p62 y LC3 sólo en el extracto nuclear. Este resultado no elimina la posibilidad de que hubiera cierta interacción fuera del núcleo que no se detectara por cuestiones de sensibilidad de la técnica empleada, aunque en cualquier caso sería menos abundante que la que ocurre en el núcleo.

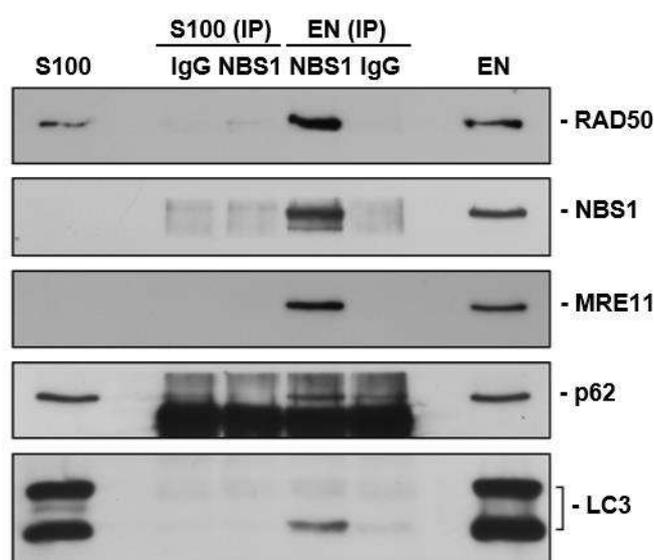


Figura 50. La interacción entre el complejo MRN y p62/LC3 tiene lugar en el núcleo celular. La inmunoprecipitación de NBS1 se realizó tanto en los extractos citosólicos (S100) como en los extractos nucleares (EN) de células U2OS con bloqueo de la autofagia. Como control se usó IgG de conejo. El ensayo se realizó por triplicado.

Con el fin de conocer la localización de las proteínas del complejo MRN, p62 y LC3 en la célula tanto en condiciones control como tras bloqueo de la vía de la autofagia/lisosoma, realizamos ensayos de microscopía de fluorescencia. Utilizamos células U2OS sin tratar y tratadas con concanamina A y visualizamos las proteínas MRE11 y RAD50 junto con p62 y LC3, respectivamente. En condiciones control, RAD50 y MRE11 tienen una localización esencialmente nuclear. Por su parte, LC3 tendría una localización más difusa en toda la célula. En el caso de p62 también es así, aunque presenta además un punteado más discreto. Tras el tratamiento con concanamina A, p62 y LC3 presentan una localización perinuclear, con un aspecto aparentemente vesicular. RAD50, especialmente, y MRE11 también incrementan el marcaje en esa zona (**Figura 51**).

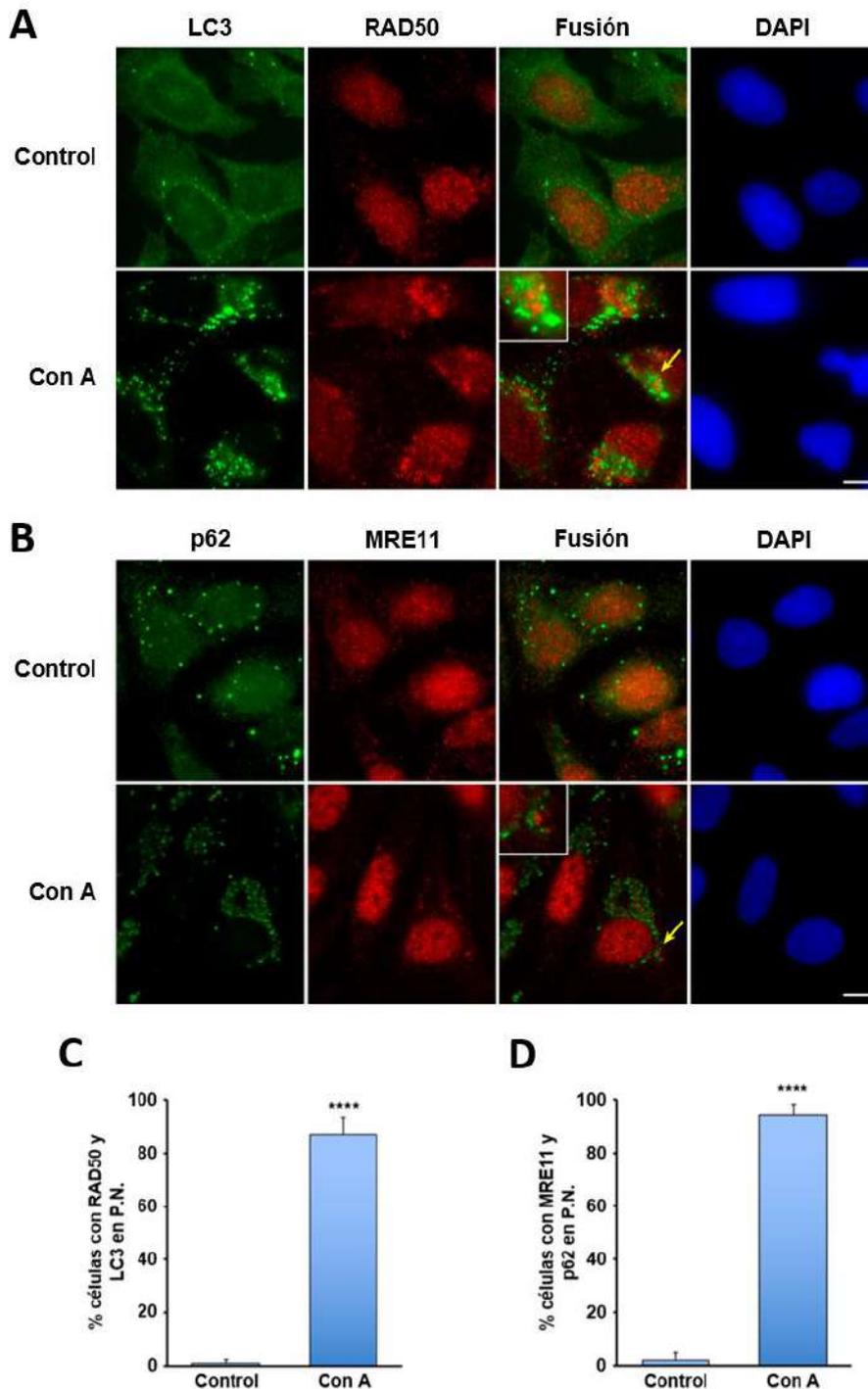


Figura 51. El bloqueo de la vía de la autofagia/lisosoma fomenta la localización perinuclear de LC3/RAD50 y p62/MRE11. Ensayos de inmunofluorescencia en células U2OS tratadas o no con concanamicina A durante 8h. Las flechas amarillas señalan las áreas ampliadas (X2). Las barras de escala representan 10 μ M. (A) Localización de LC3 marcado en verde, RAD50 en rojo, la fusión de ambos y DAPI en azul. (B) Localización de p62 marcado en verde, MRE11 en rojo, la fusión de ambos y DAPI en azul. (C) Porcentajes de células que muestran RAD50 y LC3 en la periferia nuclear (P.N.) en condiciones control y tras el bloqueo de la autofagia. Se ha utilizado el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar ambos valores. ****: $p < 0.0001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$). (D) Similar a C, pero mostrando los porcentajes de células que presentan MRE11 y p62 en la periferia nuclear (P.N.).

Dado que MRE11, RAD50 y NBS1 colocalizan en el núcleo celular (**Figura 52**), estimamos que los resultados obtenidos en el ensayo anterior con los dos primeros son extensibles a NBS1, que no ha podido ser estudiado respecto a p62 y LC3 por problemas de clonicidad de los anticuerpos empleados. Por tanto, la inhibición de las enzimas lisosomales favorece una localización perinuclear del complejo MRN y de p62 y LC3.

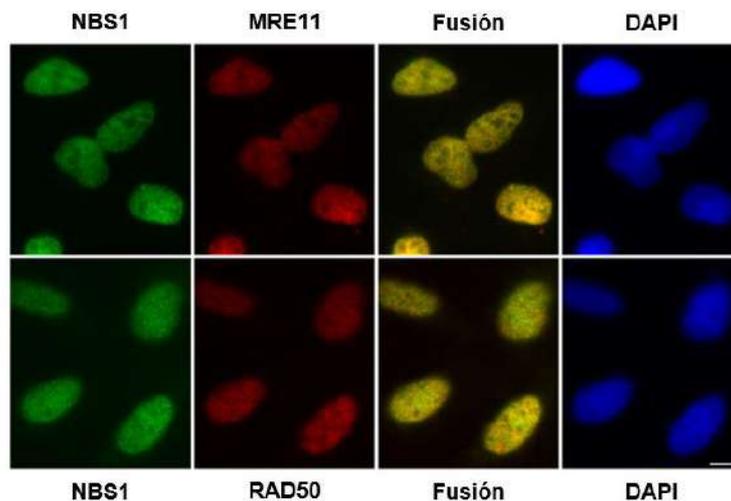


Figura 52. NBS1 colocaliza con MRE11 y RAD50 en el núcleo celular. Ensayos de inmunofluorescencia en células U2OS en condiciones normales de crecimiento, mostrando la localización de NBS1 marcado en verde, MRE11 o RAD50 en rojo, la fusión de ambos, que presenta la colocalización en amarillo, y DAPI en azul. La barra de escala representa 10 μ M. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Como ya hemos mencionado con anterioridad, los sustratos que van a ser degradados por vía autofágica suelen ser previamente ubiquitilados para que puedan ser reconocidos por las proteínas adaptadoras (Lippai & Low, 2014). Por ello, quisimos averiguar si la interacción entre MRN y p62/LC3 estaba mediada por la ubiquitilación del complejo llevada a cabo por SCF(FBXW7). Con este fin, cultivamos las células U2OS, U2OS::*HA FBXW7* y U2OS::*HA FBXW7 ΔF* en condiciones de bloqueo del flujo autofágico, preparamos extractos nucleares e inmunoprecipitamos el complejo MRN utilizando el anticuerpo anti-NBS1. Como observamos en la **Figura 53**, en las células que sobreexpresan *HA FBXW7* se muestra una mayor co-inmunoprecipitación de p62, y sobre todo de LC3, en comparación con la detectada en las células silvestres. Por el contrario, en las células que sobreexpresan *HA FBXW7 ΔF* la co-inmunoprecipitación de ambos mediadores de la ruta autofágica es prácticamente nula. Por tanto, estos resultados muestran la implicación funcional de la ligasa de ubiquitina SCF(FBXW7) en la interacción del complejo MRN con p62 y LC3. Así, es muy probable que la poliubiquitilación del complejo inducida por SCF(FBXW7) provoque su asociación a p62/LC3 en el núcleo de la célula.

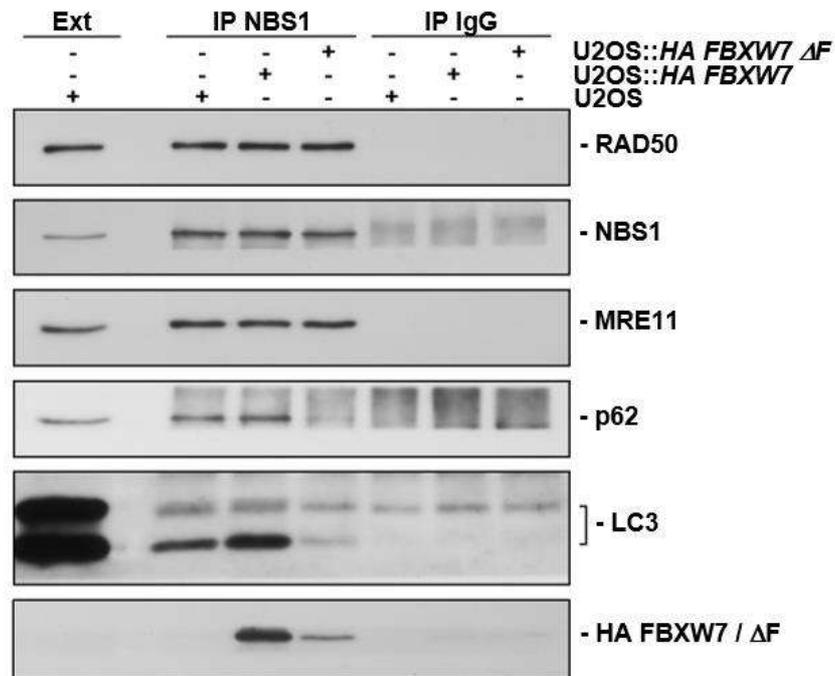


Figura 53. La ubiquitilación de SCF(FBXW7) sobre el complejo MRN permite su interacción con p62/LC3. Los extractos nucleares de las líneas celulares indicadas, todas cultivadas con NH_4Cl durante 24h, fueron utilizados para inmunoprecipitar NBS1. Las co-inmunoprecipitaciones de las proteínas de interés se analizaron mediante *Western-blot*. Como control se usó IgG de conejo. El ensayo se realizó por triplicado. Ext: muestra del extracto nuclear de la línea U2OS empleado para la IP.

- **SCF(FBXW7) induce la localización del complejo MRN en los lisosomas.**

Una vez que el complejo MRN se asocia a la maquinaria autofágica debe ser trasladado al lisosoma para su degradación. Por ello, quisimos averiguar si las proteínas del complejo podrían detectarse también en los lisosomas. Con este fin, y siguiendo el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*, preparamos extractos enriquecidos en lisosomas a partir de cultivos celulares crecidos en condiciones normales y tras el bloqueo del flujo autofágico con NH_4Cl . Este último tratamiento evitaría la degradación de las proteínas en el lisosoma, lo que nos permitiría detectarlas. Tras llevar a cabo pruebas en diferentes modelos celulares, llegamos a la conclusión de que las células HeLa eran el mejor modelo para este tipo de ensayos. Tratamos estas células durante 24 h con NH_4Cl , y observamos que las 3 proteínas del complejo MRN se acumulaban en la fracción lisosomal, indicando que sin el inhibidor estarían siendo degradadas (**Figura 54**).

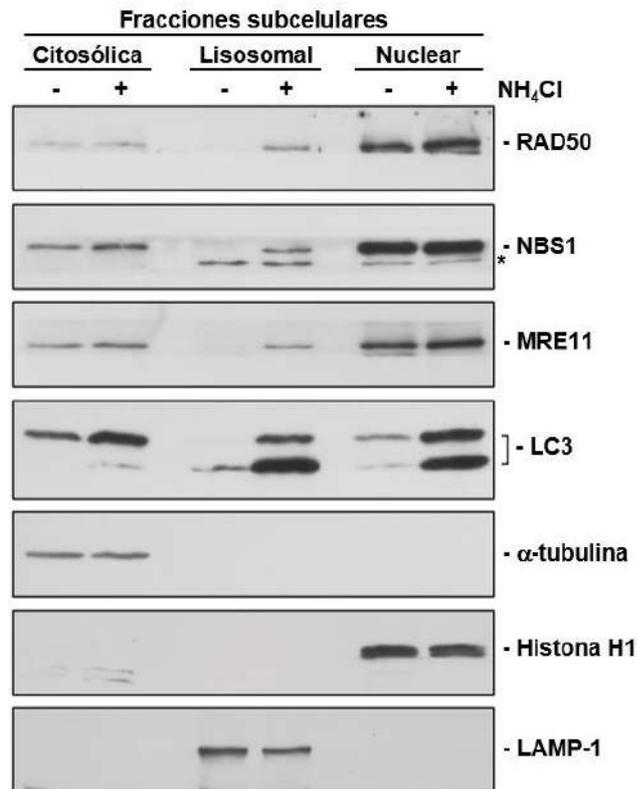


Figura 54. El bloqueo de la vía autofágica permite detectar las proteínas del complejo MRN en la fracción lisosomal celular. Se obtuvieron extractos citosólicos, enriquecidos en lisosomas y nucleares a partir de células HeLa cultivadas en condiciones control y con bloqueo de la autofagia. El contenido de cada fracción subcelular se analizó por *Western-blot*, empleando un 5% de la fracción citosólica, un 30% de la lisosomal y un 2,5% de la nuclear. Como control de pureza del fraccionamiento, y a su vez control de carga, se usaron los siguientes marcadores: α -tubulina para el citosol, LAMP-1 para la fracción lisosomal e Histona H1 para la nuclear. El ensayo se realizó por duplicado. *: banda inespecífica.

A continuación, quisimos saber si la presencia del complejo MRN en los lisosomas era dependiente de SCF(FBXW7). Para ello, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de *HA FBXW7* sobre la localización lisosomal del complejo. Utilizamos las células HeLa y HeLa::*HA FBXW7* cultivadas en condiciones normales de crecimiento y tratadas con NH₄Cl. Como control de especificidad utilizamos la línea HeLa::*HA β TrCP*. Comparando el contenido de la fracción lisosomal obtenida en cada línea pudimos comprobar que la sobreexpresión de *HA FBXW7* provocaba una mayor presencia en los lisosomas de las proteínas del complejo MRN, respecto a lo detectado en la línea silvestre. Además, este resultado fue específico de esta proteína F-box, ya que la sobreexpresión de *HA β TrCP* no tuvo ese efecto (**Figura 55A**).

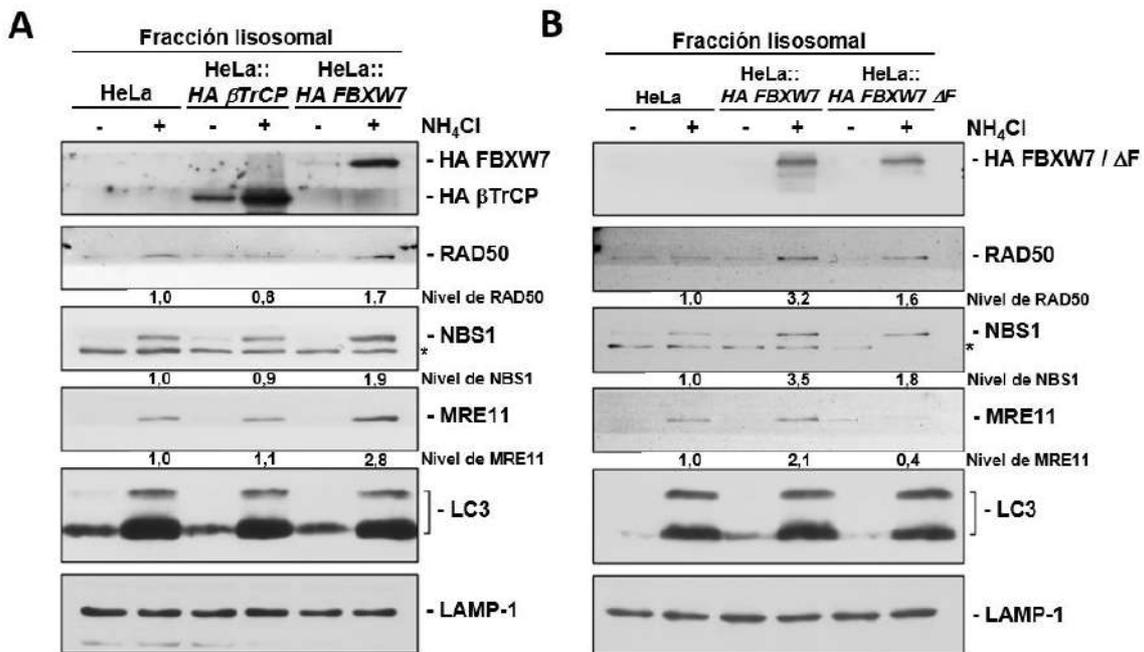


Figura 55. La sobreexpresión de HA FBXW7 potencia la presencia de los componentes del complejo MRN en la fracción lisosomal. (A) Los extractos enriquecidos en lisosomas obtenidos a partir de los cultivos celulares indicados se analizaron por *Western-blot*, empleando el 30% de las fracciones. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN se determinaron en relación al control de carga (LAMP-1). (B) Similar al ensayo mostrado en A, pero incorporando en este caso la línea HeLa::HA FBXW7 ΔF. Los ensayos se realizaron por duplicado. *: banda inespecífica.

Para complementar el experimento anterior, repetimos el mismo tipo de ensayo utilizando además la línea HeLa::HA FBXW7 ΔF con el fin de revertir el efecto de la sobreexpresión de HA FBXW7 sobre la localización lisosomal del complejo. Como se observa en la **Figura 55B**, FBXW7 ΔF provocó una menor acumulación en los lisosomas de las 3 proteínas del complejo MRN en comparación con la acumulación observada con FBXW7.

Por último, quisimos estudiar la presencia del complejo MRN en los lisosomas *in vivo* en ensayos de inmunofluorescencia. Cultivamos las células U2OS y U2OS::HA FBXW7 ΔF en presencia y ausencia de concanamina A y analizamos la distribución de NBS1, como representante del complejo MRN, junto con la de LAMP-1, como marcador de las membranas lisosomales (Eskelinen, 2006; Arhzaouy *et al*, 2019). En la **Figura 56** podemos observar que el tratamiento con concanamina A provoca una acumulación de NBS1 en las vesículas lisosomales marcadas con anti-LAMP-1 de la línea U2OS. Sin embargo, este doble marcaje no se observa en la línea que sobreexpresa HA FBXW7 ΔF. Estos resultados indican que la actividad de SCF(FBXW7) sobre el complejo MRN propicia su localización en los lisosomas.

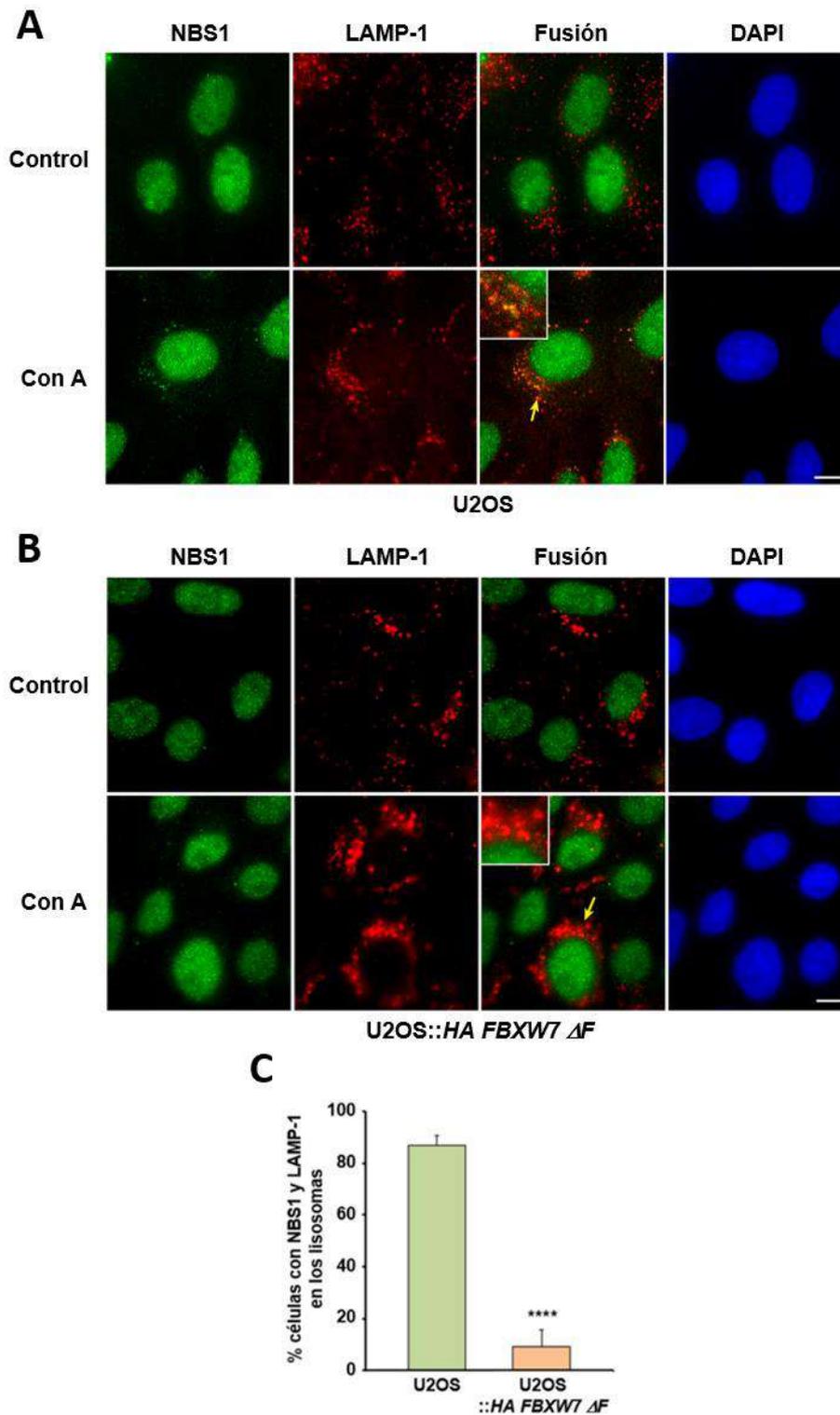


Figura 56. La localización de NBS1 en los lisosomas que se detecta al bloquear la vía autofágica en células silvestres no sucede con la sobreexpresión de HA FBXW7 ΔF . Ensayos de inmunofluorescencia en células U2OS y U2OS::HA FBXW7 ΔF tratadas o no con concanamicina A durante 8h. Las flechas amarillas señalan las áreas ampliadas (X2). Las barras de escala representan 10 μ M. (A) Localización en la línea U2OS de NBS1 marcado en verde, LAMP-1 en rojo, la fusión de ambos y DAPI en azul. (B) Como en A, pero en la línea U2OS::HA FBXW7 ΔF . (C) Porcentajes de células que muestran NBS1 en las vesículas marcadas con LAMP-1 para cada línea celular tras el tratamiento con concanamicina A. Se ha utilizado el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar ambos valores. ****: $p < 0.0001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Realizados estos ensayos podemos concluir que las proteínas del complejo MRN, tras interactuar con p62/LC3 en el núcleo, se localizan en los lisosomas para su degradación en este compartimento. Además, SCF(FBXW7) es el responsable de la degradación autofágica del complejo MRN al posibilitar la asociación de este con p62/LC3 lo cual, siguiendo la dinámica de la vía de la autofagia, asegura en última instancia su degradación en los lisosomas.

- **La apoptosis provocada por agentes genotóxicos estimula la degradación autofágica del complejo MRN mediada por SCF(FBXW7).**

Tras caracterizar la implicación de la vía autofágica en el recambio basal del complejo MRN, quisimos averiguar si esta degradación podría estimularse en otras condiciones. La autofagia es un proceso de degradación selectiva de sustratos que se potencia principalmente por falta de nutrientes, pero también por otras situaciones de estrés celular tales como el daño en el ADN, la hipoxia, el estrés del retículo o la infección por patógenos, entre otros (Kroemer *et al*, 2010). Dada la importancia de la escasez de nutrientes en la activación de la vía autofágica, decidimos empezar nuestro estudio comprobando si esta situación podría estimular la degradación de MRN. Para ello, sometimos las células HeLa a privación de suero cultivándolas 3 días en medio al 0,15% de suero fetal bovino, utilizando como control las células cultivadas en medio completo (10% de suero). Analizando la caída en el nivel de p62 y el incremento de LC3-II, pudimos comprobar que la privación de suero produjo una eficaz activación del flujo autofágico. No obstante, esto no trajo consigo una mayor degradación de las proteínas del complejo MRN (**Figura 57**).

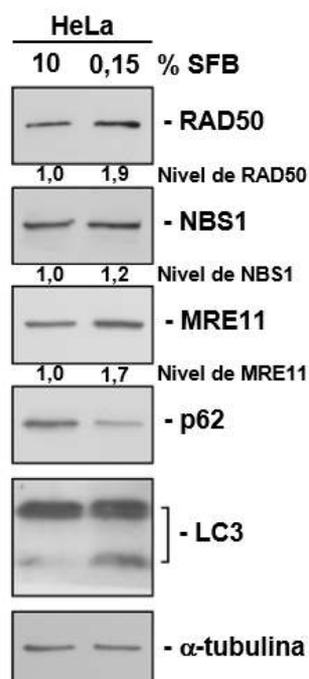


Figura 57. La privación de nutrientes no produce una caída en los niveles del complejo MRN, pese a la activación de la autofagia. Los extractos totales de las células HeLa cultivadas con dos porcentajes de suero fetal bovino (SFB) diferentes se analizaron por *Western-blot*. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN se determinaron en relación al control de carga (α -tubulina). El ensayo se realizó por duplicado.

Descartada la privación de suero, continuamos con la búsqueda de estímulos capaces de incrementar la degradación autofágica de MRN. Decidimos centrarnos en el estudio del daño en el ADN, dado el papel de dicho complejo en la respuesta al estrés genotóxico. Anteriormente, señalamos que el tratamiento con dosis inferiores a 10 μ M de cisplatino no provocaba cambios sustanciales en los niveles de MRN. Por tanto, realizamos una cinética de dosis de cisplatino para comprobar la evolución del complejo a dosis superiores a las utilizadas previamente. Como se observa en la **Figura 58A**, las dosis más altas de cisplatino provocan una disminución considerable en los niveles de MRE11, RAD50 y NBS1, coincidiendo con una activación de la autofagia medida por la degradación de p62 y la aparición de LC3-II. También vemos que estas dosis elevadas inducen apoptosis, detectada por la aparición de la proteína PARP fragmentada, la caspasa 3 activa y la acumulación de γ -H2AX. Para confirmar la muerte celular, analizamos por citometría de flujo células tratadas en estas mismas condiciones con el fin de cuantificar el porcentaje de células positivas para anexina V. Comprobamos que las dosis de cisplatino que inducen la degradación del complejo MRN presentan los mayores porcentajes de células apoptóticas, positivas para anexina V (**Figura 58B**).

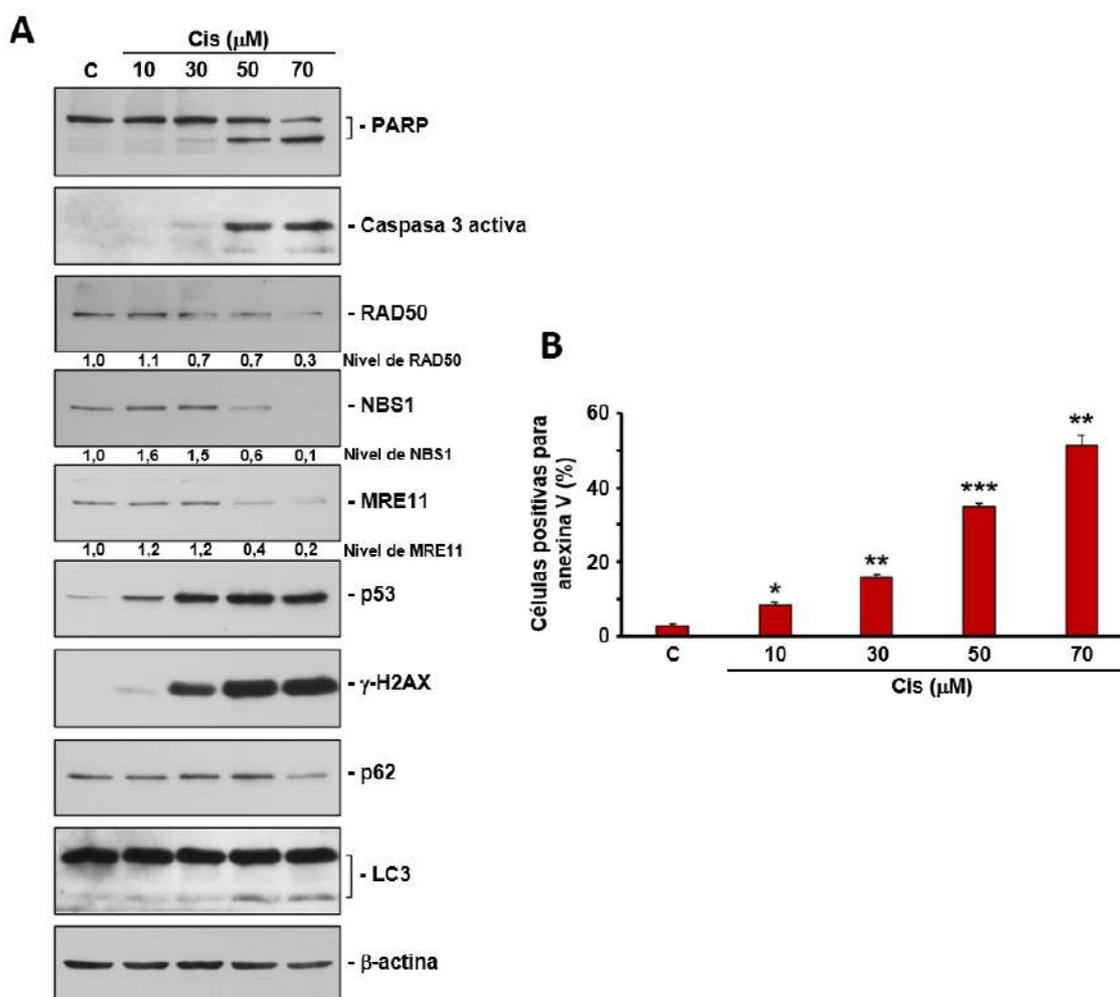


Figura 58. El tratamiento con dosis de cisplatino capaces de inducir apoptosis provoca una caída en los niveles de las proteínas del complejo MRN. (A) Las células U2OS se cultivaron en condiciones control (C) y con dosis crecientes de cisplatino durante 24h. Tras preparar extractos totales, se analizó mediante *Western-blot* la evolución de las proteínas indicadas. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN se determinaron en relación al control de carga (β -actina). (B) Las células U2OS se cultivaron en las mismas condiciones del ensayo mostrado en A, y se analizó mediante citometría de flujo el marcaje con anexina V, que se representa gráficamente. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar el porcentaje de células positivas para anexina V a cada dosis del fármaco respecto al que presenta el cultivo control. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Los resultados anteriores fueron ratificados realizando los mismos experimentos utilizando otro agente genotóxico como la doxorubicina. De nuevo, las dosis más elevadas provocaron una caída destacable en los niveles de las 3 proteínas del complejo a la vez que una activación de la autofagia e inducción de apoptosis (**Figura 59A**). Del mismo modo, los estudios de citometría de flujo asociaron los mayores porcentajes de células positivas para anexina V con la mayor caída del complejo MRN (**Figura 59B**).

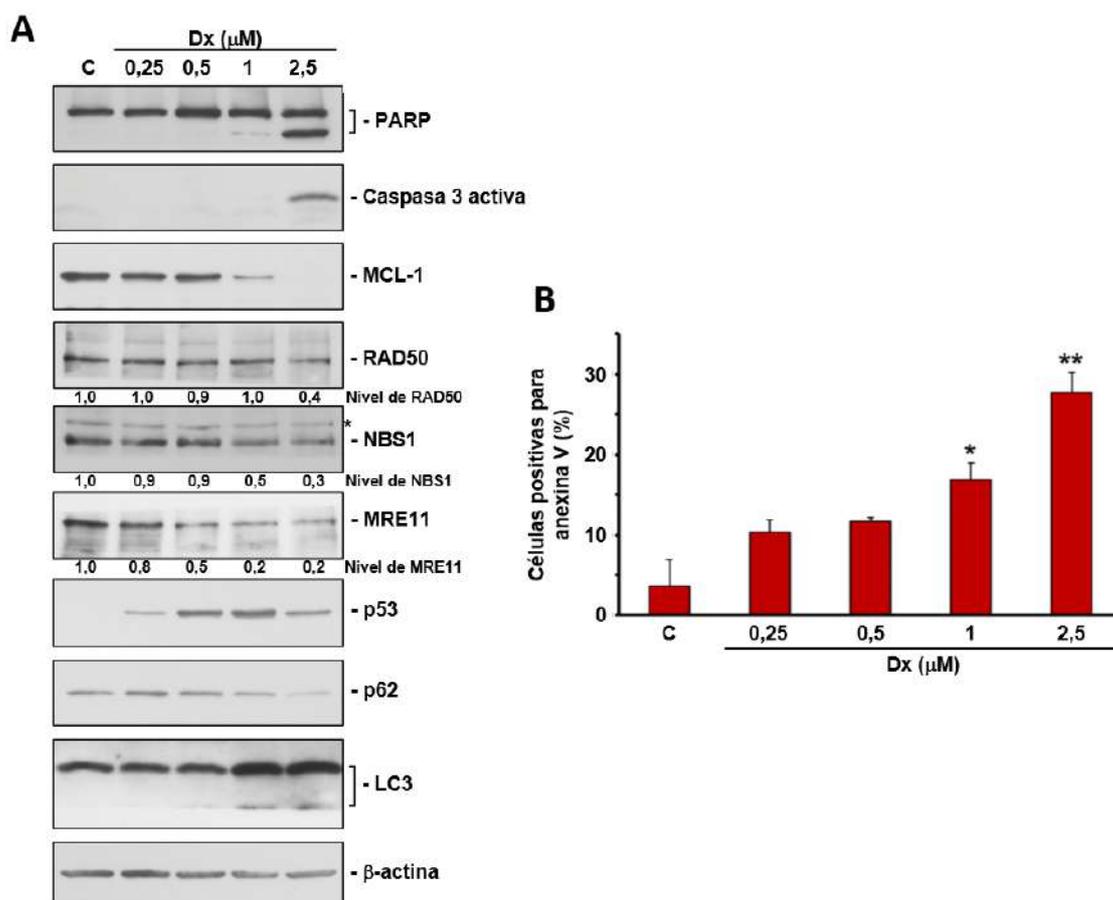


Figura 59. El tratamiento con dosis de doxorubicina capaces de inducir apoptosis también provoca una bajada en los niveles del complejo MRN. (A) Las células U2OS se cultivaron en condiciones control (C) y con dosis crecientes de doxorubicina durante 24h. Los extractos totales obtenidos se analizaron mediante *Western-blot* y se estudiaron las proteínas indicadas. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN se determinaron en relación al control de carga (β -actina). *: banda inespecífica. (B) Las células U2OS se cultivaron en las mismas condiciones del ensayo mostrado en A, y se analizó mediante citometría de flujo el marcaje con anexina V, que se representa gráficamente. Utilizamos el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar el porcentaje de células positivas para anexina V a cada dosis del fármaco respecto al que presenta el cultivo control. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Estos resultados indicaban que el tratamiento con agentes genotóxicos en dosis suficientemente elevadas como para provocar apoptosis causaba una bajada en los niveles del complejo MRN. Para asegurar que esta disminución se correspondía con una degradación del complejo, teniendo en cuenta además que se estaba activando el flujo autofágico, estudiamos si el bloqueo de la autofagia en estas condiciones de daño podría contrarrestar la caída observada. La dosis de cisplatino elegida para estos ensayos fue de 50 μ M, ya que con ella se obtenía una disminución sustancial del complejo de acuerdo con los experimentos anteriores. Observamos que la reducción de los niveles de las 3 proteínas se revertía al combinar este tratamiento con NH_4Cl (Figura 60), lo que demuestra que MRN estaba siendo degradado por la vía de la autofagia/lisosoma.

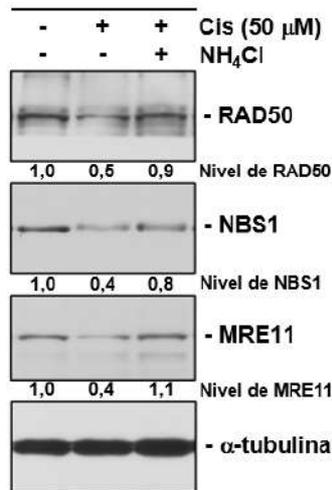


Figura 60. El bloqueo de la autofagia en condiciones de daño apoptótico en el ADN frena la degradación del complejo MRN. Las células U2OS se cultivaron en condiciones control y tratadas con cisplatino durante 24h, en monoterapia o con bloqueo de la autofagia con NH₄Cl. Los extractos totales obtenidos se analizaron mediante *Western-blot*. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN se determinaron en relación al control de carga (α -tubulina). El ensayo se realizó por duplicado.

A continuación, quisimos estudiar si la degradación autofágica de MRN en estas condiciones podría deberse a la actividad de SCF(FBXW7). Con este fin, utilizamos ARN pequeño de interferencia para reducir los niveles de FBXW7 y tratamos con cisplatino a la dosis usada en el ensayo previo. Observamos que el silenciamiento de *FBXW7* evitaba la disminución de los niveles de MRN tras el tratamiento genotóxico que sí se observaba con el siRNA control (**Figura 61**). Como control del silenciamiento utilizamos el incremento de ciclina E.

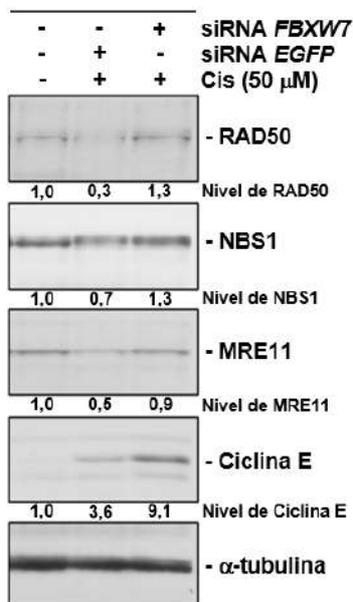


Figura 61. El silenciamiento génico transitorio de *FBXW7* impide la degradación del complejo MRN en condiciones de daño apoptótico en el ADN. Las células U2OS fueron interferidas con los siRNAs indicados. Pasadas 24h, fueron tratadas con cisplatino y recogidas tras otras 24h. Los extractos totales preparados se analizaron mediante *Western-blot*. Los niveles cuantitativos de las proteínas del complejo MRN y de ciclina E se determinaron en relación al control de carga (α -tubulina). El ensayo se realizó por duplicado.

Por último, para determinar si la degradación autofágica de MRN tras daño en el ADN conllevaba una mayor presencia del complejo en los lisosomas promovida por FBXW7, realizamos ensayos de microscopía de fluorescencia en células U2OS y U2OS::*HA FBXW7* Δ F. Cultivamos las células sin tratamiento y tratadas con cisplatino,

con concanamicina A y con una combinación de ambos. Después, analizamos la presencia de NBS1 en los lisosomas detectados con anti-LAMP-1. Como podemos observar en la **Figura 62**, en la línea U2OS el bloqueo del flujo autofágico permite detectar NBS1 en las vesículas marcadas con LAMP-1, lo cual no ocurre en la línea que sobreexpresa el dominante negativo de FBXW7. Cuando tratamos con cisplatino y concanamicina A, en las células U2OS la señal de NBS1 se hace más intensa en las estructuras marcadas con LAMP-1 respecto a la señal detectada con concanamicina A únicamente. Por su parte, las células que sobreexpresan *HA FBXW7 ΔF* tampoco presentan marcaje de NBS1 en los lisosomas en estas condiciones (**Figura 63**).

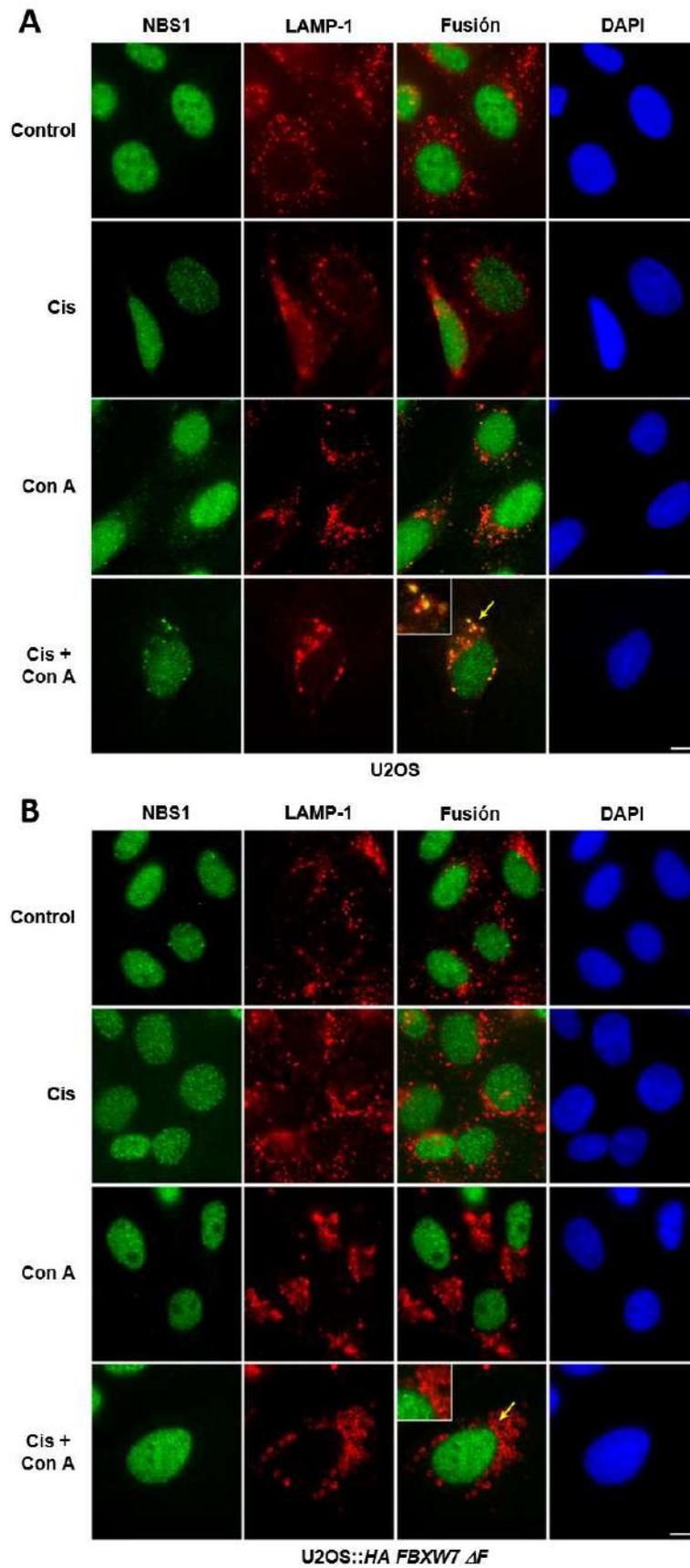


Figura 62. El daño apoptótico en el ADN potencia la presencia de NBS1 en los lisosomas en células silvestres pero no en aquellas que sobreexpresan *HA FBXW7 ΔF* . Ensayos de inmunofluorescencia en

células U2OS y U2OS::*HA FBXW7 ΔF* tratadas o no con 50 μM de cisplatino durante 24h, concanamicina A durante 8h, o la combinación de ambos. Las flechas amarillas señalan las áreas ampliadas (X2). Las barras de escala representan 10 μM. (A) Localización en la línea U2OS de NBS1 marcado en verde, LAMP-1 en rojo, la fusión de ambos y DAPI en azul. (B) Como en A, pero en la línea U2OS::*HA FBXW7 ΔF*. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Todos estos resultados demuestran que las dosis elevadas de agentes genotóxicos como el cisplatino o la doxorubicina inducen la apoptosis, estimulan la autofagia y traen consigo una mayor degradación del complejo MRN por esta vía. En esta degradación resulta fundamental la actividad de la ligasa de ubiquitina SCF(FBXW7) sobre el complejo MRN. Así, la ausencia de FBXW7, bien sea por silenciamiento génico transitorio o por la sobreexpresión de su forma dominante negativa, evita este fenómeno.

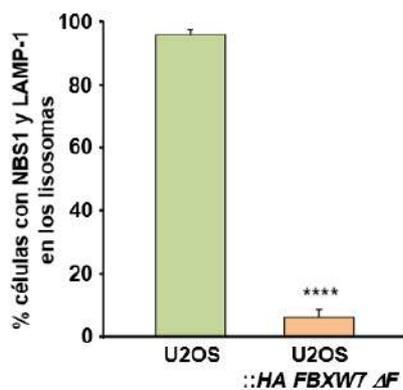


Figura 63. La diferencia en el marcaje de NBS1 en los lisosomas entre células silvestres y aquellas que sobreexpresan *HA FBXW7 ΔF* es significativa. En la gráfica se presenta el porcentaje de células que muestran NBS1 en las vesículas marcadas con LAMP-1 para las líneas celulares de la Figura 70, tras el tratamiento combinado de cisplatino y concanamicina A. Se ha utilizado el test *t de Student* de muestras desapareadas para comparar ambos valores. ****: $p < 0.0001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

En conjunto, hemos demostrado que SCF(FBXW7) interviene en el mantenimiento basal de los niveles de las proteínas del complejo MRN a través de su ubiquitilación y degradación lisosomal mediada por p62/LC3. Esta degradación incrementa tras someter las células a daños genotóxicos capaces de inducir apoptosis, lo que sugiere que la degradación del complejo MRN podría ser un evento más de los que tienen lugar cuando las células entran en muerte celular.

3. Efecto de la sobreexpresión de β TrCP en condiciones de senescencia.

Estudiando el efecto del daño en el ADN sobre el complejo MRN, cultivamos las células U2OS y U2OS::HA β TrCP con diferentes dosis de cisplatino durante varios días para ver si se producían cambios en la estabilidad de las proteínas del complejo. Aunque no llegamos a apreciar diferencias en la cantidad de estas proteínas, sí observamos que a dosis bajas de cisplatino el comportamiento de ambas líneas celulares era diferente. Las células U2OS habían dejado de proliferar y aumentado notablemente su tamaño, presentando un aspecto mucho más aplanado, mientras que las células U2OS::HA β TrCP no sólo no tenían este aspecto sino que además habían reducido su número drásticamente. Para confirmar estas observaciones, los ensayos se realizaron en las líneas A549 y A549::HA β TrCP repitiéndose el mismo fenómeno. El cambio fenotípico observado en las líneas U2OS y A549 parecía corresponderse con la inducción de senescencia celular.

Como ya mencionamos en la *Introducción*, la senescencia es un estado de parada proliferativa normalmente irreversible que evita la multiplicación de las células sometidas a diversas formas de estrés. Entre ellas, cabe destacar el acortamiento de los telómeros, el daño en el ADN, el estrés oxidativo, ciertas disfunciones metabólicas o la activación de oncogenes (Hernandez-Segura *et al*, 2018; Gorgoulis *et al*, 2019). Cuando las células entran en senescencia, adquieren unos rasgos fenotípicos característicos, como el aumento de su tamaño, el aplanamiento celular o la acumulación de la enzima β -galactosidasa lisosomal. Esta última propiedad permite la identificación de las células senescentes de manera sencilla a través de una tinción convencional. Asimismo, estas células presentan cambios a nivel de expresión génica, destacando una mayor expresión de ciertos genes supresores de tumores y una menor expresión de los genes que promueven el avance del ciclo y la proliferación celular (Campisi & D'Adda Di Fagagna, 2007).

Otro rasgo propio de las células senescentes es el llamado fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, del inglés *senescence-associated secretory phenotype*), que consiste en la producción y liberación al medio extracelular de ciertas moléculas bioactivas, como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento o enzimas capaces de remodelar la matriz extracelular (Kuilman *et al*, 2008). En la activación del SASP intervienen numerosas rutas entre las que destaca el factor de transcripción NF- κ B, o la señalización mediada por mTOR (Chien *et al*, 2011; Herranz *et al*, 2015; Laberge *et al*, 2015; Ohanna *et al*, 2011). Las moléculas secretadas actúan de manera autocrina y paracrina sobre las células del microambiente del tejido circundante. Algunos de los factores secretados pueden promover el mantenimiento de la parada proliferativa de las células senescentes, lo que hace que estas células exhiban una función supresora de tumores (Kuilman *et al*, 2008; Acosta *et al*, 2008). Además, ciertas moléculas contribuyen a procesos tan importantes como el desarrollo embrionario, la remodelación y reparación de los tejidos o a mejorar determinadas

funciones del sistema inmune (Chang *et al*, 2016; Demaria *et al*, 2014; Adams, 2009). Sin embargo, dependiendo del contexto las células senescentes también pueden promover la transformación tumoral por medio de determinados componentes del SASP, al proveer a las células del entorno de moléculas capaces de estimular la proliferación celular, la evasión de la apoptosis o aumentar la capacidad invasiva, entre otras propiedades (Faget *et al*, 2019; He & Sharpless, 2017; Lee & Schmitt, 2019; Wang *et al*, 2020a).

Los estímulos que hemos citado anteriormente capaces de provocar senescencia pueden dar lugar a diferentes formas de senescencia, dependiendo también del tipo celular. La primera vez que se describió este fenómeno fue en cultivos de fibroblastos humanos, que detenían su proliferación tras alcanzar el número máximo de divisiones posibles. Esto era debido al acortamiento de los telómeros que tiene lugar tras cada división, lo que induce la denominada senescencia replicativa. Cuando los telómeros alcanzan una longitud mínima, son reconocidos por la célula como daño en el ADN. Se activa entonces la respuesta a los daños en el ADN, mediada por las quinasas ATM y ATR. Como ya hemos descrito, estas quinasas activan a sus proteínas efectoras CHK2 y CHK1, respectivamente, que a su vez facilitan la estabilización y activación de p53. Esta proteína promueve la expresión del inhibidor de las CDKs p21 CIP1, que favorece el bloqueo del ciclo celular. En paralelo, se expresan otros dos supresores tumorales de gran importancia en senescencia: p14 ARF, que promueve la degradación de MDM2, lo que estimula más aún la vía p53/p21 CIP1; y p16 INK4A, que bloquea a CDK4 y CDK6. La inhibición de estas CDKs junto a la inhibición que promueve p21 CIP1 inducen la activación de otro supresor tumoral, RB1, que se encarga de bloquear a los factores de transcripción de la familia E2F, favoreciendo la parada permanente del ciclo celular (Figura 64) (D'Adda Di Fagagna, 2008; D'Adda Di Fagagna *et al*, 2004).

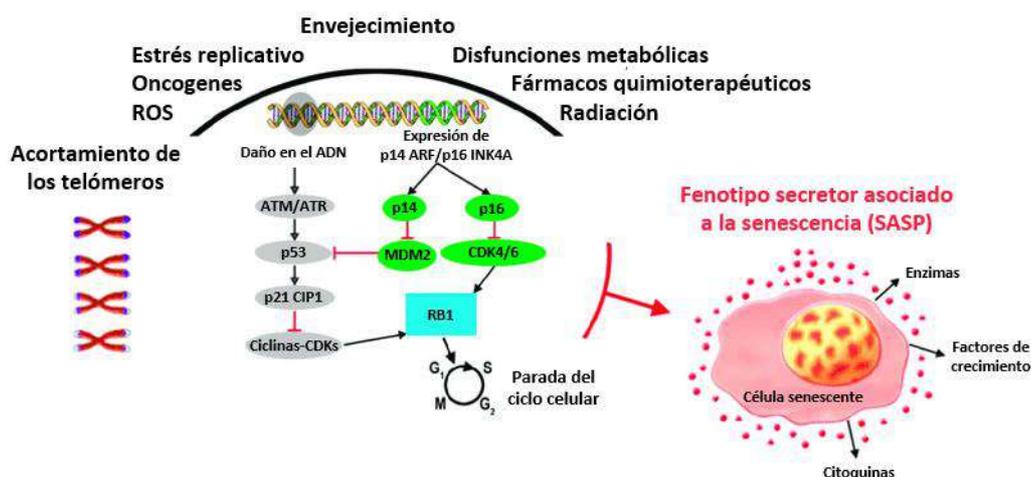


Figura 64. Mecanismos moleculares de la inducción de senescencia. La senescencia puede derivar de múltiples formas de estrés celular y disfunciones tanto de origen natural como artificial. Estas provocan la activación de las rutas de p53/p21 CIP1, p14 ARF y p16 INK4A, las cuales inhiben las CDKs, activan al supresor tumoral RB1 y finalmente provocan la parada del ciclo celular. Entre los cambios fenotípicos característicos de las células senescentes se encuentra el desarrollo del fenotipo secretor asociado a la

senescencia (SASP), mediante el cual la célula senescente libera al entorno moléculas bioactivas (enzimas, factores de crecimiento, citoquinas...) que afectan a las células del microambiente. Figura modificada a partir de Cianflone *et al*, 2020.

Cuando se produce un daño prolongado en el ADN o una situación de estrés oxidativo se puede desencadenar senescencia inducida por estrés. Estas situaciones provocan la activación de p53, que a su vez induce la expresión de p21 CIP1, lo que deriva en una parada temporal del ciclo celular o en la inducción de apoptosis si el daño es demasiado importante. En el caso del estrés oxidativo, en la activación de p53 y p21 CIP1 interviene además p38 MAPK. Si durante la parada temporal del ciclo celular no se pueden solucionar los daños producidos, el bloqueo del ciclo se hace permanente y la célula entra en senescencia por medio de la activación de p16 INK4A, según lo descrito anteriormente (Passos *et al*, 2010).

Por otra parte, también se puede inducir senescencia por la expresión de determinados oncogenes, actuando, por tanto, de freno en las fases iniciales de la transformación tumoral. El paradigma de este tipo de senescencia lo constituye la sobreexpresión de la forma oncogénica *H-RAS*^{V12} (Serrano *et al*, 1997). Entre los efectos derivados de la activación de este oncogén está la producción de aberraciones durante la replicación del ADN que propician la aparición de DSBs. También se estimula la producción de especies reactivas de oxígeno con el subsecuente efecto nocivo sobre el material genético (DiMauro & David, 2010). Estos efectos, entre otros, impulsan la entrada en senescencia.

Por último, señalar que la senescencia también puede ocurrir como consecuencia de la pérdida de la expresión de determinados supresores tumorales, como *RB1* o *PTEN* (Shamma *et al*, 2009).

Durante mucho tiempo, la senescencia celular se ha considerado un mecanismo de protección contra la progresión tumoral, ya que frenaría la proliferación de las células cancerosas. De hecho, la mayoría de los estímulos que son capaces de inducir senescencia se asocian con las células tumorales debido al daño en el ADN causado por la hiperproliferación aberrante o por el efecto de ciertos tratamientos de quimioterapia o radioterapia. Así, existen ejemplos en los que la inducción de senescencia en las células tumorales trae consigo efectos beneficiosos al limitar la progresión tumoral (Lee & Schmitt, 2019; He & Sharpless, 2017; Kowald *et al*, 2020). Sin embargo, también existen evidencias de que las células senescentes son capaces de estimular el desarrollo de los tumores (Kowald *et al*, 2020; Wang *et al*, 2020a). En estos casos, el SASP tiene un papel esencial, como mencionamos anteriormente. Además, en ciertas ocasiones las células cancerosas pueden entrar en senescencia de manera transitoria, retomando la proliferación posteriormente. Este fenómeno es especialmente relevante tras un tratamiento antitumoral. En estas circunstancias, la entrada en senescencia proporcionaría una vía para evadir el efecto del tratamiento

sobre las células tumorales proliferantes, constituyendo por ello una forma de resistencia que facilitaría la recurrencia de la enfermedad (de Blander *et al*, 2021; Elmore *et al*, 2005). Independientemente de esto, la senescencia también está implicada en el envejecimiento y otros procesos naturales.

Dada la importancia de la senescencia en la persistencia de las células tumorales en los tejidos, y el efecto observado por la sobreexpresión de *HA βTrCP*, decidimos adentrarnos, aunque sólo fuera superficialmente, en el estudio de la senescencia celular. Queríamos averiguar el papel de la sobreexpresión de *HA βTrCP* en células tratadas con dosis subletales de cisplatino como modelo de lo que podría ocurrir en los tejidos de los pacientes trascurrido un tiempo tras el tratamiento con este quimioterápico.

En primer lugar, comprobamos que la diferencia en el número de células observada en los experimentos preliminares entre las líneas U2OS y U2OS::*HA βTrCP* tras dosis bajas de cisplatino no se debía a una diferencia en el ritmo de crecimiento normal de ambas líneas. Con este fin, cultivamos el mismo número de células de las dos líneas y seguimos su proliferación a lo largo del tiempo. El recuento del número de células nos permitió comprobar que ambas líneas evolucionaban de manera muy similar en condiciones normales de crecimiento (**Figura 65**).

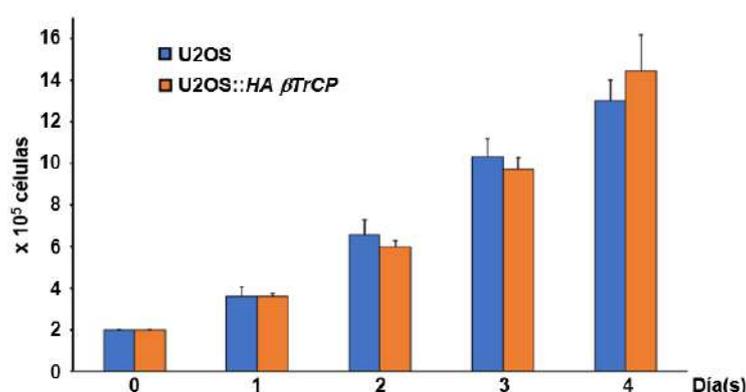


Figura 65. La sobreexpresión de *HA βTrCP* no afecta al ritmo de proliferación celular en condiciones normales. Se cultivaron 200.000 células de cada línea celular en paralelo y, cada 24h, se recolectaron y contabilizaron. Los recuentos diarios de ambas líneas se compararon entre sí con el test *t de Student* de muestras desapareadas, comprobando que no existían diferencias significativas. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

Posteriormente, determinamos la dosis de cisplatino más adecuada para inducir senescencia. Cultivamos las células U2OS en presencia de dosis crecientes de cisplatino de 1 a 10 μ M y observamos al microscopio los cambios morfológicos que tenían lugar a lo largo del tiempo. Elegimos 5 μ M como dosis de trabajo, ya que inducía eficazmente senescencia sobre la práctica totalidad de la población celular a partir del tercer día de cultivo. Esta dosis de cisplatino también provocó senescencia en A549, incluso a partir

del segundo día. Confirmamos la inducción de senescencia detectando la actividad β -galactosidasa lisosomal de células tratadas o no con 5 μ M de cisplatino, según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. En A549 observamos que efectivamente tras 2 días de tratamiento las células presentaban un notable marcaje azul en comparación con el control, lo que certifica la inducción de senescencia a la dosis de cisplatino utilizada (**Figura 66**). Resultados similares se obtuvieron en U2OS (no mostrado).

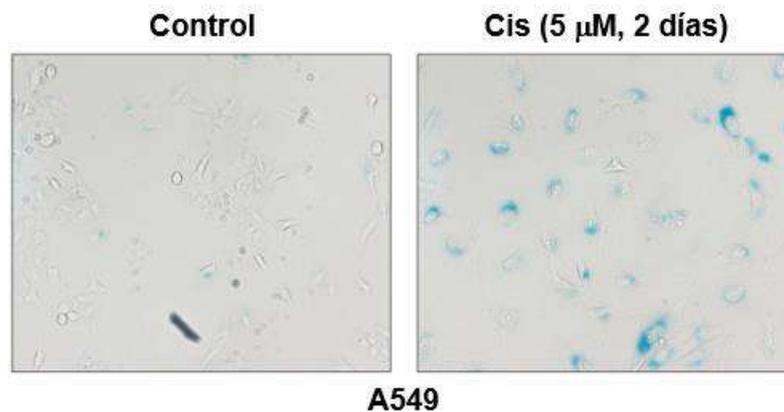


Figura 66. El tratamiento con 5 μ M de cisplatino induce senescencia celular, de acuerdo con la actividad β -galactosidasa lisosomal. Se cultivó el mismo número de células para las dos condiciones del experimento. La adición del cisplatino al medio de cultivo se realizó cuando las células aún estaban solubles. Pasados 2 días, se realizó la tinción en ambas condiciones a la vez. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 10X. El ensayo se realizó por duplicado.

Una vez establecidas las condiciones de estudio, analizamos el comportamiento de U2OS y U2OS::*HA β TrCP* en presencia de 5 μ M de cisplatino durante 7 días de tratamiento. El recuento del número de células día tras día mostró que la línea U2OS dejaba de proliferar, mientras que la línea U2OS::*HA β TrCP* no sólo dejaba de proliferar, sino que a partir del cuarto día reducía su número de células sustancialmente (**Figura 67A**). Analizando en *Western-blot* marcadores de senescencia, comprobamos que en la línea silvestre se producía una acumulación de p53 a partir del primer día, alcanzando su máximo al segundo día y se mantenía así hasta el séptimo día analizado. p21 CIP1, por su parte, tenía un retraso de 24 h respecto a p53, pero también se mantenía hasta el séptimo día. Como se esperaba, este resultado parece reflejar daños en el ADN por el incremento de p53 y parada del ciclo celular por la acumulación de p21 CIP1. En cambio, en la línea que sobreexpresa *HA β TrCP*, el pico de p53 también se producía al segundo día, pero a partir del tercer día iba disminuyendo progresivamente. p21 CIP1, sin embargo, nunca alcanzó los niveles de la línea silvestre y también fue disminuyendo (**Figura 67B**). No obstante, estas caídas en los niveles de p53 y p21 CIP1 son, al menos en parte, reflejo de la falta de proteínas de los extractos analizados derivada de la muerte celular. Estos datos sugieren que la

sobreexpresión de *HA βTrCP* provoca que, pese a la presencia de daños subletales en el ADN, los niveles de p21 CIP1 sean bajos, lo que probablemente impida una parada eficaz del ciclo, desembocando en la muerte celular.

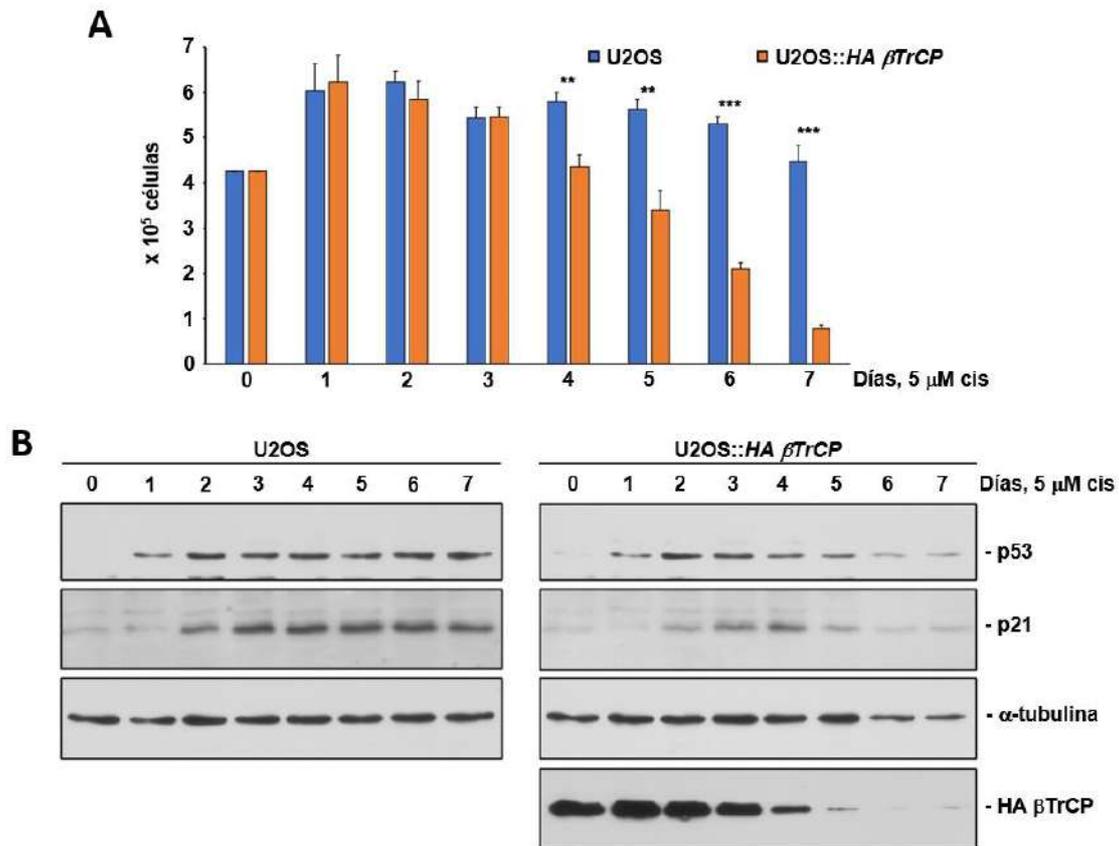


Figura 67. La sobreexpresión de *HA βTrCP* provoca una reducción en el número de células que va acompañada de un menor nivel de p21 CIP1 en condiciones de senescencia. (A) Se cultivaron 425.000 células de cada línea celular en paralelo y se añadió cisplatino al medio de cultivo cuando aún estaban solubles. Cada 24h, las células se recolectaron y contabilizaron. Los recuentos diarios de ambas líneas se compararon entre sí con el test *t de Student* de muestras desapareadas. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$). (B) Las células se trataron como en A, se prepararon extractos totales y se analizaron mediante *Western-blot* las proteínas indicadas.

Tras constatar el efecto descrito, quisimos averiguar si la muerte celular ocurría una vez que la línea había entrado en senescencia o no lograba alcanzar ese estado al tener una cantidad reducida de p21 CIP1. Para ello, al igual que antes, tratamos las células silvestres y transducidas con 5 μM de cisplatino y analizamos la actividad β-galactosidasa a lo largo de los 7 días del ensayo. Como podemos ver en la **Figura 68**, ambas líneas muestran el marcaje azul propio de la senescencia celular, que se va intensificando y generalizando a medida que pasan los días. Sin embargo, en la línea silvestre las células van aumentando su tamaño y se van aplanando, mientras que las que sobreexpresan *HA βTrCP* van desapareciendo. Este resultado nos estaría indicando

que en ambos casos las células entran en senescencia pero que las que sobreexpresan *HA βTrCP* acaban muriendo.

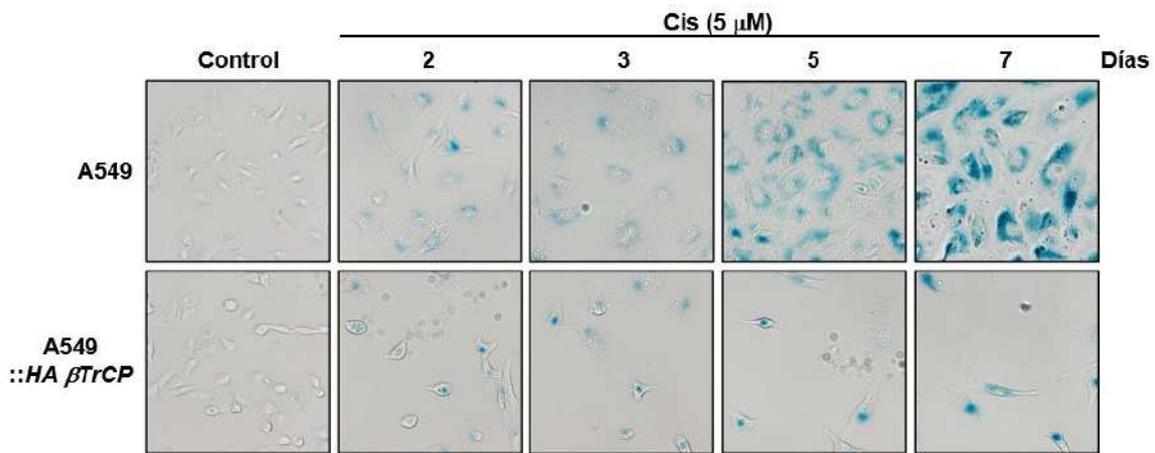


Figura 68. La sobreexpresión de *HA βTrCP* trae consigo una reducción en el número de células posterior a la entrada en senescencia. Se cultivó el mismo número de células para cada una de las condiciones del experimento. La adición del cisplatino al medio de cultivo se realizó cuando las células aún estaban solubles. A partir del segundo día de tratamiento, las tinciones se realizaron en ambas líneas celulares a la vez. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 10X. El ensayo se realizó por duplicado.

Esta diferencia en el comportamiento de las líneas silvestres y transducidas con *HA βTrCP* no sólo se observó en los ensayos de inducción de senescencia con cisplatino. También obtuvimos resultados similares al someter las células a senescencia oxidativa inducida por H_2O_2 . En estos ensayos tratamos las líneas celulares durante 2 h con dosis subletales de H_2O_2 y, pasados 3 días desde el tratamiento, cuantificamos el número de células en cada caso. En paralelo, hicimos recuento de los cultivos de las líneas celulares sin tratar, como control de proliferación. En la **Figura 69** observamos que las líneas que sobreexpresan *HA βTrCP* presentan un número de células significativamente menor al de la correspondiente línea silvestre cuando son tratadas con H_2O_2 . Estos resultados evidencian que la sobreexpresión de *HA βTrCP* también induce la muerte celular en células sometidas a estrés oxidativo.

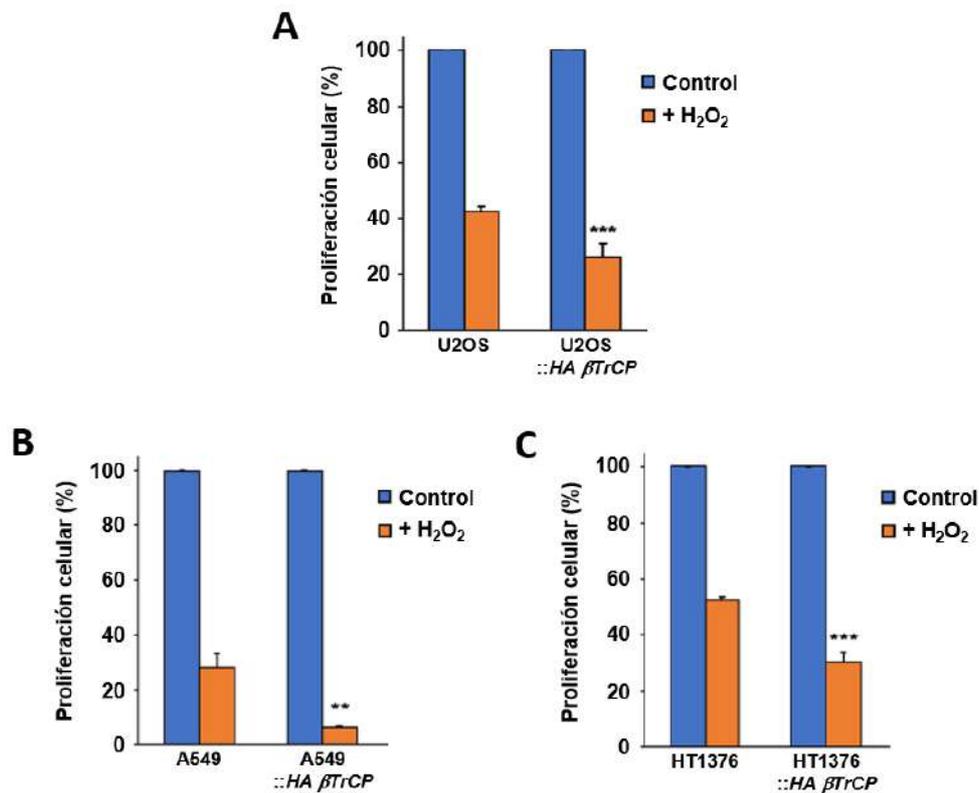


Figura 69. Las líneas celulares que sobreexpresan $HA \beta TrCP$ reducen su número de células también en condiciones de senescencia oxidativa. Los ensayos se realizaron en las líneas (A) U2OS y U2OS:: $HA \beta TrCP$, (B) A549 y A549:: $HA \beta TrCP$ y (C) HT1376 y HT1376:: $HA \beta TrCP$. En cada caso, se cultivó el mismo número de células de la línea silvestre y su equivalente transducida, tanto en la condición control como en la tratada con H_2O_2 . El tratamiento se realizó 24h tras la siembra. Los recuentos de las líneas silvestres y transducidas tras el tratamiento se compararon entre sí con el test *t de Student* de muestras despareadas. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

Para averiguar si la sobreexpresión de $HA \beta TrCP$ tenía un papel en la estabilidad de p21 CIP1, ya sea directa o indirectamente, decidimos en primer lugar tratar las células A549 y A549:: $HA \beta TrCP$ con 5 μM de cisplatino para inducir senescencia, y después bloquear las dos principales rutas de degradación de proteínas 24 h antes de la recogida. Estas rutas, como ya describimos en la *Introducción*, pueden ser la vía del proteasoma o la vía de la autofagia/lisosoma (Schreiber & Peter, 2014; Kirkin *et al*, 2009a). Así, utilizamos NH_4Cl como inhibidor de la autofagia y MG132 como inhibidor del proteasoma. En la **Figura 70A** se muestra que el tratamiento con NH_4Cl no facilitó la acumulación de p21 CIP1 en A549:: $HA \beta TrCP$. Sin embargo, el tratamiento con MG132 sí lo logró en gran medida. En la **Figura 70B** se comparan ambas líneas en condiciones de senescencia y tras el tratamiento únicamente con MG132 durante las 3 h previas a la recogida. Estos resultados indican que en la línea A549:: $HA \beta TrCP$ se está produciendo una degradación activa de una proteína vía proteasoma, que trae consigo una disminución de p21 CIP1, sea el propio p21 CIP1 o alguna proteína implicada en su regulación.

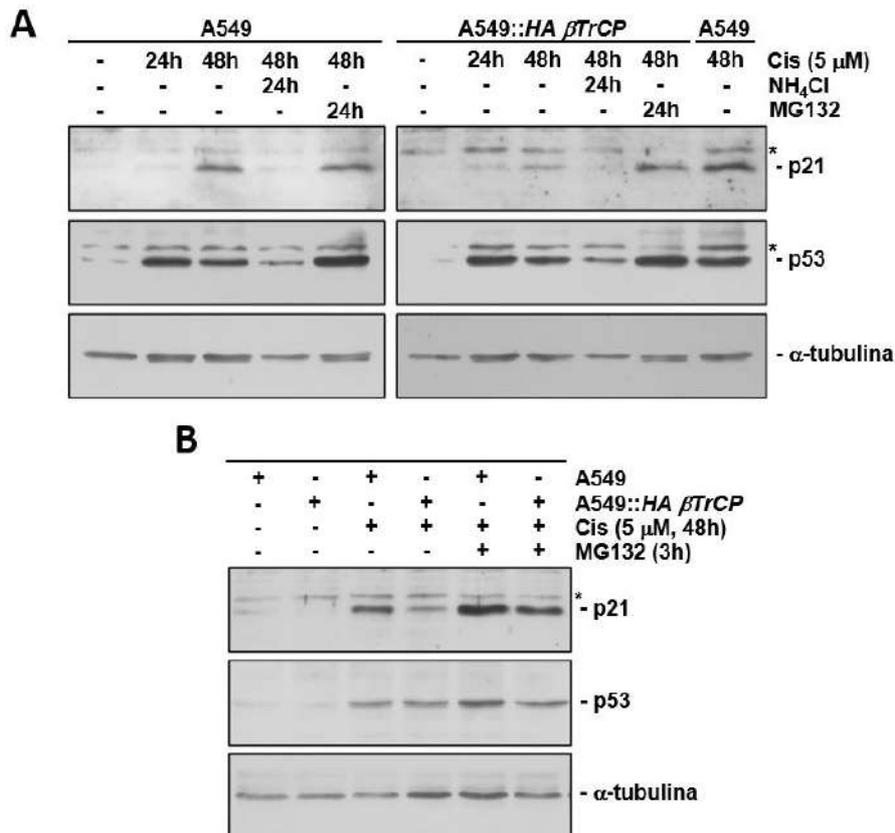


Figura 70. El bloqueo de la vía del proteasoma produce una acumulación de p21 CIP1 en condiciones de senescencia en la línea que sobreexpresa HA β TrCP. En ambos ensayos se cultivó el mismo número de células en cada una de las condiciones experimentales. La adición del cisplatino al medio de cultivo se realizó cuando las células aún estaban solubles. (A) Las líneas celulares recibieron los tratamientos indicados tras la inducción de senescencia con cisplatino. Posteriormente, se prepararon extractos totales y se analizaron las proteínas indicadas mediante *Western-blot*. (B) Como en A, pero modificando el tiempo de MG132. Los ensayos se realizaron por duplicado. *: banda inespecífica.

Por último, para confirmar que en esta degradación intervenía HA β TrCP, redujimos los niveles de esta proteína F-box en las células A549::HA β TrCP mediante silenciamiento génico transitorio utilizando para ello un siRNA específico contra HA β TrCP. Las células interferidas fueron sometidas a senescencia en las condiciones habituales y comprobamos que el silenciamiento de HA β TrCP permitía la acumulación de p21 CIP1. Sin embargo, esto no ocurría al utilizarse un siRNA no relacionado (**Figura 71**). Por tanto, en condiciones de senescencia la sobreexpresión de HA β TrCP estaría provocando la desestabilización de p21 CIP1, o de alguna proteína que interviene en su regulación, que se degradaría a través del proteasoma.

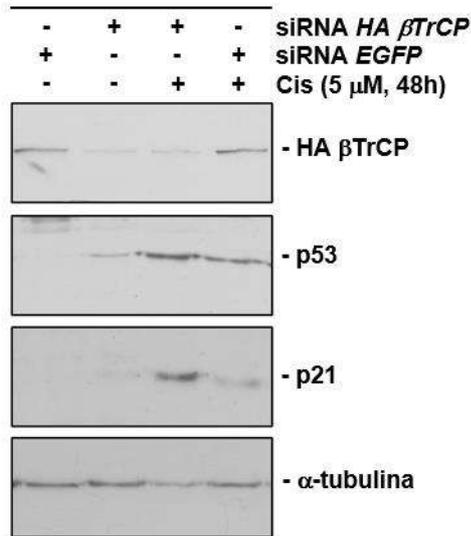


Figura 71. El silenciamiento génico transitorio de *HA βTrCP* permite una acumulación de p21 CIP1 en condiciones de senescencia. Las células A549::*HA βTrCP* fueron interferidas con los siRNAs indicados. Pasadas 48h, las células fueron levantadas, contabilizadas y se sembraron cantidades equivalentes para el tratamiento con cisplatino. Este fármaco se añadió al medio de cultivo cuando las células aún estaban solubles. Tras otras 48h, las células fueron recogidas, se prepararon extractos totales y se analizaron mediante *Western-blot* las proteínas señaladas. El ensayo se realizó por duplicado.

En conjunto, estos resultados sugieren que la muerte de las células senescentes causada por la sobreexpresión de *HA βTrCP* se debe a la desestabilización de p21 CIP1. Sin embargo, se requieren más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Discusión

1. El complejo MRN, un nuevo sustrato de las ligasas de ubiquitina SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7).

La degradación de proteínas cumple multitud de funciones biológicas en la célula, desde el reciclaje de proteínas plegadas de manera errónea, la eliminación de aquellas que ya no resultan útiles o están dañadas, o el control de la cantidad de sustratos específicos, permitiendo así, por citar algún ejemplo, el correcto avance del ciclo o la división celulares. Al ser un fenómeno tan importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, la desregulación de la estabilidad de las proteínas puede alterar dramáticamente la maquinaria de la célula, jugando así un papel clave en la aparición y desarrollo de diversos procesos patológicos, entre ellos el cáncer. Por tanto, resulta fundamental comprender los mecanismos moleculares que rigen la ubiquitilación de proteínas y su posterior degradación. Entre los actores principales del proceso de ubiquitilación destacan las enzimas E3 o ligasas de ubiquitina, que acoplan la molécula de ubiquitina al sustrato específico objeto de la reacción. En nuestro grupo de investigación estudiamos una E3 de tipo culina-RING: el complejo SCF. En particular, nos centramos en aquellos complejos SCF que poseen como proteína F-box β TrCP y FBXW7, dos de las proteínas de su clase mejor caracterizadas, con el objetivo de encontrar nuevos sustratos que puedan ser relevantes en la biología de la célula cancerosa. En concreto, en esta Tesis nos hemos ocupado del estudio del complejo formado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1, como potencial nuevo sustrato de las ligasas de ubiquitina SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7). Así, en esta primera sección de la *Discusión* abordaremos los aspectos esenciales de las interacciones observadas entre las proteínas F-box β TrCP y FBXW7 y el complejo MRN.

Nuestro estudio sobre estas asociaciones tuvo su origen, como ya se ha mencionado en los *Resultados*, en ensayos previos en los que se analizaron las proteínas asociadas a HA β TrCP y Flag FBXW7 por espectrometría de masas en tándem. Entre las proteínas identificadas en la inmunoprecipitación de HA β TrCP se detectaron dos de las proteínas del complejo, RAD50 y NBS1 (Herrero-Ruiz, 2015), mientras que en la inmunoprecipitación de Flag FBXW7 sólo se identificó a MRE11 como miembro del complejo MRN (Giráldez, 2014). En la literatura también se han publicado estudios en los que identifican componentes del complejo MRN en los análisis proteómicos de inmunoprecipitados de estas proteínas F-box. Concretamente, se ha identificado a MRE11 en inmunoprecipitados de Flag-HA β TrCP (Magliozzi *et al*, 2015), y a NBS1 en ensayos en los que inmunoprecipitan Flag FBXW7 α o la proteína FBXW7 α endógena (Hänle-Kreidler *et al*, 2022; Arabi *et al*, 2012). Estos datos avalan nuestros resultados de espectrometría de masas, aunque no detecten exactamente los mismos componentes del complejo MRN. Hay que señalar que Magliozzi y colaboradores estudian β TrCP2, mientras que nosotros estudiamos β TrCP1, aunque ambas isoformas pueden compartir sustratos al presentar funciones redundantes

(Nakayama *et al*, 2003; Suzuki *et al*, 2000). En cualquier caso, estos autores sólo identificaron las proteínas, sin llevar a cabo estudios adicionales.

La confirmación de que existía realmente una asociación *in vivo* entre β TrCP y FBXW7 y el complejo MRN la llevamos a cabo realizando ensayos de inmunoprecipitación tanto de las proteínas F-box como de las del complejo. Así, descubrimos que esta interacción es sólida, constante y repetitiva, y la encontramos tanto al inmunoprecipitar las proteínas F-box en transfección transitoria, como al inmunoprecipitar cada uno de los componentes endógenos del complejo MRN de manera individual. Además, y lo que es más importante, también detectamos las asociaciones inmunoprecipitando las proteínas F-box endógenas, sin transfección. En este caso no pudimos realizar las inmunoprecipitaciones inversas ya que no disponemos de anticuerpos para las proteínas F-box que funcionen adecuadamente en *Western-blot*. La detección de las asociaciones endógenas es especialmente relevante porque existen estudios que han detectado las interacciones utilizando fundamentalmente técnicas de transfección, sin reproducirlas apenas en condiciones endógenas (Cheng *et al*, 2016; Ci *et al*, 2018; Cassavaugh *et al*, 2011).

A continuación, nuestro interés se centró en estudiar si las proteínas del complejo MRN eran sustratos de las ligasas de ubiquitina, es decir, si SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7) eran capaces de ubiquitilarlas. Tras realizar los pertinentes ensayos de ubiquitilación *in vitro* e *in vivo* pudimos comprobar que SCF(β TrCP) poliubiquitilaba *in vitro* a las 3 proteínas del complejo MRN, mientras que *in vivo* sólo pusimos de manifiesto la ubiquitilación de MRE11 mediante ubiquitinas unidas a través de la lisina 63. Por su parte, SCF(FBXW7) poliubiquitilaba *in vitro* únicamente a MRE11 e *in vivo* a las 3 proteínas del complejo mediante ubiquitinas unidas a través de la lisina 48. El posible significado fisiológico de estas poliubiquitilaciones lo abordaremos en la siguiente sección de esta *Discusión*.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de ensayos de ubiquitilación, *in vitro* e *in vivo*, no tienen por qué ser necesariamente equivalentes. Por lo general, los ensayos de ubiquitilación *in vitro* suelen aportar más resultados positivos que los ensayos *in vivo*, que dependen de factores propios del contexto celular. Así, puede ocurrir que una proteína se poliubiquitile *in vitro*, pero no *in vivo*. Esto podría indicar que dicha proteína posee la secuencia aminoacídica necesaria para ser reconocida por la proteína F-box en cuestión, lo que permite que se poliubiquitile *in vitro*, pero que en la célula no ocurre de manera natural, bien porque la proteína interactúe con otras que eviten el reconocimiento por parte de la proteína F-box, bien porque la proteína F-box y la proteína potencialmente sustrato se encuentren en compartimentos celulares diferentes, etc. Además, dada la complejidad de las redes celulares de señalización y la diversidad de estímulos a los que puede estar sometida la célula, también puede ocurrir que esa poliubiquitilación sólo ocurra *in vivo* en respuesta a determinados estímulos que la desencadenen, los cuales pueden no estar contemplados en los

ensayos de ubiquitilación *in vivo*. Por otra parte, también puede que una proteína sea poliubiquitilada en los ensayos *in vivo*, pero no en los *in vitro*. Basándonos también en la idea anterior, esto puede deberse a que el contexto fisiológico de la célula aporte la regulación o señalización necesarias para que la poliubiquitilación tenga lugar en el ensayo *in vivo*, condiciones que pueden no tener los ensayos *in vitro*, en nuestro caso los extractos de reticulocitos, pese a que estos extractos son bioquímicamente muy activos. En nuestro estudio, el hecho de que estemos ante un complejo constituido por tres proteínas distintas dificulta aún más la obtención de resultados positivos en los ensayos de ubiquitilación *in vitro*, ya que podría ocurrir que la proteína F-box no se asociase directamente a cada proteína del complejo. Si sólo se asociase a una de ellas, pero poliubiquitilase a las tres, podríamos obtener resultados negativos en los ensayos *in vitro*, pero positivos en los *in vivo*, ya que en los extractos de reticulocitos empleados podría no haber suficiente cantidad del resto de las proteínas de complejo al margen de la producida previamente por transcripción-traducción *in vitro*. Esto podría explicar por qué sólo vemos poliubiquitilación de SCF(FBXW7) *in vitro* sobre MRE11, mientras que *in vivo* se observa sobre todos los componentes del complejo MRN. En base a esto, concluimos que el complejo MRN interaccionaría con FBXW7 a través de MRE11.

En lo que respecta a β TrCP, teniendo en cuenta todo lo anterior, las tres proteínas del complejo poseerían motivos para ser poliubiquitiladas *in vitro* por SCF(β TrCP). Sin embargo, en las condiciones fisiológicas ensayadas, únicamente MRE11 actuaría como sustrato *in vivo* de esta ligasa. RAD50 y NBS1 podrían no exponer los sitios de poliubiquitilación cuando forman el complejo o tenerlos modificados en las condiciones analizadas. Quizá sea necesario algún estímulo para que los sitios sean accesibles para su ubiquitilación, o cualquier otro motivo. Además, otros autores han descrito la participación de proteínas puente entre el complejo ligasa de ubiquitina y el sustrato. Este sería el caso de la proteína NORE1A, que se une a β TrCP para promover la interacción y poliubiquitilación de algunos sustratos específicos, como MDM2 o β -catenina (Schmidt *et al*, 2016, 2014), o la proteína UBTD1, que se asocia a β TrCP y promueve su interacción con YAP y posterior poliubiquitilación (Torrino *et al*, 2019). Por tanto, los estudios de poliubiquitilación *in vivo* pueden resultar muy complejos.

El siguiente aspecto que abordamos, muy relacionado con el anterior, fue intentar clarificar si la interacción entre las proteínas F-box y el complejo MRN estaba mediada por una o varias proteínas del mismo. Con la información obtenida en los ensayos de ubiquitilación no pudimos aclarar este extremo, por lo que decimos analizar *in silico* las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas para intentar encontrar motivos de interacción, o degrones, compatibles con las secuencias consenso publicadas y realizar un análisis mutacional. Esta tarea no es nada simple, dada la flexibilidad en las secuencias de los degrones caracterizados hasta el momento, que pueden alejarse bastante de la considerada como estándar o ser totalmente diferente a ella (Wang *et*

al, 2014c; Yumimoto & Nakayama, 2020). Además, el hecho de que estemos analizando la interacción de dos proteínas F-box con un complejo heterohexamérico, compuesto de dos subunidades de MRE11, dos de RAD50 y otras dos de NBS1, dificulta aún más la labor. Así, β TrCP y FBXW7 podrían asociarse a uno, a dos o a los tres componentes del complejo, lo que complicaría el estudio mutacional para obtener pérdida de interacción con las proteínas F-box. Por ejemplo, si una de las proteínas F-box se asocia a dos componentes del complejo, al mutar uno de ellos sólo se obtendría una pérdida parcial de la interacción, en el mejor de los casos. E Incluso aunque cada proteína F-box se asocie únicamente a un componente del complejo, seguiría siendo difícil obtener una pérdida completa de la interacción, ya que, a pesar de que se sobreexpresa una forma mutante siempre podría formar dímero con la forma endógena silvestre y asociarse a la proteína F-box. Si a todo esto añadimos la posibilidad de que otras proteínas actúen como intermediarias en las asociaciones y que estas no sean directas, el grado de dificultad es aún superior. No obstante, al realizar este estudio confiábamos en poder distinguir cuándo una mutación afecta a las asociaciones y cuándo no.

La metodología de trabajo empleada para la identificación y validación de los putativos degrones fue la misma para ambas proteínas F-box: identificar los motivos *in silico*, mutar la treonina o serina potencialmente fosforilable y, si no se obtenía un resultado favorable, ampliar el número de mutaciones en el “degrón”. Empezamos modificando únicamente la primera serina o treonina del motivo porque las interacciones entre β TrCP y FBXW7 y sus sustratos dependen normalmente de fosforilaciones en estos aminoácidos (Frescas & Pagano, 2008; Lau *et al*, 2012). Así, si no tenían lugar estas fosforilaciones, podríamos detectar pérdida o una menor interacción entre las versiones mutantes generadas y las proteínas F-box en ensayos de co-inmunoprecipitación. Como no obtuvimos resultados concluyentes, incrementamos el número de mutaciones modificando los demás aminoácidos fosforilables, e incluso los aminoácidos ácidos que pudieran actuar como fosfomiméticos. Aún así, sólo obtuvimos resultados favorables con el mutante MRE11 $\Delta\beta$ T, en un potencial degrón para β TrCP. Este mutante perdía sustancialmente la interacción con β TrCP y afectaba de una manera importante a las asociaciones de RAD50 y NBS1 con esta proteína F-box. Como la mutación de MRE11 no afectaba a la formación del complejo MRN, podemos deducir que β TrCP se asocia *in vivo* al complejo MRN a través de MRE11, aunque probablemente se requieran estudios con proteínas purificadas para demostrar directamente que el motivo mutado es responsable de la asociación a β TrCP.

El potencial degrón de β TrCP identificado en MRE11 fue ⁵⁹⁶ DTGLETST ⁶⁰³, donde la parte subrayada especifica la secuencia que se asemeja al motivo consenso para esta proteína F-box: D-S-G-X₂₋₃-S. Piscitello y colaboradores observaron, mediante análisis *in silico*, que la treonina 597 de MRE11 era un residuo potencialmente fosforilable por

p70S6K, al encontrarse dentro de una secuencia consenso para esta quinasa. En este estudio, indican que la fosforilación de MRE11 en dicho residuo provoca su desestabilización y degradación (Piscitello *et al*, 2018), sin especificar qué mecanismos participan en ello. Desafortunadamente, en nuestras condiciones y modelos de estudio, no hemos podido observar esos cambios en la estabilidad de MRE11.

En RAD50 la secuencia más parecida a un posible degrón para β TrCP fue ⁷⁸³ ESAKVCLT ⁷⁹⁰, aunque se aleja bastante de la secuencia consenso. Por su parte, en NBS1 el posible degrón identificado, ²⁷² DTGITNS ²⁷⁸, fue similar al encontrado en MRE11. No obstante, ni en el caso de RAD50 ni en el de NBS1 se obtuvieron resultados de pérdida o reducción de la interacción con β TrCP. El hecho de que ambas proteínas del complejo de ubiquitilación en los ensayos *in vitro* nos lleva a pensar que los putativos sitios de interacción con β TrCP en estas proteínas podrían no seguir la secuencia consenso descrita.

En lo que se refiere a los mutantes en los posibles degrones para FBXW7, no obtuvimos ningún resultado positivo. De hecho, en la secuencia aminoacídica de MRE11 ni siquiera llegamos a identificar un potencial degrón para esta proteína F-box. Si pensamos, como señalamos anteriormente, que SCF(FBXW7) podría asociarse al complejo MRN a través de MRE11, es muy posible que esta proteína presente un motivo de interacción no consenso, como se ha descrito en tantos otros sustratos (Yumimoto & Nakayama, 2020). Por su parte, los motivos identificados en RAD50 y NBS1 tampoco arrojaron resultados positivos. Si la parte central del motivo consenso habitual para FBXW7, también denominado CPD, es S/T-P-P-X-S/T (asumiendo una región previa de aminoácidos hidrofóbicos), vemos que las secuencias identificadas tanto en RAD50, ⁹¹² VSPLETT ⁹¹⁸, como en NBS1, ³³⁷ TPGPSLS ³⁴³, se alejan del consenso. Sin embargo, en relación con este último caso, se ha publicado que la proteína LSD1 interacciona con FBXW7 a través de un CPD conservado entre diferentes especies, que posee la secuencia exacta del motivo que identificamos en NBS1: TPGPS (Lan *et al*, 2019). No obstante, aunque la secuencia sea la misma, no necesariamente tiene que haber interacción entre FBXW7 y NBS1, ya que puede que esta secuencia ni siquiera sea accesible para FBXW7 en la conformación que presente en NBS1, o simplemente porque no se dé la regulación específica que permita dicha asociación en la célula. Por otro lado, junto al putativo CPD de NBS1 se encuentra la serina 343, la cual es fosforilada por la quinasa ATM en respuesta a daños en el ADN (Lim *et al*, 2000; Gatei *et al*, 2000). Los ensayos de pérdida de interacción con las proteínas F-box se realizaron en condiciones normales de crecimiento en cultivo, pero no tras someter a las células a estrés genotóxico, por lo que es muy probable que la fosforilación de este aminoácido no estuviera ocurriendo en esas condiciones. Por tanto, cabe la posibilidad de que tras daños en el ADN sí hubiera resultados interesantes.

Los degrones reconocidos por las proteínas F-box de nuestro estudio son realmente fosfodegrones, ya que normalmente se requiere que el motivo esté

fosforilado en residuos específicos para que pueda darse el reconocimiento. Por ello, creímos importante intentar averiguar qué quinasa(s) podía(n) ser las responsables de tales fosforilaciones. Centramos nuestra atención especialmente en la quinasa GSK3 ya que esta es la quinasa que media gran parte de las interacciones entre SCF(β TrCP) y SCF(FBXW7) y sus sustratos (Robertson *et al*, 2018; Heo *et al*, 2016). GSK3 interviene en múltiples rutas de señalización intracelulares, como la vía WNT/ β -catenina, NOTCH, Hedgehog o de receptores acoplados a proteínas G. Se trata de una quinasa que suele estar activa en células sin estimular y su regulación se basa en el descenso de su actividad quinasa (Sutherland, 2011; Frame & Cohen, 2001; Kim *et al*, 2011b). Así, existen diferentes mecanismos que la regulan, como pueden ser ciertas modificaciones post-traduccionales como las fosforilaciones con función inhibitoria, aunque otras son necesarias para su actividad catalítica, o las acetilaciones (Sutherland *et al*, 1993; Sundaresan *et al*, 2015; Cole *et al*, 2004). Además, también puede regularse por medio de la desestructuración de ciertos complejos de los que forma parte, como el complejo encargado de la degradación de β -catenina (MacDonald *et al*, 2009). GSK3 reconoce y fosforila serinas o treoninas que se encuentran en el siguiente motivo general: S/T*-X₃₋₄-S/T**. En concreto, fosforila el residuo marcado con un sólo asterisco, que constituye la fosforilación reguladora de la interacción entre los sustratos y la proteína F-box (Fiol *et al*, 1990). Sin embargo, para que tenga lugar esta fosforilación, suele ser necesario que con anterioridad ocurra una fosforilación cebadora en el residuo marcado con dos asteriscos, y esta fosforilación previa suele depender de otra quinasa distinta a GSK3. De este modo, dependiendo del sustrato específico, la fosforilación cebadora puede ser llevada a cabo por una quinasa u otra. Por ejemplo, la quinasa CK1 realiza la fosforilación cebadora de sustratos como APC, β -catenina o MDM2 (Ferrarese *et al*, 2007; Kulikov *et al*, 2005; Liu *et al*, 2002), mientras que CDK5 la realiza en sustratos como CLASP2, CRMP1 o CRMP2 (Watanabe *et al*, 2009b; Cole *et al*, 2006), por citar algunos ejemplos.

Si comparamos la secuencia reconocida por GSK3, S/T*-X₃₋₄-S/T**, con la secuencia del fosfodegrón reconocido por β TrCP, D-S*-G-X₂₋₃-S**, comprobamos que se asemejan bastante. El aminoácido fosforilable por GSK3 sería la primera serina (o treonina) localizada en N-terminal del fosfodegrón, marcada con un asterisco, mientras que la siguiente serina/treonina, localizada en el extremo C-terminal, presentaría la fosforilación cebadora que llevaría a cabo otra quinasa. Observando la secuencia del fosfodegrón para β TrCP identificado en MRE11, ⁵⁹⁶ DT*GLET**ST ⁶⁰³, vemos que también presenta un patrón que podría ser reconocido por GSK3, participando en la fosforilación de la treonina marcada con un solo asterisco. Independientemente de cuál fuese la quinasa que realizase la fosforilación cebadora, resulta evidente que la inhibición de GSK3 impediría que tuviera lugar la fosforilación reguladora del reconocimiento por la proteína F-box y, por tanto, debería romper la interacción entre esta y el sustrato. Esto nos llevó a analizar si la inhibición química de GSK3 con CHIR-99021 sería capaz de afectar a la asociación entre β TrCP y el complejo

MRN. Comprobamos que el tratamiento, efectivamente, reducía de manera considerable esta interacción, lo que refleja que GSK3 está interviniendo en la asociación, como ocurre con otros sustratos de SCF(β TrCP).

También estudiamos la posible participación de la quinasa p70S6K en la interacción entre β TrCP y el complejo MRN ya que, como mencionamos anteriormente, esta quinasa fosforila el residuo T597 de MRE11 (Piscitello *et al*, 2018), que se encuentra en el fosfodegrón identificado (⁵⁹⁶ DT*GLETST ⁶⁰³). En ese estudio, comprobaron que p70S6K fosforilaba a MRE11 mediante ensayos quinasa *in vitro* utilizando la quinasa recombinante, y posteriormente detectaron por espectrometría de masas que la fosforilación tenía lugar fundamentalmente en el residuo T597. Aunque no llegaron a comprobar que esa fosforilación también tenía lugar *in vivo*, sí que mostraron que el cambio de la treonina 597 por alanina hacía que MRE11 fuera más estable que su equivalente silvestre. Además, el tratamiento con PF-4708671, un inhibidor de p70S6K, también provocaba una acumulación de MRE11 (Piscitello *et al*, 2018). Basándose en estos resultados, y en ciertos datos de un estudio previo que apuntan en la misma dirección (Liu *et al*, 2015), concluyen que la fosforilación de MRE11 en la treonina 597 debida a p70S6K promueve la degradación de la proteína. Dado que este residuo se encuentra en el degrón que hemos identificado para β TrCP, cabe pensar que esta proteína F-box podría intervenir en el proceso descrito. Sin embargo, como ya mencionamos, en nuestros modelos y condiciones celulares no hemos detectado cambios de estabilidad en MRE11 asociados a la mutación de la treonina 597, ni tampoco a la sobreexpresión de β TrCP, lo que no descarta que puedan tener lugar bajo otras condiciones experimentales.

p70S6K es una de las isoformas de la quinasa S6K1, que pertenece a su vez a la familia de proteínas S6Ks. Se trata de quinasas de serina/treonina que participan en la regulación de procesos celulares tales como el crecimiento, la supervivencia o el metabolismo (Pearce *et al*, 2010). Estas quinasas actúan como efectoras de la vía mTOR, que juega un papel clave en la regulación de su actividad. La activación de p70S6K depende de una serie de fosforilaciones iniciales que permiten que se exponga una región interna de la proteína, donde, a continuación, fosforilará mTOR seguido por otras quinasas, culminando con la activación de la quinasa p70S6K (Burnett *et al*, 1998a, 1998b; Magnuson *et al*, 2012; Pullen *et al*, 1998). Otro tipo de modificaciones post-traduccionales también pueden regular su actividad. Así, su acetilación bloquea la fosforilación llevada a cabo por mTOR, evitando con ello su activación (Hong *et al*, 2014). p70S6K reconoce el motivo R-X-R-X₂-S/T*, fosforilando la serina o treonina marcada con el asterisco (Fenton & Gout, 2011). Si analizamos la región previa a la secuencia del fosfodegrón para β TrCP identificado en MRE11, nos encontramos la siguiente secuencia: ⁵⁹⁰ *SQRGRADT**GLETST ⁶⁰³ (el fosfodegrón está subrayado). Vemos que la región marcada en cursiva coincide perfectamente con el motivo reconocible por p70S6K, y el residuo de treonina que fosforilaría, el T597, marcado con un

asterisco, está dentro de la secuencia del fosfodegrón. Con esta información y con los datos publicados en la literatura, nos preguntamos si la inhibición de esta quinasa impediría la fosforilación responsable del reconocimiento de MRE11 por parte de β TrCP. Y efectivamente, utilizando PF-4708671, el inhibidor químico de p70S6K, comprobamos que la asociación entre esta proteína F-box y el complejo MRN se veía afectada.

En resumen, tanto GSK3 como p70S6K podrían mediar en la interacción entre SCF(β TrCP) y el complejo MRN, probablemente mostrando cada quinasa una mayor actividad en una situación fisiológica diferente. Además, existe una relación directa entre ambas quinasas, ya que se ha publicado que GSK3 puede regular positivamente la actividad de p70S6K por medio de fosforilaciones en residuos específicos (Shin *et al*, 2011), mientras que p70S6K es capaz de fosforilar e inhibir a GSK3 en determinadas circunstancias y modelos celulares (Zhang *et al*, 2006). Sin embargo, como mostramos en los *Resultados*, las pérdidas de interacción detectadas en los ensayos en presencia de los inhibidores de las quinasas no fueron generalmente completas. Esto podría deberse a que en la célula existen otras quinasas que podrían tomar el relevo de la quinasa inhibida. Sin ir más lejos, GSK3 y p70S6K fosforilan en el mismo residuo de MRE11 con lo que, en circunstancias determinadas, una podría suplir a la otra. Quizá el tratamiento simultáneo con ambos inhibidores podría impedir más claramente la interacción entre β TrCP y MRE11. Aparte de esto, habría que considerar otras cuestiones menos fisiológicas como el hecho de que los inhibidores o las concentraciones empleadas no sean lo suficientemente eficaces.

Finalmente, comparando la secuencia que reconoce GSK3 en sus sustratos, S/T*-X₃₋₄-S/T**, con la región central del motivo consenso para FBXW7, S/T*-P-P-X-S/T**, podemos también observar una clara similitud entre ambas. De hecho, los posibles degrones que identificamos en RAD50 y NBS1 para FBXW7 presentan una estructura que podría ser reconocida y fosforilada por GSK3, si bien es cierto que la mutación de estos no aportó pérdidas de interacción con la proteína F-box. Pese a ello, verificamos también en este caso que la inhibición de GSK3 disminuyó la asociación entre el complejo MRN y FBXW7. No obstante, al no conocer a través de qué proteína(s) ocurre la interacción, no hemos podido profundizar más en este aspecto.

2. Efecto fisiológico de la asociación de β TrCP y FBXW7 con el complejo MRN.

La caracterización fisiológica de la interacción de β TrCP con el complejo MRN ha sido menos profunda que la llevada a cabo entre FBXW7 y dicho complejo, principalmente por la falta del tiempo y la gran cantidad de trabajo que ha supuesto este estudio. No obstante, hemos podido obtener algunos datos preliminares que señalan que SCF(β TrCP) interacciona y poliubiquitila al complejo MRN para promover su localización en la cromatina. En esta función estaría implicado fundamentalmente MRE11, al ser el único componente del complejo que se poliubiquitila *in vivo* por SCF(β TrCP). Este resultado tiene gran interés, ya que se conoce poco sobre el papel de β TrCP en la localización o el reclutamiento de mediadores específicos de las rutas de reparación de los daños en el ADN. Sin embargo, existen numerosos ejemplos en los que la función de esta proteína F-box en el ámbito del daño en el ADN se basa en la ubiquitilación y degradación de proteínas clave en los procesos de señalización y reparación. Además de las mencionadas en la *Introducción*, SCF(β TrCP) es capaz de poliubiquitilar a XLF, previa fosforilación por AKT y disociación del complejo XRCC4/Ligasa IV/XLF, induciendo su degradación e impidiendo la NHEJ (Gan *et al*, 2015; Liu *et al*, 2015). Asimismo, es capaz de reconocer y ubiquitilar a la quinasa CHK1, esencial en la cascada de señalización de los daños, induciendo su degradación bajo condiciones específicas (Ma *et al*, 2019). De manera similar, SCF(β TrCP) puede asociarse a la topoisomerasa TOP2 β y ubiquitilarla, induciendo su degradación en condiciones de estrés genotóxico (Shu *et al*, 2020).

La ubiquitilación de proteínas juega un papel fundamental en la respuesta a los daños en el ADN. De hecho, en los sitios de daño se puede detectar una gran acumulación de ubiquitinas inmediatamente después de producirse la lesión. La ubiquitilación de las histonas es uno de los eventos iniciales que promueve la desestabilización de los nucleosomas para la reparación. Esta modificación post-traduccional también favorece el reclutamiento de ciertas proteínas en los focos de daño del ADN (Brinkmann *et al*, 2015). Una de las ligasas de ubiquitina más relevantes en la reparación es RNF8, que se incorpora a los sitios de daño reconociendo en ellos a la proteína MDC1 fosforilada por ATM. RNF8 suele actuar junto con la enzima de conjugación de ubiquitinas UBC13 para catalizar la ubiquitilación de una variedad de proteínas diana por medio de ubiquitinas unidas a través de la lisina 63. Estas poliubiquitilaciones sirven a su vez de señal de reclutamiento de otros factores a los sitios de daños, entre ellos BRCA1 (Chen & Sun, 2009). En el caso de los componentes del complejo MRN, también se ha estudiado la relevancia de la ubiquitilación en su funcionalidad. Por ejemplo, se ha descrito que RNF8 interacciona con NBS1 y lo ubiquitila, mediante ubiquitinas unidas por la lisina 6, favoreciendo su correcta localización en los puntos de rotura del ADN (Lu *et al*, 2012). La ligasa de ubiquitina SCF(SKP2) también interacciona y ubiquitila a NBS1, en este caso mediante ubiquitinas

unidas por la lisina 63, lo que facilita su interacción con ATM y el reclutamiento en las DSBs. Así, las células que carecen de SKP2 presentan una HR defectuosa, y muestran una mayor sensibilidad a la radiación ionizante (Wu *et al*, 2012). La ubiquitilación de otras proteínas que participan en los procesos de reparación de los daños, como la helicasa BLM, también puede regular su interacción con el complejo MRN. De nuevo, RNF8 se encarga de poliubiquitar a BLM permitiendo así su interacción con NBS1, un paso esencial para garantizar la incorporación de esta helicasa a los puntos de rotura del ADN. La actividad de BLM permitirá a su vez el acceso de otros factores implicados en la reparación de los daños (Tripathi *et al*, 2018).

En nuestros ensayos, hemos observado que la sobreexpresión de HA β TrCP en células cultivadas en condiciones estándar incrementa la presencia de las proteínas del complejo MRN en la cromatina. Este resultado sugiere que β TrCP estaría implicada en la localización de MRN en el ADN a través de la poliubiquitilación de MRE11 cuando el ADN no está dañado o tras los daños replicativos u otros que se puedan producir durante el crecimiento y división celulares. De hecho, las quinasas que hemos implicado en la poliubiquitilación de MRE11, es decir, GSK3 y p70S6K, están activas en condiciones normales de crecimiento, como se ha mencionado anteriormente. Quizás β TrCP promovería el desplazamiento a la cromatina de MRN para favorecer una detección más rápida de los posibles daños iniciales que se pudieran producir mientras se consigue la respuesta global a estos daños. Esto no descarta que SCF(β TrCP) esté implicada o no en esta segunda parte. Hubiera sido interesante realizar estudios sobre el papel de β TrCP, o de su versión β TrCP Δ F, sobre la localización del complejo MRN y comprobar cómo se traduce de manera efectiva en una mayor tasa de reparación de los daños. De hecho, otros datos del laboratorio no incluidos en esta Tesis apuntarían en ese sentido. En nuestro conocimiento, los estudios realizados por otros autores han sido siempre tras someter a las células a algún tipo de estrés genotóxico, por lo que en este sentido nuestros resultados serían novedosos.

Respecto al papel fisiológico de la asociación entre SCF(FBXW7) y MRN, las poliubiquitilaciones *in vivo* de tipo K48 llevadas a cabo por esta ligasa de ubiquitina sobre el complejo nos hicieron pensar que FBXW7 podría intervenir en su degradación. De hecho, pudimos comprobar que, efectivamente, la sobreexpresión de HA FBXW7 traía consigo una caída en los niveles de MRE11, RAD50 y NBS1, que se degradaban por la vía de la autofagia/lisosoma, a juzgar por los ensayos realizados con inhibidores del flujo autofágico. Pese a que la degradación de sustratos por la vía autofágica suele estar mediada por poliubiquitilaciones de tipo K63 (Tan *et al*, 2008), mientras que las de tipo K48 se vinculan a la degradación proteasómica (Lander *et al*, 2012), existen diversas publicaciones que también relacionan estas últimas con la vía de la autofagia (Kirkin *et al*, 2009b; Long *et al*, 2008; Matsumoto *et al*, 2011). En nuestros ensayos, comprobamos, además, que al inhibir las enzimas lisosomales con NH₄Cl, las proteínas del complejo se acumulaban en la fracción nuclear de la célula, como también se ha

demostrado en diversas líneas celulares para otras proteínas nucleares como BRCA1 (Blagosklonny *et al*, 1999). Recíprocamente, el tratamiento con activadores del flujo autofágico potenciaba la degradación del complejo. En otros estudios también se ha señalado la capacidad del tratamiento con rapamicina, que estimula la autofagia inhibiendo a mTORC1, de provocar la degradación de determinados sustratos nucleares específicos (Cenni *et al*, 2011).

Para profundizar en el mecanismo de degradación del complejo MRN, estudiamos la posible intervención de determinadas proteínas mediadoras del flujo autofágico, concretamente p62 y LC3, en la degradación. Este extremo se confirmó no sólo mediante el silenciamiento génico transitorio de *p62* y *LC3*, que provocó un incremento de las proteínas del complejo, sino además analizando si existía una asociación *in vivo* entre estas proteínas. Comprobamos que la inmunoprecipitación de cada uno de los componentes del complejo MRN traía asociadas, sea directa o indirectamente, a p62 y LC3 exclusivamente en condiciones de bloqueo del flujo autofágico. Esta condición ha sido fundamental para los ensayos relacionados con la autofagia, ya que, en las células cultivadas en condiciones normales de crecimiento, probablemente con una cierta actividad autofágica basal, las proteínas del complejo asociadas a p62/LC3 estarían en vías de degradarse y sólo podríamos detectar la interacción si previamente se bloqueaba la destrucción. Por tanto, con estos resultados podemos concluir que el recambio del complejo MRN, es decir, la degradación basal de estas proteínas, tiene lugar a través de la vía autofágica. Chen y colaboradores obtuvieron resultados similares al estudiar la estabilidad de cGAS, una proteína clave en la señalización mediada por interferón como parte de la inmunidad antiviral. En las células sin estimular, esta proteína sufre una degradación basal que depende de su poliubiquitilación de tipo K48. cGAS poliubiquitilada es reconocida por p62 y, posteriormente, por LC3 para su degradación selectiva por vía autofágica (Chen *et al*, 2016b). Al igual que ocurre en nuestro estudio, estos resultados certifican que, en condiciones fisiológicas, p62 también puede reconocer sustratos poliubiquitilados a través de K48 para su degradación autofágica, y no sólo aquellos que están marcados con K63.

También cabría destacar que, aunque exista co-inmunoprecipitación de p62 y LC3 con la inmunoprecipitación de cada una de las proteínas del complejo MRN, no necesariamente tiene que haber una interacción entre estos mediadores del flujo autofágico y cada uno de los componentes del complejo. Esto es así porque MRE11, RAD50 y NBS1 constituyen un complejo estable y es posible que se detecten interacciones con p62 y LC3 incluso si estas proteínas sólo interaccionan con una de ellas, ya que al inmunoprecipitar cualquiera de los componentes del complejo, siempre se obtienen co-inmunoprecipitaciones de los otros dos miembros. Habría que realizar otro tipo de estudios para aclarar este aspecto. En cualquier caso, e independientemente de cuál sea el componente del complejo que interaccione con

p62 y LC3, esta asociación se detectaba únicamente de manera clara en la fracción nuclear de la célula. Los ensayos de microscopía de fluorescencia realizados apoyaron este resultado, al permitirnos observar estructuras vesiculares marcadas con p62 y LC3 en la región perinuclear, donde también se acumulaban RAD50 y MRE11 (NBS1 no fue analizado por problemas con los anticuerpos empleados), todo ello en condiciones de bloqueo de la autofagia. Estas estructuras vesiculares perinucleares son muy similares a las que se han hallado al estudiar la degradación por la vía de la autofagia/lisosoma de otros componentes nucleares (Park *et al*, 2009).

Aunque la asociación entre MRN y p62/LC3 se detecte fundamentalmente en el núcleo, no se puede descartar que exista un cierto grado de interacción en el citoplasma que no hayamos podido observar apropiadamente. De hecho, el complejo, tras asociarse a los mediadores de la autofagia en el núcleo celular, debe pasar a los lisosomas en el citoplasma, por lo que al menos en esas estructuras la asociación MRN-p62/LC3 debería estar presente. Sin embargo, estas interacciones a nivel citoplasmático no han sido detectadas, probablemente porque nuestra metodología de trabajo no es lo suficientemente sensible. Al preparar los extractos citosólicos y nucleares, la posible fracción de MRN asociada a p62 y LC3 existente en el citoplasma se diluiría en el conjunto del extracto, mientras que, en la fracción nuclear, al ser la asociación MRN-p62/LC3 mucho más abundante, sería también mucho más fácil de detectar.

Dado que en nuestros ensayos hemos observado que el complejo MRN, de localización fundamentalmente nuclear, se degrada por la vía de la autofagia/lisosoma, estaríamos ante un caso de nucleofagia. La nucleofagia es el término genérico que hace referencia a la degradación selectiva de componentes nucleares por vía autofágica. A su vez, abarca dos fenómenos diferenciados: la macronucleofagia y la micronucleofagia. En la primera, ciertos componentes nucleares, como proteínas específicas o vesículas formadas a partir de evaginaciones de la doble membrana nuclear, son abarcados por fagóforos en formación, que se van cerrando hasta formar los autofagosomas con el contenido nuclear en su interior. Posteriormente, este se fusionará con el lisosoma para degradar su contenido. En la segunda, las vesículas derivadas de la membrana nuclear se incorporan directamente al lisosoma a través de invaginaciones de su membrana. Mientras que la macronucleofagia es un fenómeno que se ha descrito tanto en células de mamífero como en levaduras, la micronucleofagia solamente ha sido descrita en levaduras (Li & Nakatogawa, 2022). La nucleofagia contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular en contextos determinados, y sus alteraciones pueden derivar en distintas patologías (Zhao *et al*, 2021; Papandreou & Tavernarakis, 2019). Los casos de proteínas nucleares degradadas por nucleofagia en células de mamíferos descritos hasta el momento tenían lugar tras agresiones celulares tales como el daño en el ADN o la inducción de senescencia (Dou *et al*, 2015; Li *et al*, 2019; Xu *et al*, 2020b). Siendo así, la degradación del complejo

MRN por la vía autofágica que hemos descrito sería el primero o uno de los primeros casos de nucleofagia basal, fisiológica, que se identifica en células de mamíferos (Papandreou & Tavernarakis, 2019), ya que esta degradación puede observarse en las células cultivadas en condiciones habituales sin ningún tipo de estrés.

Con el fin de vincular la poliubiquitilación de MRN mediada por SCF(FBXW7) con la asociación del complejo a p62 y LC3, estudiamos las co-inmunoprecipitaciones de estas proteínas en las células que sobreexpresaban *HA FBXW7* o *HA FBXW7 ΔF*, su versión dominante negativa. Con ello pudimos comprobar que la acción de FBXW7 sobre el complejo era fundamental para permitir la asociación de este a p62 y LC3, y en última instancia, su degradación por la vía de la autofagia/lisosoma, dado que FBXW7 ΔF, que evitaba la poliubiquitilación del complejo, eliminó casi por completo la interacción con estos mediadores de la ruta autofágica. Asimismo, observamos que FBXW7 potenciaba la localización del complejo MRN en los lisosomas, lo cual fue verificado tanto bioquímicamente, tras ensayos de enriquecimiento lisosomal, como mediante inmunofluorescencia. En estos últimos, la sobreexpresión de *HA FBXW7 ΔF* suprimió eficazmente la presencia del complejo en las vesículas lisosomales. Todos estos resultados ligan de manera clara la asociación y poliubiquitilación que lleva a cabo SCF(FBXW7) sobre el complejo MRN con la degradación autofágica del mismo. Dicha poliubiquitilación permite que el complejo sea reconocido por la maquinaria de la autofagia, p62 y LC3, en el núcleo celular, tras lo cual es trasladado al lisosoma para su degradación.

Una vez estudiado el mecanismo por el cual el complejo MRN era degradado por la vía de la autofagia/lisosoma en condiciones basales, abordamos la búsqueda de las condiciones capaces de potenciar este fenómeno, de manera similar a lo observado en otros sustratos como p16 INK4A, que se degrada por vía autofágica, mediado por p62 y LC3, en células sin estimular, basalmente, e incrementa esta degradación en condiciones que estimulan la autofagia, como la privación de nutrientes, el estrés oxidativo o el daño en el ADN (Coryell *et al*, 2020). En nuestro caso, los resultados más interesantes se obtuvieron analizando el efecto de los agentes genotóxicos, lo que nos ha permitido describir un nuevo papel de FBXW7 en el contexto del daño en el ADN. Como ya se comentó en la *Introducción*, esta proteína F-box participa activamente en la regulación de la respuesta al daño en el ADN, favoreciendo la ubiquitilación y degradación de proteínas clave en el avance del ciclo celular o en la recuperación de la proliferación tras la reparación de los daños, como PLK1 y p53 (Giráldez *et al*, 2014; Galindo-Moreno *et al*, 2019; Cui *et al*, 2020b; Tripathi *et al*, 2019), o de determinados factores de transcripción como SOX9 (Hong *et al*, 2016). También se ha destacado el papel de FBXW7 sobre sustratos implicados directamente en la reparación de los daños en el ADN. En respuesta a radiación ionizante, SCF(FBXW7) lleva a cabo la poliubiquitilación de la proteína XRCC4, mediante ubiquitinas unidas a través de K63, lo que favorece su asociación a los complejos formados por KU70/KU80, promoviendo así

la reparación del daño vía NHEJ (Zhang *et al*, 2016). Por otra parte, SCF(FBXW7) poliubicultila a la helicasa BLM, en este caso mediante ubicuitinas unidas a través de K48, induciendo su degradación por la vía del proteasoma durante la mitosis (Kharat *et al*, 2016).

Nuestro estudio nos permitió descubrir que el tratamiento con quimioterápicos como el cisplatino y la doxorubicina provocaba una caída en los niveles de los componentes del complejo MRN sólo a dosis suficientemente altas como para inducir apoptosis. La disminución de MRN en estas condiciones se correspondía con una mayor degradación por la vía de la autofagia/lisosoma dependiente de FBXW7. Estos resultados fueron apoyados en ensayos de microscopía de fluorescencia en los que observamos que la sobreexpresión de *HA FBXW7 ΔF* evitó la movilización del complejo MRN a las vesículas lisosomales en condiciones de daño apoptótico. Dado que los niveles del complejo MRN se mantienen estables a dosis bajas de agentes genotóxicos, podríamos pensar que, mientras el daño en el ADN causado por estos fármacos no es excesivo y la célula puede repararlo, el complejo debe ejercer su importante papel como sensor de las DSBs, participando en su procesamiento y reparación, por lo que evita su degradación (más allá del recambio basal que pueda experimentar). Sin embargo, cuando las dosis altas de los fármacos provocan un daño masivo en el ADN, superando la capacidad de la célula para repararlo, la función del complejo MRN deja de ser necesaria, por lo que debe potenciarse su degradación para promover, o como mínimo no interferir, con los eventos que tienen lugar en la cascada apoptótica. Todos estos resultados relativos a la degradación del complejo MRN mediada por SCF(FBXW7) y la vía de la autofagia/lisosoma han sido recientemente publicados por nuestro grupo en la revista *Cell death and differentiation* (Belmonte-Fernández *et al*, 2023, ver *Anexo*).

De manera análoga, ciertas publicaciones relacionan la muerte celular con la desaparición del otro gran complejo sensor de daños en el ADN, el compuesto por KU70/KU80, o con su acumulación en el citoplasma (Norbury & Zhivotovsky, 2004). En células acinares del páncreas, la apoptosis causada por el daño en el ADN producto del estrés oxidativo trajo consigo una reducción sustancial de los niveles de KU70/KU80 en el núcleo celular. Esta caída se debía tanto a la degradación de estas proteínas promovida por las caspasas activadas durante la apoptosis, como a una reducción en la unión de KU70/KU80 a sus correspondientes transportadores nucleares. Además, observaron que la recuperación de KU70/KU80 en el núcleo, por medio de su sobreexpresión, protegía contra la muerte celular, mientras que la sobreexpresión de un mutante dominante negativo de KU, incapaz de unirse al ADN, potenciaba la apoptosis (Song *et al*, 2003). En un sentido similar, Gama y colaboradores mostraron que la apoptosis derivada del tratamiento con diversos fármacos trajo consigo una mayor poliubicultilación y degradación de KU70, en este caso por la vía del proteasoma, independientemente de la actividad de las caspasas. Igualmente,

observaron la poliubiquitilación de KU80 y su disminución en células apoptóticas (Gama *et al*, 2006). Estos autores también mostraron que la proteína MDM2 humana es capaz de poliubiquitilar a KU70 en el citoplasma e inducir su degradación por la vía del proteasoma en condiciones de apoptosis por estrés genotóxico (Gama *et al*, 2009). Asimismo, se ha relacionado la fragmentación apoptótica del ADN con la reducción en los complejos KU tras episodios de isquemia cerebral focal transitoria en ratones, lo que sugiere que la pérdida de estas proteínas, y el consecuente fallo en los mecanismos de reparación del ADN, contribuye a la fragmentación en los eventos apoptóticos (Kim *et al*, 2001). Por todo ello, se podría pensar que la degradación del complejo MRN por la vía de la autofagia/lisosoma mediada por FBXW7, al igual que la degradación del complejo KU descrita, son eventos que contribuyen a la muerte celular inducida por agentes genotóxicos.

Como se ha mencionado con anterioridad en esta Tesis, la actividad eficiente del complejo MRN podría ser perjudicial para el éxito de determinados tratamientos quimioterápicos, ya que una detección y reparación eficaces de los daños en el ADN, causados por el uso de agentes genotóxicos, contribuiría a la supervivencia de la célula tumoral y, por tanto, a la aparición de resistencias a dichos tratamientos (Bian *et al*, 2019). De hecho, la sobreexpresión de los genes que codifican los distintos componentes del complejo se ha relacionado con la aparición de quimiorresistencia al tratamiento con cisplatino y, en consecuencia, con un peor pronóstico (Altan *et al*, 2016). Resulta, por tanto, evidente la importancia de encontrar nuevos fármacos adyuvantes que sean capaces de evitar que el daño en el ADN causado por el tratamiento con cisplatino sea reparado, de manera que tenga lugar la muerte de las células tumorales, y se evite así la aparición de resistencias. Durante años, se han producido inhibidores nuevos, o se han combinado con otros, con el objetivo de bloquear los mecanismos de reparación del ADN en las células tumorales, permitiendo así una sensibilización y eliminación más eficaz de las mismas, algunos de ellos con resultados prometedores (Shkundina *et al*, 2021; Roberti *et al*, 2019).

En lo que se refiere al complejo MRN particularmente, existen estudios que han relacionado la inhibición o reducción de cada uno de sus componentes con una mejor respuesta al tratamiento con cisplatino. Así, en un estudio sobre los cambios de expresión génica producidos en líneas celulares de cáncer de vejiga tras el tratamiento con cisplatino, gemcitabina o una combinación de ambos, han atribuido los efectos sinérgicos del tratamiento combinado principalmente a una disminución de MRE11 y SKP2 (Da Silva *et al*, 2014). Por otro lado, se han observado sinergias al tratar con cisplatino células de cáncer de mama o de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello si se inhibía *RAD50* mediante silenciamiento génico o se utilizaba un mutante dominante negativo. La ausencia de *RAD50* funcional impide que tenga lugar una respuesta adecuada a los daños en el ADN, incrementando el daño causado por el agente genotóxico y sensibilizando las células tumorales al tratamiento. Incluso, los

xenoinjertos de carcinomas de células escamosas resistentes al cisplatino en ratones desnudos experimentaron una importante regresión tumoral tras el tratamiento conjunto de cisplatino con la inhibición de RAD50 (Abuzeid *et al*, 2009; Flores-Pérez *et al*, 2014). Estos autores destacan la importancia del desarrollo de nuevos inhibidores contra RAD50 como una estrategia frente a la aparición de resistencias al tratamiento con agentes genotóxicos. Finalmente, al estudiar la inhibición de NBS1 también se han obtenido resultados similares. De nuevo, la expresión de mutantes de *NBN* por medio de vectores adenovirales consiguió interrumpir la funcionalidad del complejo MRN, impidiendo una respuesta adecuada a los daños en el ADN y consiguiendo, por tanto, sensibilizar los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello al tratamiento con cisplatino tanto *in vitro*, en modelos celulares, como *in vivo*, en xenoinjertos en ratones desnudos (Araki *et al*, 2010).

Según nuestros resultados, la inducción de apoptosis tras el tratamiento con agentes genotóxicos trae consigo una mayor degradación del complejo MRN. Por tanto, podríamos sugerir que si fuéramos capaces de incrementar artificialmente la degradación específica del complejo MRN a través de SCF(FBXW7)/lisosoma tras el tratamiento con cisplatino, quizás se facilitaría la eliminación de las células tumorales, incluso aquellas que fueran resistentes al tratamiento por presentar una mayor tasa de reparación de los daños en el ADN. Para potenciar la degradación del complejo se podría diseñar una molécula pequeña, similar a las que se han descrito previamente en otros contextos. Son las llamadas quimeras dirigidas a la proteólisis o PROTAC (del inglés *proteolysis-targeting chimera*). Estas moléculas presentan una región que se une a la proteína diana a degradar, y otra región que posee el motivo de la ligasa de ubiquitina, permitiendo así que esta interaccione con proteínas que no son sus sustratos naturales. De esta manera, el PROTAC puede unirse a la vez a la proteína diana y a la ligasa de ubiquitina, aproximando ambos elementos de manera que la proteína diana pueda ser ubiquitilada. Así, el proteasoma es redirigido hacia la degradación de un sustrato específico de interés que en condiciones naturales no sería degradado. Con este sistema se han desarrollado moléculas capaces de inducir la degradación de una variedad de sustratos: receptores hormonales nucleares, proteínas implicadas en modificaciones epigenéticas, diferentes quinasas, proteínas implicadas en la apoptosis e incluso determinadas ligasas de ubiquitina (Zhou *et al*, 2020). También se han desarrollado sistemas para potenciar la degradación de sustratos específicos por la vía de la autofagia/lisosoma. De todos ellos, quizás las más prometedoras sean las quimeras dirigidas a la autofagia o AUTOTAC (del inglés *autophagy-targeting chimera*). De manera similar a los PROTACs, estas moléculas poseen una región que interacciona con la proteína a degradar y otra región que se une a la maquinaria autofágica. En concreto, interaccionan con p62, lo que permite en última instancia la asociación a LC3 y posterior degradación por el lisosoma. De este modo, se puede conseguir la degradación por la vía de la autofagia/lisosoma de una gran variedad de sustratos, tanto proteínas solubles como agregados (Ji *et al*, 2022a,

2022b). En nuestro caso, se trataría de una molécula que simplemente potenciara la ubiquitilación de MRN, ya que SCF(FBXW7) es su ligasa de ubiquitina fisiológica. Además, el hecho de que el mecanismo que proponemos ocurra en la célula cuando esta entra en apoptosis tras daño genotóxico, podría permitir que dosis más bajas de cisplatino en combinación con esta molécula pequeña sean igualmente eficaces, lo que reduciría, al menos en parte, los problemas de toxicidad del cisplatino que pueden presentar los pacientes. Aunque, evidentemente, se requieren otros estudios en profundidad para comprobar esta hipótesis.

3. Efecto de la sobreexpresión de β TrCP sobre la senescencia inducida por cisplatino.

En el curso de la caracterización fisiológica de la asociación de β TrCP y FBXW7 con el complejo MRN observamos que la sobreexpresión de β TrCP tras someter a las células a condiciones de senescencia afectaba a la viabilidad celular. Esto lo analizamos a partir de resultados previos de otros autores que mostraban que otras proteínas nucleares, como la lamina B1, eran degradadas a través del lisosoma tras someter a las células a condiciones de senescencia (Dou *et al*, 2015). Por tanto, decidimos explorar el posible efecto de las proteínas F-box sobre MRN en condiciones similares. Con este fin, cultivamos diversas líneas celulares a concentraciones de cisplatino capaces de inducir senescencia, sobreexpresando o no las proteínas F-box procedentes de las construcciones lentivirales. Sin embargo, la estabilidad del complejo MRN no se vio alterada. Cabe señalar que los experimentos realizados en nuestro laboratorio no eran exactamente iguales a los realizados por Dou y colaboradores, ya que estos investigadores emplearon células normales, no cancerosas, y en las que inducían senescencia mediante la sobreexpresión de oncogenes, concretamente *H-RAS*^{V12}.

A pesar de que no obtuvimos resultados positivos en cuanto a cambios en la estabilidad del complejo MRN, que era nuestro objetivo de partida, sí pudimos observar una interesante diferencia fenotípica entre las líneas celulares silvestres y las transducidas con *HA β TrCP*. Como ya se ha mencionado, estas últimas mostraban una gran disminución de la viabilidad celular. Además, este fenómeno también se observó cuando la senescencia era provocada por estrés oxidativo empleando dosis subletales de H_2O_2 . El hecho de que esta diferencia en el comportamiento entre las líneas silvestres y las transducidas con *HA β TrCP* se obtenga en varios modelos celulares y con distintas formas de inducir senescencia nos estaría indicando que podría tratarse de un fenómeno más general causado por la sobreexpresión de *HA β TrCP*. Con estos sugerentes resultados, decidimos iniciar una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio basada en estudiar el fenotipo senescente y el efecto de la sobreexpresión de *HA β TrCP* sobre la viabilidad celular en esas condiciones.

La senescencia celular se vinculó inicialmente con los procesos relacionados con el envejecimiento celular y, por extensión, del propio organismo, a raíz de su descubrimiento en cultivos de fibroblastos humanos que dejaron de proliferar tras sucesivas divisiones (Hayflick & Moorhead, 1961), lo cual se atribuiría posteriormente al acortamiento de los telómeros. Sin embargo, como se ha comentado en apartados anteriores, las células pueden entrar en este estado de parada proliferativa como resultado de un amplio abanico de señales, distintas agresiones y formas de estrés, independientemente del acortamiento telomérico. La senescencia puede tener lugar en todas las etapas de la vida de un organismo, desde el embrión hasta el adulto, al participar en procesos tales como el establecimiento, la remodelación y la reparación de los tejidos, la eliminación de estructuras transitorias durante el desarrollo o en

evitar la propagación de células dañadas o disfuncionales (Gorgoulis *et al*, 2019; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Además de participar en procesos normales y fisiológicos, la presencia de células senescentes también se ha relacionado con diferentes procesos patológicos en los que puede tener un papel beneficioso o perjudicial, según el caso (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Una de las patologías en las que más claramente se puede comprobar el controvertido papel de la senescencia es el cáncer. Dado que la entrada en senescencia trae consigo una parada de la proliferación celular, tradicionalmente se ha considerado como un mecanismo que podría evitar el desarrollo del cáncer. Además, la producción y secreción de determinadas citoquinas inflamatorias debidas al SASP podría estimular la acción antitumoral del sistema inmune (Xue *et al*, 2007; Kang *et al*, 2011). No obstante, en las últimas décadas se ha cuestionado cada vez más este papel beneficioso de la senescencia en el contexto del cáncer puesto que existen estudios que apuntan en la dirección contraria y apuestan por un papel más pro-tumorigénico derivado, entre otros factores, del efecto local de determinados componentes del SASP (Dou & Berger, 2018; Milanovic *et al*, 2018). Además, en determinadas circunstancias, las células tumorales que han entrado en el estado senescente pueden ser capaces de abandonar este estado e ingresar de nuevo en el ciclo celular favoreciendo así el progreso de la enfermedad (Patel *et al*, 2016; Saleh *et al*, 2019). Por tanto, la aparición y acumulación de células tumorales senescentes podría ser un factor negativo para acabar con la enfermedad. En consecuencia, resulta clave entender los fundamentos precisos que permiten la eliminación de estas células ya que ayudaría a prevenir y mejorar muchos procesos patológicos (Childs *et al*, 2017; Wang *et al*, 2020a).

Uno de los factores por los que las células tumorales pueden entrar en senescencia es el tratamiento con diversos quimioterápicos. En nuestros ensayos, utilizamos cisplatino para inducir senescencia, cuya exposición prolongada a dosis bajas es capaz de provocar este fenómeno en distintas líneas celulares tumorales humanas (Song *et al*, 2017; Wang *et al*, 1998; Qu *et al*, 2013). Esta situación se asemeja a lo que podría ocurrir en pacientes oncológicos tratados con cisplatino, en los que, a medida que pasa el tiempo desde la administración del fármaco, la concentración de este en los tejidos iría decayendo, lo que podría favorecer la aparición de células senescentes. Además, se han estudiado casos en los que la senescencia inducida por cisplatino en células cancerosas tiene un efecto perjudicial al promover el avance de la enfermedad. Sun y colaboradores comprobaron que el tratamiento con cisplatino en células de melanoma indujo senescencia celular con SASP asociado tanto *in vitro* como en xenoinjertos realizados en ratones desnudos. Ciertos componentes del SASP generados por las células senescentes de melanoma fueron capaces de estimular el crecimiento de las células de melanoma no senescentes. Asimismo, el trasplante de células tumorales senescentes y no senescentes aceleraba el desarrollo tumoral en los ratones injertados en comparación con el obtenido al trasplantar únicamente células tumorales no senescentes (Sun *et al*, 2018). Vemos, pues, que la eliminación de las células

senescentes derivadas del tratamiento continuado a concentraciones bajas de cisplatino resultaría esencial para poder mejorar la respuesta al tratamiento y el pronóstico clínico de los pacientes.

Cuando descubrimos en nuestros experimentos que, en condiciones de senescencia, las células transducidas con *HA βTrCP* presentaban menor viabilidad que las células silvestres, quisimos ahondar en esta cuestión. Mientras que en las líneas celulares silvestres el tratamiento inducía una eficaz entrada en senescencia, que era sostenida en el tiempo, en las líneas transducidas con *HA βTrCP* el número de células iba cayendo progresivamente. Nos surgía la duda de si esta aparente muerte celular ocurría tras la entrada en el estado de senescencia o si las células que sobreexpresaban la proteína F-box ni siquiera llegaban a entrar en este estado. El análisis de la actividad β-galactosidasa lisosomal nos permitió comprobar que en ambas líneas se producía la entrada en senescencia, a juzgar por el marcaje azul fruto de la escisión del X-gal. Para averiguar lo que estaba sucediendo a nivel bioquímico, analizamos los niveles de p53 y p21 CIP1. Tanto en la línea silvestre como en la que sobreexpresaba *HA βTrCP* aparecía p53, indicativo del daño en el ADN. Sin embargo, los niveles de p21 CIP1, responsable de la parada del ciclo celular necesaria para la entrada en senescencia en respuesta a diferentes estímulos (Hernandez-Segura *et al*, 2017), eran inferiores en la línea transducida que en la línea silvestre. En conjunto, estos resultados sugieren que el nivel de p21 CIP1 alcanzado en la línea que sobreexpresa *HA βTrCP* podría ser suficiente para que la célula entrase en senescencia, pero no para mantenerla en ese estado a largo plazo, como sí ocurría con la línea silvestre tras el daño causado por cisplatino.

p21 CIP1 es un inhibidor de CDKs esencial en el bloqueo del ciclo celular. Inhibe la actividad quinasa de los complejos ciclinas-CDKs interaccionando con las ciclinas a través de motivos de unión específicos. Esto provoca la hipofosforilación y activación de proteínas de la familia del retinoblastoma (Rb), lo que impide la actividad de los factores de transcripción de la familia E2F, frenando así el avance del ciclo celular (Niculescu *et al*, 1998; Brugarolas *et al*, 1999). Sus efectos sobre el ciclo son dependientes, entre otros factores, de su acumulación. Por ello, los niveles y la actividad de esta proteína están regulados de manera estricta. A nivel de expresión, p53 es su principal regulador transcripcional (El-Deiry *et al*, 1993), aunque también puede expresarse por medio de otros mecanismos independientes de esta proteína, como determinados receptores nucleares u otros factores de transcripción (Abbas & Dutta, 2009; Aliouat-Denis *et al*, 2005). A nivel post-traducciona, juegan un papel importante las fosforilaciones y ubiquitilaciones. La fosforilación de esta proteína puede afectar a su capacidad de interacción con otras proteínas específicas o cambiar su localización subcelular, afectando todo ello a su actividad como inhibidor de CDKs (Child & Mann, 2006). Así, por ejemplo, cuando se encuentra en el núcleo celular, es capaz de inhibir la progresión del ciclo. Por el contrario, determinadas fosforilaciones

promueven su transporte al citoplasma, donde puede ejercer funciones antiapoptóticas (Ping *et al*, 2006). Además, otras fosforilaciones por parte de quinasas concretas, como p38 α , JNK1 o AKT pueden contribuir a la estabilidad de la proteína (Kim *et al*, 2002; Li *et al*, 2002). En este mismo sentido, se han descrito multitud de proteínas que favorecen su estabilización por medio de interacciones proteína-proteína, como nucleofosmina/B23, WISp39 o TRIM39 (Benzeno & Diehl, 2005; Xiao *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2012). Por otra parte, la ubiquitilación de p21 CIP1 permite su degradación en las circunstancias adecuadas. En condiciones normales de crecimiento celular, es una proteína con una vida media corta (Blagosklonny *et al*, 1996; Warfel & El-Deiry, 2013). Su degradación ocurre principalmente por la vía del proteasoma y en ella son clave las ligasas de ubiquitina SCF(SKP2), CRL4(CDT2) y APC/C(CDC20), que promueven su eliminación en fases concretas del ciclo celular: la primera promueve su degradación en la transición G₁/S y durante la fase S (Frescas & Pagano, 2008); la segunda interviene específicamente en la fase S (Abbas & Dutta, 2011); y la tercera actúa durante la mitosis (Amador *et al*, 2007). También se han descrito desubcunitilasas como USP11, que son capaces de estabilizar p21 CIP1 eliminando las cadenas de poliubiquitina producidas por las ligasas de ubiquitinas mencionadas, actuando con independencia de la fase del ciclo celular (Deng *et al*, 2018).

Dado que β TrCP es una subunidad de una ligasa de ubiquitina, parece lógico pensar que el efecto que se observa por la sobreexpresión de *HA β TrCP* se deba a una poliubiquitilación desregulada de uno o más sustratos de SCF(β TrCP). Además, teníamos el dato de que en las células transducidas con *HA β TrCP* el nivel de p21 CIP1 en senescencia no alcanzaba el nivel de la correspondiente línea silvestre. Por tanto, quisimos estudiar si la sobreexpresión de la proteína F-box podía provocar la desestabilización de p21 CIP1. El bloqueo del proteasoma con MG132 en condiciones de senescencia nos permitió observar una acumulación de p21 CIP1 en la línea transducida bastante más importante que en la línea silvestre. Los pequeños cambios en el nivel de p21 CIP1 que pudieran observarse en la línea silvestre tras el bloqueo del proteasoma se podrían explicar como resultado de la interrupción del recambio basal de dicha proteína. Sin embargo, la mayor acumulación observada en la línea transducida con *HA β TrCP* implica que esta proteína F-box está afectando de alguna manera, sea directa o indirecta, al nivel de p21 CIP1. Este resultado se reforzó al comprobar que el silenciamiento génico transitorio de *HA β TrCP* facilitaba la acumulación de p21 CIP1 en la línea transducida sometida a condiciones de senescencia.

A partir de estos resultados podemos concluir que existe una relación entre β TrCP y p21 CIP1, aunque aún no hemos identificado la diana directa de β TrCP responsable del fenotipo encontrado. Es más, con los ensayos realizados hasta el momento no podemos asegurar que el menor nivel de p21 CIP1 se deba a una cuestión de degradación de esta proteína. También podría deberse a una menor activación

transcripcional, ya que se ha descrito que SCF(β TrCP) interviene en la degradación de p53 (Xia *et al*, 2009), el cual promueve la expresión de p21 CIP1. Por tanto, los cambios que vemos en p21 CIP1 con el inhibidor del proteasoma podrían deberse al incremento en los niveles de p53. De hecho, también se observan ciertos cambios en los niveles de esta proteína en la línea que sobreexpresa HA β TrCP en los ensayos anteriormente descritos. Por ello, sería interesante estudiar los niveles de ARNm de p21 CIP1 para comprobar este extremo.

Por el contrario, si SCF(β TrCP) está promoviendo la degradación activa de p21 CIP1 en las condiciones descritas, sería un sustrato inédito de esta ligasa de ubiquitina. Así, la sobreexpresión de HA β TrCP potenciaría de manera directa la degradación de la proteína, que ocurriría por la vía del proteasoma de acuerdo con los ensayos realizados con MG132. Para comprobarlo, habría que realizar ensayos de co-inmunoprecipitación en condiciones de senescencia entre HA β TrCP y p21 CIP1. Idealmente, se realizarían en ambas direcciones, es decir, inmunoprecipitando HA β TrCP y analizando si trae consigo p21 CIP1 y viceversa, inmunoprecipitando p21 CIP1 y estudiando la co-inmunoprecipitación de HA β TrCP. También sería importante realizar ensayos de ubiquitilación *in vitro* e *in vivo* en las condiciones deseadas, para verificar que se trata de un sustrato de la ligasa de ubiquitina.

No obstante, también es posible que SCF(β TrCP) esté facilitando la degradación de p21 CIP1 de manera indirecta, por ejemplo, a través de la ubiquitilación de alguno de los múltiples estabilizadores de p21 CIP1 descritos. Alguno de ellos podría ser un sustrato de esta ligasa de ubiquitina, por lo que al sobreexpresar la proteína F-box podría potenciarse su degradación, lo cual desestabilizaría a su vez a p21 CIP1, acelerando su eliminación. Sería interesante, por tanto, estudiar si la sobreexpresión de HA β TrCP trae consigo una reducción en los niveles de algunas de las proteínas estabilizadoras de p21 CIP1, para, a continuación, averiguar si actúan como sustrato de la ligasa de ubiquitina utilizando la metodología ya descrita en el caso anterior. El mismo fenómeno podría ocurrir si SCF(β TrCP) interviniese en la degradación de alguna desubcutilasa que tuviese un papel en la estabilización de p21 CIP1, como USP11.

Independientemente del mecanismo, en nuestros ensayos parece claro que el menor nivel de p21 CIP1 derivado de la sobreexpresión de HA β TrCP provoca una reducción del número de células senescentes. En este mismo sentido, Yosef y colaboradores también mostraron que en la viabilidad de las células senescentes generadas tras el tratamiento con un agente genotóxico, en este caso etopósido, jugaba un papel fundamental p21 CIP1. Para comprobarlo, redujeron los niveles de esta proteína mediante silenciamiento génico transitorio en condiciones de senescencia, lo que provocó una caída sustancial de la viabilidad celular. Según sus análisis, al caer p21 CIP1 las células intentan reanudar el ciclo celular y la replicación del ADN, lo que exacerba la respuesta a los daños en el ADN. Como consecuencia, se activan NF- κ B y JNK, entre otros factores, lo que lleva en última instancia a la

inducción de la muerte celular por mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas (Yosef *et al*, 2017). Aunque el grueso de su estudio lo realizaron en fibroblastos normales de piel humana, también obtuvieron los mismos resultados en la línea H1299 de carcinoma de pulmón. Por tanto, este comportamiento no sólo puede observarse en células normales sino también en células tumorales. Así, la escasa cantidad de p21 CIP1 alcanzada en condiciones de senescencia en nuestra línea transducida con HA β TrCP podría provocar un efecto similar al que observaron Yosef y colaboradores mediante silenciamiento génico. En nuestro caso, la parada del ciclo celular tampoco sería eficiente, permitiendo que las células regresasen al ciclo, pero al presentar daños en el ADN acabarían muriendo. Además, dado que SCF(β TrCP) degrada a I κ B (Kroll *et al*, 1999), inhibidor de NF- κ B, las células transducidas con HA β TrCP podrían tener una mayor activación de esta ruta de señalización facilitando así los eventos derivados del menor nivel de p21 CIP1 y que culminarían con la muerte celular.

Zhang y colaboradores también reflejaron la importancia del nivel de p21 CIP1 para el equilibrio entre senescencia y muerte celular. Estos investigadores estudiaron el efecto de diferentes dosis de doxorubicina sobre células de cáncer de colon, comprobando que en las dosis más bajas las células entran en senescencia, lo que coincide con una acumulación de p21 CIP1, mientras que a las dosis más altas tiene lugar la muerte celular, con un claro descenso de esta proteína. En este trabajo, asocian a este fenómeno una metiltransferasa de ADN, DNMT3a, que se expresa en mayor medida cuando las células son sometidas a dosis altas del fármaco, lo que ayuda a reducir la expresión de p21 CIP1. Comprueban que cuando reducen el nivel de DNMT3a por medio de un ARN interferente, el nivel de p21 CIP1 se mantiene alto incluso a dosis elevadas de doxorubicina, lo que reduce sustancialmente la muerte celular, y al contrario, cuando sobreexpresan la metiltransferasa de ADN, los niveles de p21 CIP1 son bajos incluso en condiciones de senescencia, lo que provoca la muerte celular con dosis bajas de doxorubicina (Zhang *et al*, 2011).

Asimismo, Martínez y colaboradores trataron células de cáncer de próstata con dosis crecientes de doxorubicina, y comprobaron que sólo a la dosis más baja se producía una acumulación de p21 CIP1 sostenida en el tiempo, sin apreciarse apoptosis. A estas dosis es posible que las células estuvieran en estado senescente, si bien es cierto que no hacen comprobaciones al respecto. Por su parte, las dosis más altas no acumulaban p21 CIP1 y sí presentaban marcadores apoptóticos. Al reducir los niveles de p21 CIP1 por silenciamiento génico mediado por adenovirus, comprobaron que, a diferencia de lo que ocurría antes, a la dosis más baja del fármaco tenía lugar la muerte celular (Martínez *et al*, 2002). Por tanto, podemos deducir que conseguir una caída en el nivel de p21 CIP1 en condiciones de daño subletal en el ADN, independientemente del método por el cual esto se consiga, permite que las células, que posiblemente se mantendrían en senescencia debido al daño provocado por la

baja dosis del fármaco, entren en muerte celular. Así pues, de cara a un posible tratamiento, conseguir la reducción de p21 CIP1 traería consigo un efecto beneficioso, ya que se podría obtener la muerte celular incluso con menores dosis del fármaco, evitando, además, posibles efectos secundarios derivados de su toxicidad. No obstante, todas estas ideas requerirían estudios en mayor profundidad.

En nuestro caso, observamos que la sobreexpresión de *HA βTrCP* está provocando la muerte selectiva y exclusiva de las células senescentes, dado que la reducción en el número de células no se observa en condiciones basales. De esta manera, si se diseñase una molécula pequeña que activase específicamente la degradación de p21 CIP1 por medio del mecanismo facilitado por SCF(βTrCP), conseguiríamos la eliminación de las células senescentes. En esta misma dirección, existen estudios que señalan a p21 CIP1 como posible diana terapéutica para la erradicación de células cancerosas senescentes derivadas de ciertos tratamientos quimioterápicos. Esto provocaría que dichas células entrasen en apoptosis, potenciando así la eficacia terapéutica (Zhang *et al*, 2021). Si esto se consiguiera, se lograría evitar los posibles problemas futuros que causan las células senescentes. Incluso, permitiría la eliminación de células senescentes producto del envejecimiento biológico, lo que favorecería la renovación y reparación de los tejidos dañados.

Conclusiones

1. El complejo sensor de daños en el ADN MRE11-RAD50-NBS1 es un sustrato inédito de las ligasas de ubiquitina SKP1/CUL1/proteína F-box (β TrCP/FBXW7).
2. MRE11 es la diana de β TrCP *in vivo*, estando esta asociación regulada por las quinasas GSK3 y p70S6K.
3. La asociación FBXW7/MRN está regulada por la quinasa GSK3, y su finalidad es la degradación del complejo vía autofagia/lisosoma: la poliubiquitilación de MRN induce su asociación a p62/LC3 en el núcleo y su posterior traslado al lisosoma para su degradación.
4. FBXW7 contribuye a la muerte celular inducida por cisplatino mediante la degradación del complejo MRN por autofagia. Potenciar la degradación de este complejo podría mejorar la eficacia del tratamiento con cisplatino.
5. La sobreexpresión de β TrCP induce la muerte celular de las células senescentes. Estimular el proceso derivado de la sobreexpresión de esta proteína F-box podría constituir una opción terapéutica para eliminar células tumorales senescentes.

Bibliografía

- Abbas T & Dutta A (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* **9**: 400–414
- Abbas T & Dutta A (2011) CRL4Cdt2: master coordinator of cell cycle progression and genome stability. *Cell cycle* **10**: 241–249
- Abraham J & Staffurth J (2016) Hormonal therapy for cancer. *Medicine* **44**: 30–33
- Abuzeid WM, Jiang X, Shi G, Wang H, Paulson D, Araki K, Jungreis D, Carney J, O'Malley BW & Li D (2009) Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Invest* **119**: 1974–1985
- Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro M v., Augert A, Raguz S, Fumagalli M, da Costa M, Brown C, Popov N, *et al* (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**: 1006–1018
- Adams PD (2009) Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell* **36**: 2–14
- Aguilera A & Gómez-González B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204–217
- Ahnesorg P, Smith P & Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**: 301–313
- Albo D, Akay CL, Marshall CL, Wilks JA, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, Berger DH & Ayala GE (2011) Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. *Cancer* **117**: 4834–4845
- Aliouat-Denis CM, Dendouga N, Van Den Wyngaert I, Goehlmann H, Steller U, Van De Weyer I, Van Slycken N, Andries L, Kass S, Luyten W, *et al* (2005) p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol cancer res* **3**: 627–634
- Allen TM (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2**: 750–763
- Altan B, Yokobori T, Ide M, Bai T, Yanoma T, Kimura A, Kogure N, Suzuki M, Bao P, Mochiki E, *et al* (2016) High expression of MRE11-RAD50-NBS1 is associated with poor prognosis and chemoresistance in gastric cancer. *Anticancer Res* **36**: 5237–5247
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410
- Amador V, Ge S, Santamaría PG, Guardavaccaro D & Pagano M (2007) APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell* **27**: 462–473
- Aparicio T, Baer R, Gottesman M & Gautier J (2016) MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts. *J Cell Biol* **212**: 399–408
- Arabi A, Ullah K, Branca RMM, Johansson J, Bandarra D, Haneklaus M, Fu J, Ariès I, Nilsson P, Den Boer ML, *et al* (2012) Proteomic screen reveals FBW7 as a modulator of the NF-κB pathway. *Nat Commun* **3**: 976
- Araki K, Yamashita T, Reddy N, Wang H, Abuzeid, Khan K, O'Malley BW & Li D (2010) Molecular disruption of NBS1 with targeted gene delivery enhances chemosensitisation in head and neck cancer. *Br J Cancer* **103**: 1822–1830
- Arhzaouy K, Papadopoulos C, Schulze N, Pittman SK, Meyer H & Wehl CC (2019) VCP maintains lysosomal homeostasis and TFEB activity in differentiated skeletal muscle. *Autophagy* **15**: 1082–1099

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1989) Current protocols in molecular biology.
- Aze A, Zhou JC, Costa A & Costanzo V (2013) DNA replication and homologous recombination factors: acting together to maintain genome stability. *Chromosoma* **122**: 401–413
- Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR & Rustgi AK (2020) EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis. *Trends Cell Biol* **30**: 764–776
- Baluk P, Hashizume H & McDonald DM (2005) Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 102–111
- Baskar R, Lee KA, Yeo R & Yeoh K-W (2012) Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* **9**: 193–199
- Beck F, Unverdorben P, Bohn S, Schweitzer A, Pfeifer G, Sakata E, Nickell S, Plitzko JM, Villa E, Baumeister W, *et al* (2012) Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 14870–14875
- Becker E, Meyer V, Madaoui H & Guerois R (2006) Detection of a tandem BRCT in NBS1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics* **22**: 1289–1292
- Bedard PL, Hyman DM, Davids MS & Siu LL (2020) Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *Lancet* **395**: 1078–1088
- Belmonte-Fernández A, Herrero-Ruiz J, Galindo-Moreno M, Limón-Mortés MC, Mora-Santos M, Sáez C, Japón M, Tortolero M & Romero F (2023) Cisplatin-induced cell death increases the degradation of the MRE11-RAD50-NBS1 complex through the autophagy/lysosomal pathway. *Cell Death Differ* **30**: 488–499
- Benzeno S & Diehl JA (2005) A novel WISp39 protein links Hsp90 and p21 stability to the G2/M checkpoint. *Cancer Biol Ther* **4**: 376–378
- Berdasco M & Esteller M (2010) Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* **19**: 698–711
- Berndtsson M, Hägg M, Panaretakis T, Havelka AM, Shoshan MC & Linder S (2007) Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J Cancer* **120**: 175–180
- Bhattacharjee S & Nandi S (2016) Choices have consequences: the nexus between DNA repair pathways and genomic instability in cancer. *Clin Transl Med* **5**: 45
- Bi Y, Cui D, Xiong X & Zhao Y (2021) The characteristics and roles of β -TrCP1/2 in carcinogenesis. *FEBS J* **288**: 3351–3374
- Bian L, Meng Y, Zhang M & Li D (2019) MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. *Mol Cancer* **18**: 169
- Biehs R, Steinlage M, Barton O, Juhász S, Künzel J, Spies J, Shibata A, Jeggo PA & Löbrich M (2017) DNA double-strand break resection occurs during non-homologous end joining in G1 but is distinct from resection during homologous recombination. *Mol Cell* **65**: 671-684.e5
- Birch J & Gil J (2020) Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* **34**: 1565–1576
- Blagosklonny M v., An WG, Melillo G, Nguyen P, Trepel JB & Neckers LM (1999) Regulation of BRCA1 by protein degradation. *Oncogene* **18**: 6460–6468

- Blagosklonny M V., Wu GS, Omura S & El-Deiry WS (1996) Proteasome-dependent regulation of p21WAF1/CIP1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 564–569
- de Blander H, Morel AP, Senaratne AP, Ouzounova M & Puisieux A (2021) Cellular plasticity: a route to senescence exit and tumorigenesis. *Cancers* **13**: 4561
- Borst P, Evers R, Kool M & Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1295–1302
- van den Bosch M, Bree RT & Lowndes NF (2003) The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* **4**: 844–849
- Bray F, Laversanne M, Weiderpass E & Soerjomataram I (2021) The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* **127**: 3029–3030
- Brinkmann K, Schell M, Hoppe T & Kashkar H (2015) Regulation of the DNA damage response by ubiquitin conjugation. *Front Genet* **6**: 98
- Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T & Lees JA (1999) Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1002–1007
- Buis J, Wu Y, Deng Y, Leddon J, Westfield G, Eckersdorff M, Sekiguchi JAM, Chang S & Ferguson DO (2008) MRE11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. *Cell* **135**: 85–96
- Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH & Sabatini DM (1998a) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1432–1437
- Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, Qureshi IA, Burnett AF, Sabatini DM & Snyder SH (1998b) Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8351–8356
- Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, Hershko A, Pagano M & Draetta GF (2003) Degradation of Cdc25A by β -TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**: 87–91
- Busino L, Millman SE, Scotto L, Kyratsous CA, Basrur V, O'Connor O, Hoffmann A, Elenitoba-Johnson KS & Pagano M (2012) FBXW7 α - and GSK3-mediated degradation of p100 is a pro-survival mechanism in multiple myeloma. *Nat Cell Biol* **14**: 375–385
- Campisi J & D'Adda Di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729–740
- Cannavo E, Reginato G & Cejka P (2019) Stepwise 5' DNA end-specific resection of DNA breaks by the MRE11-RAD50-Xrs2 and Sae2 nuclease ensemble. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 5505–5513
- Cardozo T & Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 739–751
- Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM & Chen DJ (1997) DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4267–4272
- Cassavaugh JM, Hale SA, Wellman TL, Howe AK, Wong C & Lounsbury KM (2011) Negative regulation of HIF-1 α by an FBW7-mediated degradation pathway during hypoxia. *J Cell Biochem* **112**: 3882–3890

- Cebollero E, van der Vaart A, Zhao M, Rieter E, Klionsky DJ, Helms JB & Reggiori F (2012) Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr Biol* **22**: 1545–1553
- Ceccaldi R, Rondinelli B & D'Andrea AD (2016) Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol* **26**: 52–64
- Cejka P & Symington LS (2021) DNA end resection: mechanism and control. *Annu Rev Genet* **55**: 285–307
- Celli GB & de Lange T (2005) DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* **7**: 712–718
- Cenni V, Capanni C, Columbaro M, Ortolani M, D'Apice MR, Novelli G, Fini M, Marmiroli S, Scarano E, Maraldi NM, *et al* (2011) Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria. *Eur J Histochem* **55**: e36
- Chabner BA & Roberts Jr TG (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**: 65–72
- Chae YK, Anker JF, Carneiro BA, Chandra S, Kaplan J, Kalyan A, Santa-Maria CA, Platanias LC & Giles FJ (2016) Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget* **7**: 23312–23321
- Chaney SG, Campbell SL, Bassett E & Wu Y (2005) Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* **53**: 3–11
- Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, *et al* (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **22**: 78–83
- Chen L, Nievera CJ, Lee AYL & Wu X (2008) Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* **283**: 7713–7720
- Chen M, Meng Q, Qin Y, Liang P, Tan P, He L, Zhou Y, Chen Y, Huang J, Wang RF, *et al* (2016b) TRIM14 inhibits cGAS degradation mediated by selective autophagy receptor p62 to promote innate immune responses. *Mol Cell* **64**: 105–119
- Chen MC, Chen CH, Chuang HC, Kulp SK, Teng CM & Chen CS (2011) Novel mechanism by which histone deacetylase inhibitors facilitate topoisomerase II α degradation in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **53**: 148–159
- Chen P, Li J, Chen YC, Qian H, Chen YJ, Su JY, Wu M & Lan T (2016a) The functional status of DNA repair pathways determines the sensitization effect to cisplatin in non-small cell lung cancer cells. *Cell oncol* **39**: 511–522
- Chen ZJ & Sun LJ (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* **33**: 275–286
- Cheng Y, Gao WW, Tang H MV, Deng JJ, Wong CM, Chan CP & Jin DY (2016) β -TrCP-mediated ubiquitination and degradation of liver-enriched transcription factor CREB-H. *Sci Rep* **6**: 23938
- Chiang YC, Teng SC, Su YN, Hsieh FJ & Wu KJ (2003) c-Myc directly regulates the transcription of the NBS1 gene involved in DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* **278**: 19286–19291
- Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premssirut P, Luo W, Chicas A, Lee CS, *et al* (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* **25**: 2125–2136

- Child ES & Mann DJ (2006) The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell cycle* **5**: 1313–1319
- Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J & Van Deursen JM (2017) Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* **16**: 718–735
- Chrzanowska K, Gregorek H, Dembowska-Bagińska B, Kalina M & Digweed M (2012) Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis* **7**: 13
- Chu G (1994) Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* **269**: 787–790
- Ci Y, Li X, Chen M, Zhong J, North BJ, Inuzuka H, He X, Li Y, Guo J & Dai X (2018) SCF β -TRCP E3 ubiquitin ligase targets the tumor suppressor ZNRF3 for ubiquitination and degradation. *Protein Cell* **9**: 879–889
- Cianflone E, Torella M, Biamonte F, De Angelis A, Urbanek K, Costanzo FS, Rota M, Ellison-Hughes GM & Torella D (2020) Targeting cardiac stem cell senescence to treat cardiac aging and disease. *Cells* **9**: 1558
- Cole A, Frame S & Cohen P (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* **377**: 249–255
- Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernández F, Eickholt BJ, Nikolic M & Sutherland C (2006) Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 *in vivo*. *J Biol Chem* **281**: 16591–16598
- Collins GA & Goldberg AL (2017) The logic of the 26S proteasome. *Cell* **169**: 792–806
- Coryell PR, Goraya SK, Griffin KA, Redick MA, Sisk SR & Purvis JE (2020) Autophagy regulates the localization and degradation of p16INK4a. *Aging Cell* **19**: e13171
- Craxton A, Munnur D, Jukes-Jones R, Skalka G, Langlais C, Cain K & Malewicz M (2018) PAXX and its paralogs synergistically direct DNA polymerase λ activity in DNA repair. *Nat Commun* **9**: 3877
- Croce CM (2008) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* **358**: 502–511
- Cuervo AM & Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* **24**: 92–104
- Cui D, Dai X, Shu J, Ma Y, Wei D, Xiong X & Zhao Y (2020a) The cross talk of two family members of β -TrCP in the regulation of cell autophagy and growth. *Cell Death Differ* **27**: 1119–1133
- Cui D, Xiong X, Shu J, Dai X, Sun Y & Zhao Y (2020b) FBXW7 confers radiation survival by targeting p53 for degradation. *Cell Rep* **30**: 497-509.e4
- Cvitkovic E, Spaulding J, Bethune V, Martin J & Whitmore WF (1977) Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): Therapeutic index in an animal model. *Cancer* **39**: 1357–1361
- D’Adda Di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* **8**: 512–522
- D’Adda Di Fagagna F, Teo SH & Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**: 1781–1799

- D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, Saraf A, Florens L, Washburn MP & Pagano M (2012) Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell* **149**: 1023–1034
- D'Angiolella V, Donato V, Vijayakumar S, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Dynlacht B & Pagano M (2010) SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature* **466**: 138–142
- Danhier F, Feron O & Pr at V (2010) To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* **148**: 135–146
- Dasari S & Bernard Tchounwou P (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**: 364–378
- Davis M, Hatzubai A, Andersen JS, Ben-Shushan E, Fisher GZ, Yaron A, Bauskin A, Mercurio F, Mann M & Ben-Neriah Y (2002) Pseudosubstrate regulation of the SCF(β -TrCP) ubiquitin ligase by hnRNP-U. *Genes Dev* **16**: 439–451
- Davis RJ, Welcker M & Clurman BE (2014) Tumor suppression by the FBW7 ubiquitin ligase: Mechanisms and opportunities. *Cancer Cell* **26**: 455–464
- Deckbar D, Jeggo PA & L obrich M (2011) Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**: 271–283
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD & Chu G (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* **21**: 3192–3200
- Delac te F & Lopez BS (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell cycle* **7**: 33–38
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, VanSteeg H, Doll  MET, *et al* (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**: 722–733
- DeNardo DG, Andreu P & Coussens LM (2010) Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* **29**: 309–316
- Deng T, Yan G, Song X, Xie L, Zhou Y, Li J, Hu X, Li Z, Hu J, Zhang Y, *et al* (2018) Deubiquitylation and stabilization of p21 by USP11 is critical for cell-cycle progression and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 4678–4683
- D ery U, Coulombe Y, Rodrigue A, Stasiak A, Richard S & Masson J-Y (2008) A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol Cell Biol* **28**: 3058–3069
- Deshaies RJ & Joazeiro CAP (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399–434
- Deshpande RA, Lee JH, Arora S & Paull TT (2016) NBS1 converts the human MRE11/RAD50 nuclease complex into an endo/exonuclease machine specific for protein-DNA adducts. *Mol Cell* **64**: 593–606
- Dhawan P & Richmond A (2002) A novel NF- κ B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF- κ B activity in melanoma cells. *J Biol Chem* **277**: 7920–7928
- Diggle CP, Bentley J, Knowles MA & Kiltie AE (2005) Inhibition of double-strand break non-homologous end-joining by cisplatin adducts in human cell extracts. *Nucleic Acids Res* **33**: 2531–2539

- Dignam JD, Lebovitz RM & Roeder RG (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**: 1475–1489
- Digweed M & Sperling K (2004) Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* **3**: 1207–1217
- Dilruba S & Kalayda G v. (2016) Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol* **77**: 1103–1124
- DiMauro T & David G (2010) Ras-induced senescence and its physiological relevance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **10**: 869–876
- Dou Z & Berger SL (2018) Senescence elicits stemness: A surprising mechanism for cancer relapse. *Cell Metab* **27**: 710–711
- Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan JA, Zhu J, Ivanov A, Capell BC, Drake AM, Shah PP, *et al* (2015) Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527**: 105–109
- Drake KR, Kang M & Kenworthy AK (2010) Nucleocytoplasmic distribution and dynamics of the autophagosome marker EGFP-LC3. *PLoS One* **5**: e9806
- van Drogen F, Sangfelt O, Malyukova A, Matskova L, Yeh E, Means AR & Reed SI (2006) Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* **23**: 37–48
- Duffy MJ (2013) The war on cancer: are we winning? *Tumour Biol* **34**: 1275–1284
- Dutta A, Eckelmann B, Adhikari S, Ahmed KM, Sengupta S, Pandey A, Hegde PM, Tsai MS, Tainer JA, Weinfeld M, *et al* (2017) Microhomology-mediated end joining is activated in irradiated human cells due to phosphorylation-dependent formation of the XRCC1 repair complex. *Nucleic Acids Res* **45**: 2585–2599
- Dzutsev A, Badger JH, Perez-Chanona E, Roy S, Salcedo R, Smith CK & Trinchieri G (2017) Microbes and cancer. *Annu Rev Immunol* **35**: 199–228
- Ebi H, Matsuo K, Sugito N, Suzuki M, Osada H, Tajima K, Ueda R & Takahashi T (2007) Novel NBS1 heterozygous germ line mutation causing MRE11-binding domain loss predisposes to common types of cancer. *Cancer Res* **67**: 11158–11165
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW & Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817–825
- Elmore LW, Di X, Dumur C, Holt SE & Gewirtz DA (2005) Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response. *Clin Cancer Res* **11**: 2637–2643
- Eskelinen EL (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* **27**: 495–502
- Esteller M (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**: 286–298
- Faget D v., Ren Q & Stewart SA (2019) Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* **19**: 439–453
- Fairchild A, Tirumani SH, Rosenthal MH, Howard SA, Krajewski KM, Nishino M, Shinagare AB, Jagannathan JP & Ramaiya NH (2015) Hormonal therapy in oncology: a primer for the radiologist. *AJR Am J Roentgenol* **204**: W620–W630

- Falzone L, Salomone S & Libra M (2018) Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front Pharmacol* **9**: 1300
- Fan J, Bellon M, Ju M, Zhao L, Wei M, Fu L & Nicot C (2022) Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers. *Mol Cancer* **21**: 87
- Fang S & Weissman AM (2004) A field guide to ubiquitylation. *Cell mol life sci* **61**: 1546–1561
- Feldman DR, Bosl GJ, Sheinfeld J & Motzer RJ (2008) Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA* **299**: 672–684
- Feng Y, He D, Yao Z & Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* **24**: 24–41
- Fenton TR & Gout IT (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 47–59
- Fernández Ávila MJ (2016) Regulación de la reparación de los cortes de doble cadena en el ADN: Papel de la nedilación de proteínas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Ferrarese A, Marin O, Bustos VH, Venerando A, Antonelli M, Allende JE & Pinna LA (2007) Chemical dissection of the APC Repeat 3 multistep phosphorylation by the concerted action of protein kinases CK1 and GSK3. *Biochemistry* **46**: 11902–11910
- Fiol CJ, Wang A, Roeske RW & Roach PJ (1990) Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase 3 action using model peptide substrates. *J Biol Chem* **265**: 6061–6065
- Flick K, Raasi S, Zhang H, Yen JL & Kaiser P (2006) A ubiquitin-interacting motif protects polyubiquitinated Met4 from degradation by the 26S proteasome. *Nat Cell Biol* **8**: 509–515
- Flores-Pérez A, Rafaelli LE, Ramírez-Torres N, Aréchaga-Ocampo E, Frías S, Sánchez S, Marchat LA, Hidalgo-Miranda A, Quintanar-Jurado V, Rodríguez-Cuevas S, *et al* (2014) RAD50 targeting impairs DNA damage response and sensitizes human breast cancer cells to cisplatin therapy. *Cancer Biol Ther* **15**: 777–788
- Frame S & Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* **359**: 1–16
- Frescas D & Pagano M (2008) Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 438–449
- Fuchs SY, Spiegelman VS & Kumar KGS (2004) The many faces of β -TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**: 2028–2036
- Fukuda T, Naiki T, Saito M & Irie K (2009) hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. *Genes Cells* **14**: 113–128
- Gadhav K, Bolshette N, Ahire A, Pardeshi R, Thakur K, Trandafir C, Istrate A, Ahmed S, Lahkar M, Muresanu DF, *et al* (2016) The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **20**: 1392–1407
- Gaducci A, Cosio S, Muraca S & Genazzani AR (2002) Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol* **23**: 390–396
- Galindo-Moreno M, Giráldez S, Limón-Mortés MC, Belmonte-Fernández A, Reed SI, Sáez C, Japón MÁ, Tortolero M & Romero F (2019) SCF(FBXW7)-mediated degradation of p53 promotes cell recovery after UV-induced DNA damage. *FASEB J* **33**: 11420–11430

- Galindo-Moreno M, Giráldez S, Limón-Mortés MC, Belmonte-Fernández A, Sáez C, Japón M, Tortolero M & Romero F (2020) p53 and FBXW7: Sometimes two guardians are worse than one. *Cancers* **12**: 1–5
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M & Kroemer G (2011) Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid Redox Signal* **15**: 1691–1714
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M & Kroemer G (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**: 1869–1883
- Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M & Kroemer G (2014) Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis* **5**: e1257
- Gama V, Gomez JA, Mayo LD, Jackson MW, Danielpour D, Song K, Haas AL, Laughlin MJ & Matsuyama S (2009) Hdm2 is a ubiquitin ligase of Ku70-Akt promotes cell survival by inhibiting Hdm2-dependent Ku70 destabilization. *Cell Death Differ* **16**: 758–769
- Gama V, Yoshida T, Gomez JA, Basile DP, Mayo LD, Haas AL & Matsuyama S (2006) Involvement of the ubiquitin pathway in decreasing Ku70 levels in response to drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **312**: 488–499
- Gan W, Liu P & Wei W (2015) Akt promotes tumorigenesis in part through modulating genomic instability via phosphorylating XLF. *Nucleus* **6**: 261–265
- Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, Fu W, Zhang J, Wu W, Zhang X, *et al* (2010) Autophagy negatively regulates WNT signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol* **12**: 781–790
- Gao D, Inuzuka H, Tan MKM, Fukushima H, Locasale JW, Liu P, Wan L, Zhai B, Chin YR, Shaik S, *et al* (2011) mTOR drives its own activation via SCF(β TrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Mol Cell* **44**: 290–303
- Gatei M, Jakob B, Chen P, Kijas AW, Becherel OJ, Gueven N, Birrell G, Lee JH, Paull TT, Lerenthal Y, *et al* (2011) ATM protein-dependent phosphorylation of RAD50 protein Regulates DNA repair and cell cycle control. *J Biol Chem* **286**: 31542–31556
- Gatei M, Kijas AW, Biard D, Dörk T & Lavin MF (2014) RAD50 phosphorylation promotes ATR downstream signaling and DNA restart following replication stress. *Hum Mol Genet* **23**: 4232–4248
- Gatei M, Young D, Cersaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P & Khanna KK (2000) ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* **25**: 115–119
- Gately DP & Howell SB (1993) Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* **67**: 1171–1176
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ & Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**: 119–131
- Genschel J & Modrich P (2003) Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol Cell* **12**: 1077–1086
- Gerstein A v., Almeida TA, Zhao G, Chess E, Shih IM, Buhler K, Pienta K, Rubin MA, Vessella R & Papadopoulos N (2002) APC/CTNNB1 (β -catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **34**: 9–16

- Gersten O & Wilmoth JR (2002) The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res* **7**: 271–306
- Gillet LCJ & Schärer OD (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* **106**: 253–276
- Giráldez S (2014) Determinación de nuevos sustratos de la ubiquitin ligasa SCFFBXW7 α implicados en cáncer. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Giráldez S, Galindo-Moreno M, Limón-Mortés MC, Cristina Rivas A, Herrero-Ruiz J, Mora-Santos M, Sáez C, Japón MA, Tortolero M & Romero F (2017) G 1/S phase progression is regulated by PLK1 degradation through the CDK1/ β TrCP axis. *FASEB J* **31**: 2925–2936
- Giráldez S, Herrero-Ruiz J, Mora-Santos M, Japón MA, Tortolero M & Romero F (2014) SCFFBXW7 α modulates the intra-S-phase DNA-damage checkpoint by regulating Polo like kinase-1 stability. *Oncotarget* **5**: 4370–4383
- Gmeiner WH & Ghosh S (2015) Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnol Rev* **3**: 111–122
- Gómez-Sánchez R, Tooze SA & Reggiori F (2021) Membrane supply and remodeling during autophagosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **71**: 112–119
- Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, *et al* (2019) Cellular senescence: Defining a path forward. *Cell* **179**: 813–827
- Gottlieb TM & Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**: 131–142
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M & Lieber MR (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492–495
- Grivennikov SI, Greten FR & Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883–899
- Grumati P & Dikic I (2018) Ubiquitin signaling and autophagy. *J Biol Chem* **293**: 5404–5413
- Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF & Lieber MR (2007) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* **26**: 1010–1023
- Guardavaccaro D, Kudo Y, Boulaire J, Barchi M, Busino L, Donzelli M, Margottin-Goguet F, Jackson PK, Yamasaki L & Pagano M (2003) Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein β -TrCP1 *in vivo*. *Dev Cell* **4**: 799–812
- Guo F & Cui J (2020) Anti-angiogenesis: Opening a new window for immunotherapy. *Life Sci* **258**: 118163
- Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C & Kuperwasser C (2019) Phenotypic plasticity: driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Cell Stem Cell* **24**: 65–78
- Haglund K & Dikic I (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* **24**: 3353–3359
- Hanahan D (2022) Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov* **12**: 31–46
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674
- Hänle-Kreidler S, Richter KT & Hoffmann I (2022) The SCF-FBXW7 E3 ubiquitin ligase triggers degradation of histone 3 lysine 4 methyltransferase complex component WDR5 to prevent mitotic slippage. *J Biol Chem* **298**: 102703

- Hao B, Oehlmann S, Sowa ME, Harper JW & Pavletich NP (2007) Structure of a FBW7-SKP1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell* **26**: 131–143
- Hao B, Zheng N, Schulman BA, Wu G, Miller JJ, Pagano M & Pavletich NP (2005) Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell* **20**: 9–19
- Harrigan JA, Jacq X, Martin NM & Jackson SP (2018) Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **17**: 57–77
- Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del Los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, *et al* (1999) The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* **9**: 207–210
- Hartlerode AJ & Scully R (2009) Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* **423**: 157–168
- Hashimoto Y, Chaudhuri AR, Lopes M & Costanzo V (2010) RAD51 protects nascent DNA from MRE11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1305–1311
- Hayflick L & Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585–621
- He S & Sharpless NE (2017) Senescence in health and disease. *Cell* **169**: 1000–1011
- Healy CM & Moran GP (2019) The microbiome and oral cancer: More questions than answers. *Oral Oncol* **89**: 30–33
- Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V & Wargo JA (2019) The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med* **25**: 377–388
- Heo J, Eki R & Abbas T (2016) Deregulation of F-box proteins and its consequence on cancer development, progression and metastasis. *Semin Cancer Biol* **36**: 33–51
- Hernandez-Segura A, de Jong T V., Melov S, Guryev V, Campisi J & Demaria M (2017) Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells. *Curr Biol* **27**: 2652–2660.e4
- Hernandez-Segura A, Nehme J & Demaria M (2018) Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol* **28**: 436–453
- Herranz N, Gallage S, Mellone M, Wuestefeld T, Klotz S, Hanley CJ, Raguz S, Acosta JC, Innes AJ, Banito A, *et al* (2015) mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol* **17**: 1205–1217
- Herrero-Ruiz J (2015) Búsqueda de nuevos sustratos de SCF β TrCP implicados en tumorigénesis. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Hershko A, Heller H, Elias S & Ciechanover A (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**: 8206–8214
- Holzer AK, Manorek GH & Howell SB (2006) Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* **70**: 1390–1394
- Hong S, Zhao B, Lombard DB, Fingar DC & Inoki K (2014) Cross-talk between sirtuin and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in the regulation of S6 kinase 1 (S6K1) phosphorylation. *J Biol Chem* **289**: 13132–13141

- Hong X, Liu W, Song R, Shah JJ, Feng X, Tsang CK, Morgan KM, Bunting SF, Inuzuka H, Zheng XFS, *et al* (2016) SOX9 is targeted for proteasomal degradation by the E3 ligase FBW7 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* **44**: 8855–8869
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BAL, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, *et al* (2002) The RAD50 zinc-hook is a structure joining MRE11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**: 562–566
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP & Tainer JA (2001) Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair MRE11 nuclease and RAD50-ATPase. *Cell* **105**: 473–485
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP & Tainer JA (2000) Structural biology of RAD50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**: 789–800
- Hopfner KP & Tainer JA (2003) RAD50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 249–255
- Huang D, Savage SR, Calinawan AP, Lin C, Zhang B, Wang P, Starr TK, Birrer MJ & Paulovich AG (2021) A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene* **40**: 6395–6405
- Huang D, Su S, Cui X, Shen X, Zeng Y, Wu W, Chen J, Chen F, He C, Liu J, *et al* (2014) Nerve fibers in breast cancer tissues indicate aggressive tumor progression. *Medicine* **93**: e172
- Huang J, Grotzer MA, Watanabe T, Hewer E, Pietsch T, Rutkowski S & Ohgaki H (2008) Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene in medulloblastomas. *Clin Cancer Res* **14**: 4053–4058
- Huertas P (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 11–16
- Huertas P & Jackson SP (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* **284**: 9558–9565
- Hughes B (2010) Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nat Rev Drug Discov* **9**: 665–667
- Hwang HJ, Lee YR, Kang D, Lee HC, Seo HR, Ryu JK, Kim YN, Ko YG, Park HJ & Lee JS (2020) Endothelial cells under therapy-induced senescence secrete CXCL11, which increases aggressiveness of breast cancer cells. *Cancer Lett* **490**: 100–110
- Ikenoue T, Terakado Y, Zhu C, Liu X, Ohsugi T, Matsubara D, Fujii T, Kakuta S, Kubo S, Shibata T, *et al* (2018) Establishment and analysis of a novel mouse line carrying a conditional knockin allele of a cancer-specific FBXW7 mutation. *Sci Rep* **8**: 2021
- Inuzuka H, Tseng A, Gao D, Zhai B, Zhang Q, Shaik S, Wan L, Ang XL, Mock C, Yin H, *et al* (2010) Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the MDM2 oncoprotein via the SCF(β -TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **18**: 147–159
- Izadi M, Ali TA & Pourkarimi E (2021) Over fifty years of life, death, and cannibalism: A historical recollection of apoptosis and autophagy. *Int J Mol Sci* **22**: 12466
- Jaber N, Dou Z, Chen JS, Catanzaro J, Jiang YP, Ballou LM, Selinger E, Ouyang X, Lin RZ, Zhang J, *et al* (2012) Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 2003–2008
- Jackson SP & Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**: 1071–1078

- Jasin M & Rothstein R (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a012740
- Javaid S, Zhang J, Anderssen E, Black JC, Wittner BS, Tajima K, Ting DT, Smolen GA, Zubrowski M, Desai R, *et al* (2013) Dynamic chromatin modification sustains epithelial-mesenchymal transition following inducible expression of Snail-1. *Cell Rep* **5**: 1679–1689
- Ji CH, Kim HY, Lee MJ, Heo AJ, Park DY, Lim S, Shin S, Ganipiseti S, Yang WS, Jung CA, *et al* (2022a) The AUTOTAC chemical biology platform for targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system. *Nat Commun* **13**: 904
- Ji CH, Lee MJ, Kim HY, Heo AJ, Park DY, Kim YK, Kim BY & Kwon YT (2022b) Targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system: AUTOTAC (AUTOPhagy-TARgeting Chimera). *Autophagy* **18**: 2259–2262
- Jin C, Lagoudas GK, Zhao C, Bullman S, Bhutkar A, Hu B, Ameh S, Sandel D, Liang XS, Mazzilli S, *et al* (2019) Commensal microbiota promote lung cancer development via $\gamma\delta$ T cells. *Cell* **176**: 998-1013.e16
- Jin J, Shirogane T, Xu L, Nalepa G, Qin J, Elledge SJ & Harper JW (2003) SCF β -TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**: 3062–3074
- Joazeiro CAP, Wing SS, Huang HK, Levenson JD, Hunter T & Liu YC (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**: 309–312
- Jones PA & Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683–692
- Kalayda G v., Wagner CH, Buß I, Reedijk J & Jaehde U (2008) Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* **8**: 175
- Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, *et al* (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**: 333–339
- Kanemori Y, Uto K & Sagata N (2005) β -TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6279–6284
- Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, *et al* (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**: 547–551
- Karin M & Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**: 749–759
- Karnoub AE & Weinberg RA (2006) Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* **26**: 75–85
- Kastan MB (2008) DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol cancer res* **6**: 517–524
- Kaushal GP & Shah S v. (2016) Autophagy in acute kidney injury. *Kidney Int* **89**: 779–791
- Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**: 573–584
- Khaminets A, Behl C & Dikic I (2016) Ubiquitin-dependent and independent signals in selective autophagy. *Trends Cell Biol* **26**: 6–16

- Kharat SS, Tripathi V, Damodaran AP, Priyadarshini R, Chandra S, Tikoo S, Nandhakumar R, Srivastava V, Priya S, Hussain M, *et al* (2016) Mitotic phosphorylation of Bloom helicase at Thr182 is required for its proteasomal degradation and maintenance of chromosomal stability. *Oncogene* **35**: 1025–1038
- Kieffer SR & Lowndes NF (2022) Immediate-early, early, and late responses to DNA double stranded breaks. *Front Genet* **13**: 793884
- Kilari D, Guancial E & Kim ES (2016) Role of copper transporters in platinum resistance. *World J Clin Oncol* **7**: 106–113
- Kim CJ, Song JH, Cho YG, Kim YS, Kim SY, Nam SW, Yoo NJ, Lee JY & Park WS (2007) Somatic mutations of the β -TrCP gene in gastric cancer. *APMIS* **115**: 127–133
- Kim GW, Noshita N, Sugawara T & Chan PH (2001) Early decrease in dna repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **32**: 1401–1407
- Kim GY, Mercer SE, Ewton DZ, Yan Z, Jin K & Friedman E (2002) The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(CIP1) by phosphorylation. *J Biol Chem* **277**: 29792–29802
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan KL (2011a) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**: 132–141
- Kim JH, Grosbart M, Anand R, Wyman C, Cejka P & Petrini JHJ (2017) The MRE11-NBS1 interface is essential for viability and tumor suppression. *Cell Rep* **18**: 496–507
- Kim YT, Hur E-M, Snider WD & Zhou F-Q (2011b) Role of GSK3 signaling in neuronal morphogenesis. *Front Mol Neurosci* **4**: 48
- King JS (2012) Mechanical stress meets autophagy: potential implications for physiology and pathology. *Trends Mol Med* **18**: 583–588
- Kinner A, Wu W, Staudt C & Iliakis G (2008) γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* **36**: 5678–5694
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I & Dikic I (2009a) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* **34**: 259–269
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, *et al* (2009b) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**: 505–516
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH & Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579–5588
- Klionsky DJ, Eskelinen EL & Deretic V (2014) Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. *Autophagy* **10**: 549–551
- Klotz K, Cepeda D, Tan YM, Sun D, Sangfelt O & Spruck C (2009) SCF(FBXW7/hCdc4) targets cyclin E2 for ubiquitin-dependent proteolysis. *Exp Cell Res* **315**: 1832–1839
- Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, Chambwe N, Gao GF, Cherniack AD, Fan H, Shen H, Way GP, Greene CS, *et al* (2018) Genomic and molecular landscape of DNA damage repair deficiency across the cancer genome atlas. *Cell Rep* **23**: 239-254.e6
- Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Björkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, *et al* (1999) DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* **155**: 683–694

- Koch A, Waha A, Hartmann W, Hrychuk A, Schüller U, Waha A, Wharton KA, Fuchs SY, von Schweinitz D & Pietsch T (2005) Elevated expression of WNT antagonists is a common event in hepatoblastomas. *Clin Cancer Res* **11**: 4295–4304
- Koepf DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW & Elledge SJ (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFBW7 ubiquitin ligase. *Science* **294**: 173–177
- Kolinjivadi AM, Sannino V, de Antoni A, Zadorozhny K, Kilkenny M, Técher H, Baldi G, Shen R, Ciccia A, Pellegrini L, *et al* (2017) Smarcal1-mediated fork reversal triggers MRE11-dependent degradation of nascent DNA in the absence of BRCA2 and stable RAD51 nucleofilaments. *Mol Cell* **67**: 867-881.e7
- Komander D & Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**: 203–229
- Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S & Kawai T (2013) DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 2969–2974
- Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**: 524–530
- Korkola J & Gray JW (2010) Breast cancer genomes - form and function. *Curr Opin Genet Dev* **20**: 4–14
- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM & Rubinsztein DC (2009) Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* **33**: 517–527
- Kowald A, Passos JF & Kirkwood TBL (2020) On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell* **19**: e13270
- Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99–163
- Kroemer G, Mariño G & Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**: 280–293
- Kroll M, Margottin F, Kohl A, Renard P, Durand H, Concordet JP, Bachelier F, Arenzana-Seisdedos F & Benarous R (1999) Inducible degradation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ by the proteasome requires interaction with the F-box protein h- β TrCP. *J Biol Chem* **274**: 7941–7945
- Krug U, Ganser A & Koeffler HP (2002) Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**: 3475–3495
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ & Peeper DS (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**: 1019–1031
- Kulathu Y & Komander D (2012) Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 508–523
- Kulik R, Boehme KA & Blattner C (2005) Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of MDM2 regulates p53 abundance. *Mol Cell Biol* **25**: 7170–7180
- Kunkel TA & Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**: 681–710
- Kuras L, Rouillon A, Lee T, Barbey R, Tyers M & Thomas D (2002) Dual regulation of the Met4 transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment. *Mol Cell* **10**: 69–80

- Laberge RM, Sun Y, Orjalo A v., Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, *et al* (2015) mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* **17**: 1049–1061
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lafrance-Vanasse J, Williams GJ & Tainer JA (2015) Envisioning the dynamics and flexibility of MRE11-RAD50-NBS1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol* **117**: 182–193
- Lamarche BJ, Orazio NI & Weitzman MD (2010) The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett* **584**: 3682–3695
- Lamb CA, Yoshimori T & Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 759–774
- Lambert AW & Weinberg RA (2021) Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nat Rev Cancer* **21**: 325–338
- Lan H, Tan M, Zhang Q, Yang F, Wang S, Li H, Xiong X & Sun Y (2019) LSD1 destabilizes FBXW7 and abrogates FBXW7 functions independent of its demethylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 12311–12320
- Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E & Martin A (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* **482**: 186–191
- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15–16
- Lange SS, Takata KI & Wood RD (2011) DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**: 96–110
- Lassot I, Ségéral E, Berlioz-Torrent C, Durand H, Groussin L, Hai T, Benarous R & Margottin-Goguet F (2001) ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(β TrCP) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* **21**: 2192–2202
- Lau AW, Fukushima H & Wei W (2012) The FBW7 and β TRCP E3 ubiquitin ligases and their roles in tumorigenesis. *Front biosci* **17**: 2197–2212
- Le CP, Nowell CJ, Kim-Fuchs C, Botteri E, Hiller JG, Ismail H, Pimentel MA, Chai MG, Karnezis T, Rotmensz N, *et al* (2016) Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat Commun* **7**: 10634
- Lee JH & Paull TT (2004) Direct activation of the ATM protein kinase by the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Science* **304**: 93–96
- Lee JH & Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the MRE11-RAD50-NBS1 complex. *Science* **308**: 551–554
- Lee JY, Yu SJ, Park YG, Kim J & Sohn J (2007) Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates p21WAF1/CIP1 for proteasomal degradation after UV irradiation. *Mol Cell Biol* **27**: 3187–3198
- Lee S & Schmitt CA (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol* **21**: 94–101
- Lee Ventola C (2017a) Cancer immunotherapy, part 2: efficacy, safety, and other clinical considerations. *Pharmacy and Therapeutics* **42**: 452–463
- Lee Ventola C (2017b) Cancer immunotherapy, part 1: current strategies and agents. *Pharmacy and Therapeutics* **42**: 375–383

- Lees-Miller SP & Meek K (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* **85**: 1161–1173
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323–331
- Li M, Khambu B, Zhang H, Kang JH, Chen X, Chen D, Vollmer L, Liu PQ, Vogt A & Yin XM (2013) Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) activity. *J Biol Chem* **288**: 35769–35780
- Li S, Ting NSY, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EYHP & Lee WH (2000) Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* **406**: 210–215
- Li W & Ye Y (2008) Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell mol life sci* **65**: 2397–2406
- Li Y, Dowbenko D & Lasky LA (2002) AKT/PKB phosphorylation of p21CIP/WAF1 enhances protein stability of p21CIP/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem* **277**: 11352–11361
- Li Y, Jiang X, Zhang Y, Gao Z, Liu Y, Hu J, Hu X, Li L, Shi J & Gao N (2019) Nuclear accumulation of UBC9 contributes to SUMOylation of lamin A/C and nucleophagy in response to DNA damage. *J exp clin cancer res* **38**: 67
- Li Y, Wang J, Zhou G, Lajeunesse M, Le N, Stawicki BN, Corcino YL, Berkner KL & Runge KW (2017) Nonhomologous end-joining with minimal sequence loss is promoted by the MRE11-RAD50-NBS1-Ctp1 complex in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **206**: 481–496
- Li Z & Nakatogawa H (2022) Degradation of nuclear components via different autophagy pathways. *Trends Cell Biol* **32**: 574–584
- Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J & Lage H (2003) Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol* **121**: 172–176
- Lillberg K, Verkasalo PK, Kaprio J, Teppo L, Helenius H & Koskenvuo M (2003) Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am J Epidemiol* **157**: 415–423
- Lilley CE, Schwartz RA & Weitzman MD (2007) Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends Microbiol* **15**: 119–126
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JHJ & Kastan MB (2000) ATM phosphorylates p95/NBS1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* **404**: 613–617
- Lim HS, Kim JS, Park YB, Gwon GH & Cho Y (2011) Crystal structure of the MRE11–RAD50–ATPγS complex: understanding the interplay between MRE11 and RAD50. *Genes Dev* **25**: 1091–1104
- Limón-Mortés MC, Mora-Santos M, EspinaÁ. Á, Pintor-Toro JA, López-Román A, Tortolero M & Romero F (2008) UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1-β TrCP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Sci* **121**: 1825–1831
- Lin GL & Monje M (2020) Understanding the deadly silence of posterior fossa A ependymoma. *Mol Cell* **78**: 999–1001

- Lindner P, Paul S, Eckstein M, Hampel C, Muenzner JK, Erlenbach-Wuensch K, Ahmed HP, Mahadevan V, Brabletz T, Hartmann A, *et al* (2020) EMT transcription factor ZEB1 alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis* **11**: 147
- Lippai M & Low P (2014) The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int* **2014**: 832704
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X & He X (2002) Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837–847
- Liu J, Suresh Kumar KG, Yu D, Molton SA, McMahon M, Herlyn M, Thomas-Tikhonenko A & Fuchs SY (2007) Oncogenic BRAF regulates β -TrCP expression and NF- κ B activity in human melanoma cells. *Oncogene* **26**: 1954–1958
- Liu N, Li H, Li S, Shen M, Xiao N, Chen Y, Wang Y, Wang W, Wang R, Wang Q, *et al* (2010) The FBW7/Human CDC4 tumor suppressor targets proproliferative factor KLF5 for ubiquitination and degradation through multiple phosphodegron motifs. *J Biol Chem* **285**: 18858–18867
- Liu P, Gan W, Guo C, Xie A, Gao D, Guo J, Zhang J, Willis N, Su A, Asara JM, *et al* (2015) Akt-mediated phosphorylation of XLF impairs non-homologous end-joining DNA repair. *Mol Cell* **57**: 648–661
- Liu T & Huang J (2016) DNA end resection: facts and mechanisms. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**: 126–130
- Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C & Liu HF (2016b) p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett* **21**: 29
- Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A & Berk AJ (2005) Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J Virol* **79**: 14004–14016
- Liu Y, Sung S, Kim Y, Li F, Gwon G, Jo A, Kim A, Kim T, Song O, Lee SE, *et al* (2016a) ATP-dependent DNA binding, unwinding, and resection by the MRE11/RAD50 complex. *EMBO J* **35**: 743–758
- Long J, Gallagher TRA, Cavey JR, Sheppard PW, Ralston SH, Layfield R & Searle MS (2008) Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch. *J Biol Chem* **283**: 5427–5440
- Lu CS, Truong LN, Aslanian A, Shi LZ, Li Y, Hwang PYH, Koh KH, Hunter T, Yates JR, Berns MW, *et al* (2012) The RING finger protein RNF8 ubiquitinates NBS1 to promote DNA double-strand break repair by homologous recombination. *J Biol Chem* **287**: 43984–43994
- Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A & Petrini JHJ (1999) Disruption of mRAD50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7376–7381
- Ma Y, Cui D, Xiong X, Inuzuka H, Wei W, Sun Y, North BJ & Zhao Y (2019) SCF β -TrCP ubiquitinates CHK1 in an AMPK-dependent manner in response to glucose deprivation. *Mol Oncol* **13**: 307–321
- Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, Hsieh CL, Schwarz K & Lieber MR (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* **16**: 701–713

- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K & Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**: 781–794
- Ma Y, Schwarz K & Lieber MR (2005) The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair* **4**: 845–851
- MacDonald BT, Tamai K & He X (2009) WNT/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**: 9–26
- Magliozzi R, Peng M, Mohammed S, Guardavaccaro D, Heck AJR & Low TY (2015) Datasets from an interaction proteomics screen for substrates of the SCF β TrCP ubiquitin ligase. *Data Brief* **4**: 229–234
- Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ & Frenette PS (2013) Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* **341**: 1236361
- Magnuson B, Ekim B & Fingar DC (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* **441**: 1–21
- Mailand N, Bekker-Jensen S, Bartek J & Lukas J (2006) Destruction of Claspin by SCF β TrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell* **23**: 307–318
- Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual
- Marcand S (2014) How do telomeres and NHEJ coexist? *Mol Cell Oncol* **1**: e963438
- Marcomini I & Gasser SM (2015) Nuclear organization in DNA end processing: Telomeres vs double-strand breaks. *DNA Repair* **32**: 134–140
- Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K & Benarous R (1998) A novel human WD protein, h- β TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**: 565–574
- Martin LP, Hamilton TC & Schilder RJ (2008) Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* **14**: 1291–1295
- Martinez LA, Yang J, Vazquez ES, Rodriguez-Vargas MDC, Olive M, Hsieh JT, Logothetis CJ & Navone NM (2002) p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **23**: 1289–1296
- Maser RS, Zinkel R & Petrini JHJ (2001) An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* **27**: 417–421
- Mastalarz H, Mastalarz A, Wietrzyk J, Milczarek M, Kochel A & Regiec A (2020) Synthesis of platinum(II) complexes with some 1-methylnitropyrazoles and *in vitro* research on their cytotoxic activity. *Pharmaceuticals* **13**: 433
- Matange N, Podobnik M & Visweswariah SS (2015) Metallophosphoesterases: structural fidelity with functional promiscuity. *Biochem J* **467**: 201–216
- Matsumoto A, Onoyama I & Nakayama KI (2006) Expression of mouse FBXW7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **350**: 114–119
- Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M & Nukina N (2011) Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell* **44**: 279–289

- Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, Yu C, Bosanac I, Bustos D, Phu L, Kirkpatrick DS, Hymowitz SG, Rape M, *et al* (2010) K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell* **39**: 477–484
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, *et al* (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**: 1160–1166
- Mavrommati I, Faedda R, Galasso G, Li J, Burdova K, Fischer R, Kessler BM, Carrero ZI, Guardavaccaro D, Pagano M, *et al* (2018) β -TrCP- and casein kinase II-mediated degradation of cyclin F controls timely mitotic progression. *Cell Rep* **24**: 3404–3412
- Metzger MB, Hristova VA & Weissman AM (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* **125**: 531–537
- Michealraj KA, Kumar SA, Kim LJY, Cavalli FMG, Przelicki D, Wojcik JB, Delaidelli A, Bajic A, Saulnier O, MacLeod G, *et al* (2020) Metabolic regulation of the epigenome drives lethal infantile ependymoma. *Cell* **181**: 1329–1345
- Mijaljica D, Prescott M & Devenish RJ (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**: 673–682
- Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, Dörr JR, Dimitrova L, Lenze D, Monteiro Barbosa IA, *et al* (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**: 96–100
- Ming X, Groehler A, Michaelson-Richie ED, Villalta PW, Campbell C & Tretyakova NY (2017) Mass spectrometry based proteomics study of cisplatin-induced DNA-protein cross-linking in human fibrosarcoma (HT1080) cells. *Chem Res Toxicol* **30**: 980–995
- Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 132–139
- Möckel C, Lammens K, Schele A & Hopfner K-P (2012) ATP driven structural changes of the bacterial MRE11:RAD50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Res* **40**: 914–927
- Morris JR & Solomon E (2004) BRCA1:BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* **13**: 807–817
- Müerköster S, Arlt A, Sipos B, Witt M, Großmann M, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR & Schäfer H (2005) Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit β TRCP1 relates to constitutive nuclear factor- κ B activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **65**: 1316–1324
- Müller S, Dennemärker J & Reinheckel T (2012) Specific functions of lysosomal proteases in endocytic and autophagic pathways. *Biochim Biophys Acta* **1824**: 34–43
- Muñoz-Espín D & Serrano M (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 482–496
- Myeku N & Figueiredo-Pereira ME (2011) Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem* **286**: 22426–22440
- Myler LR, Gallardo IF, Soniat MM, Deshpande RA, Gonzalez XB, Kim Y, Paull TT & Finkelstein IJ (2017) Single-molecule imaging reveals how MRE11-RAD50-NBS1 initiates DNA break repair. *Mol Cell* **67**: 891-898.e4

- Myler LR, Gallardo IF, Zhou Y, Gong F, Yang SH, Wold MS, Miller KM, Paull TT & Finkelstein IJ (2016) Single-molecule imaging reveals the mechanism of Exo1 regulation by single-stranded DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E1170–E1179
- Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM & Dvorak HF (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* **36**: 321–331
- Nakagawa T & Nakayama K (2015) Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes Cells* **20**: 543–562
- Nakayama K, Hatakeyama S, Maruyama SI, Kikuchi A, Onoé K, Good RA & Nakayama KI (2003) Impaired degradation of inhibitory subunit of NF- κ B (I κ B) and β -catenin as a result of targeted disruption of the β -TrCP1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8752–8757
- Nakayama KI & Nakayama K (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 369–381
- Nash P, Tang X, Orlicky S, Chen Q, Gertler FB, Mendenhall MD, Sicheri F, Pawson T & Tyers M (2001) Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**: 514–521
- Negrini S, Gorgoulis VG & Halazonetis TD (2010) Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 220–228
- Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, Rotter-Maskowitz A, Weiser R, Mallel G, Gigi E, *et al* (2020) The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* **368**: 973–980
- Nick McElhinny SA & Ramsden DA (2004) Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunol Rev* **200**: 156–164
- Niculescu AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C & Reed SI (1998) Effects of p21(CIP1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**: 629–643
- Norbury CJ & Zhivotovsky B (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**: 2797–2808
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y & Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**: 3237–3245
- Oakley GG, Tillison K, Opiyo SA, Glanzer JG, Horn JM & Patrick SM (2009) Physical interaction between replication protein A (RPA) and MRN: involvement of RPA2 phosphorylation and the N-terminus of RPA1. *Biochemistry* **48**: 7473–7481
- Oh J & Symington LS (2018) Role of the MRE11 complex in preserving genome integrity. *Genes* **9**: 589
- Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, Bille K, Robert C, Bressac-de Paillerets B, Hofman P, *et al* (2011) Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev* **25**: 1245–1261
- Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K & Kanno J (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep* **16**: 192–201
- Ohtake F, Tsuchiya H, Saeki Y & Tanaka K (2018) K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E1401–E1408

- Okarvi SM (2008) Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer Treat Rev* **34**: 13–26
- Omran AR (2005) The epidemiologic transition: A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Q* **83**: 731–757
- Orenstein SJ & Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 719–726
- Ougolkov A, Zhang B, Yamashita K, Bilim V, Mai M, Fuchs SY & Minamoto T (2004) Associations among β -TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, β -catenin, and NF- κ B in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1161–1170
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, *et al* (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**: 1497–1500
- Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Øvervatn A, Bjørkøy G & Johansen T (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem* **285**: 5941–5953
- Papandreou ME & Tavernarakis N (2019) Nucleophagy: from homeostasis to disease. *Cell Death Differ* **26**: 630–639
- Park YB, Hohl M, Padjasek M, Jeong E, Jin KS, Krężel A, Petrini JHJ & Cho Y (2017) Eukaryotic RAD50 functions as a rod-shaped dimer. *Nat Struct Mol Biol* **24**: 248–257
- Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I & Nishino I (2009) Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy* **5**: 795–804
- Partecke LI, Speerforck S, Käding A, Seubert F, Kühn S, Lorenz E, Schwandke S, Sendler M, Keßler W, Trung DN, *et al* (2016) Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by β -adrenergic receptor blockade. *Pancreatology* **16**: 423–433
- Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, *et al* (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* **6**: 347
- Patel PL, Suram A, Mirani N, Bischof O & Herbig U (2016) Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E5024–E5033
- Pearce LR, Komander D & Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 9–22
- Pérez Berrocal DA, Witting KF, Ovaa H & Mulder MPC (2020) Hybrid chains: A collaboration of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers introducing cross-functionality to the ubiquitin code. *Front Chem* **7**: 931
- Pérez-Herrero E & Fernández-Medarde A (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur j pharm biopharm* **93**: 52–79
- Petroski MD & Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 9–20
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**: 503–533
- Pickart CM (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**: 181–190
- Pickart CM & Fushman D (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 610–616

- Ping B, He X, Xia W, Lee DF, Wei Y, Yu D, Mills G, Shi D & Hung MC (2006) Cytoplasmic expression of p21CIP1/WAF1 is correlated with IKK β overexpression in human breast cancers. *Int J Oncol* **29**: 1103–1110
- Piscitello D, Varshney D, Lilla S, Vizioli MG, Reid C, Gorbunova V, Seluanov A, Gillespie DA & Adams PD (2018) AKT overactivation can suppress DNA repair via p70S6 kinase-dependent downregulation of MRE11. *Oncogene* **37**: 427–438
- Planells-Cases R, Lutter D, Guyader C, Gerhards NM, Ullrich F, Elger DA, Kucukosmanoglu A, Xu G, Voss FK, Reincke SM, *et al* (2015) Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs. *EMBO J* **34**: 2993–3008
- Pollock PM & Meltzer PS (2002) Lucky draw in the gene raffle. *Nature* **417**: 906–907
- Polo SE & Jackson SP (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* **25**: 409–433
- Popovic D, Vucic D & Dikic I (2014) Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* **20**: 1242–1253
- Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF & Crooke ST (1979) Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev* **6**: 17–39
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA & Thomas G (1998) Phosphorylation and activation of p70S6K by PDK1. *Science* **279**: 707–710
- Pursiheimo JP, Rantanen K, Heikkinen PT, Johansen T & Jaakkola PM (2009) Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28**: 334–344
- Pushalkar S, Hundeyin M, Daley D, Zambirinis CP, Kurz E, Mishra A, Mohan N, Aykut B, Usyk M, Torres LE, *et al* (2018) The pancreatic cancer microbiome promotes oncogenesis by induction of innate and adaptive immune suppression. *Cancer Discov* **8**: 403–416
- Putters J, Slotman JA, Gerlach JP & Strous GJ (2011) Specificity, location and function of β TrCP isoforms and their splice variants. *Cell Signal* **23**: 641–647
- Qian B-Z & Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**: 39–51
- Qiu S & Huang J (2021) MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *J Zhejiang Univ Sci B* **22**: 31–37
- Qu K, Lin T, Wei J, Meng F, Wang Z, Huang Z, Wan Y, Song S, Liu S, Chang H, *et al* (2013) Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating p53 and p21 expression in HepG2 cells. *J South Med Univ* **33**: 1253–1259
- Rabinowitz JD & White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science* **330**: 1344–1348
- Rahimian E, Amini A, Alikarami F, Pezeshki SMS, Saki N & Safa M (2020) DNA repair pathways as guardians of the genome: Therapeutic potential and possible prognostic role in hematologic neoplasms. *DNA Repair* **96**: 102951
- Rahman S, Canny MD, Buschmann TA & Latham MP (2020) A survey of reported disease-related mutations in the MRE11-RAD50-NBS1 complex. *Cells* **9**: 1678
- Rajagopalan H, Jallepalli P V., Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B & Lengauer C (2004) Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* **428**: 77–81
- Rass E, Grabarz A, Plo I, Gautier J, Bertrand P & Lopez BS (2009) Role of MRE11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 819–824

- Ravid T & Hochstrasser M (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 679–689
- Ray U & Raghavan SC (2021) Understanding the DNA double-strand break repair and its therapeutic implications. *DNA Repair* **106**: 103177
- Reggiori F & Ungermann C (2017) Autophagosome maturation and fusion. *J Mol Biol* **429**: 486–496
- Roberti M, Schipani F, Bagnolini G, Milano D, Giacomini E, Falchi F, Balboni A, Manerba M, Farabegoli F, De Franco F, *et al* (2019) RAD51/BRCA2 disruptors inhibit homologous recombination and synergize with olaparib in pancreatic cancer cells. *Eur J Med Chem* **165**: 80–92
- Robertson H, Hayes JD & Sutherland C (2018) A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. *Biochem Pharmacol* **147**: 77–92
- Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB & Menck CFM (2018) DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* **73**: e478s
- Roffey SE & Litchfield DW (2021) CK2 regulation: perspectives in 2021. *Biomedicines* **9**: 1361
- Rojowska A, Lammens K, Seifert FU, Dierenberger C, Feldmann H & Hopfner K (2014) Structure of the RAD50 DNA double-strand break repair protein in complex with DNA. *EMBO J* **33**: 2847–2859
- Romero-Laorden N & Castro E (2017) Inherited mutations in DNA repair genes and cancer risk. *Curr Probl Cancer* **41**: 251–264
- Roos WP, Thomas AD & Kaina B (2016) DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* **16**: 20–33
- Rosenberg B, van Camp L, Grimley EB & Thomson AJ (1967) The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem* **242**: 1347–1352
- Rosenberg B, van Camp L & Krigas T (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**: 698–699
- Rosenberg B, van Camp L, Trosko JE & Mansour VH (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**: 385–386
- Roset R, Inagaki A, Hohl M, Brenet F, Lafrance-Vanasse J, Lange J, Scandura JM, Tainer JA, Keeney S & Petrini JHJ (2014) The RAD50 hook domain regulates DNA damage signaling and tumorigenesis. *Genes Dev* **28**: 451–462
- Rottenberg S, Disler C & Perego P (2021) The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **21**: 37–50
- Rudnik S & Damme M (2021) The lysosomal membrane-export of metabolites and beyond. *FEBS J* **288**: 4168–4182
- Runge KW & Li Y (2018) A curious new role for MRN in *Schizosaccharomyces pombe* non-homologous end-joining. *Curr Genet* **64**: 359–364
- Rupnik A, Lowndes NF & Grenon M (2010) MRN and the race to the break. *Chromosoma* **119**: 115–135
- Safaei R (2006) Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* **234**: 34–39

- Saito Y, Fujimoto H & Kobayashi J (2013) Role of NBS1 in DNA damage response and its relationship with cancer development. *Transl Cancer Res* **2**: 178–189
- Saitoh T & Katoh M (2001) Expression profiles of β TRCP1 and β TRCP2, and mutation analysis of β TRCP2 in gastric cancer. *Int J Oncol* **18**: 959–964
- Saleh T, Tyutyunyk-Massey L & Gewirtz DA (2019) Tumor cell escape from therapy-induced senescence as a model of disease recurrence after dormancy. *Cancer Res* **79**: 1044–1046
- Salk JJ, Fox EJ & Loeb LA (2010) Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol* **5**: 51–75
- Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M & Howell SB (2004) Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* **10**: 4661–4669
- San Filippo J, Sung P & Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**: 229–257
- Sancho-Martínez SM, Prieto-García L, Prieto M, López-Novoa JM & López-Hernández FJ (2012) Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther* **136**: 35–55
- Savic V, Yin B, Maas NL, Bredemeyer AL, Carpenter AC, Helmink BA, Yang-Iott KS, Sleckman BP & Bassing CH (2009) Formation of dynamic γ -H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol Cell* **34**: 298–310
- Schiller CB, Lammens K, Guerini I, Coordes B, Feldmann H, Schlauderer F, Möckel C, Schele A, Strässer K, Jackson SP, *et al* (2012) Structure of MRE11-NBS1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia-like disease mutations and DNA damage signaling. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 693–700
- Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H & Jasin M (2011) Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**: 529–542
- Schmidt ML, Calvisi DF & Clark GJ (2016) NORE1A regulates MDM2 via β -TrCP. *Cancers* **8**: 39
- Schmidt ML, Donninger H & Clark GJ (2014) Ras regulates SCF(β -TrCP) protein activity and specificity via its effector protein NORE1A. *J Biol Chem* **289**: 31102–31110
- Schreiber A & Peter M (2014) Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 163–181
- Schwartz DC & Hochstrasser M (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* **28**: 321–328
- Sears CL & Garrett WS (2014) Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* **15**: 317–328
- Sears CR & Turchi JJ (2012) Complex cisplatin-double strand break (DSB) lesions directly impair cellular non-homologous end-joining (NHEJ) independent of downstream damage response (DDR) pathways. *J Biol Chem* **287**: 24263–24272
- Senga SS & Grose RP (2021) Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol* **11**: 200358
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D & Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593–602

- Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M & Alahari SK (2016) Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer* **15**: 18
- Shah GA & O'Shea CC (2015) Viral and cellular genomes activate distinct DNA damage responses. *Cell* **162**: 987–1002
- Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, Okamoto T & Takahashi C (2009) Rb regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* **15**: 255–269
- Shao JX, Wang B, Yao YN, Pan ZJ, Shen Q & Zhou JY (2016) Autonomic nervous infiltration positively correlates with pathological risk grading and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer* **7**: 588–598
- Sharma P, Jhawar V, Mathur P & Dutt R (2022) Innovation in cancer therapeutics and regulatory perspectives. *Medical oncology* **39**: 76
- Sharma S, Javadekar SM, Pandey M, Srivastava M, Kumari R & Raghavan SC (2015) Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining. *Cell Death Dis* **6**: e1697
- Shewach DS & Kuchta RD (2009) Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chem Rev* **109**: 2859–2861
- Shibata A, Jeggo P & Löbrich M (2018) The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA Repair* **71**: 164–171
- Shin S, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J & Yoon SO (2011) Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E1204–E1213
- Shkundina IS, Gall AA, Dick A, Cocklin S & Mazin A V. (2021) New RAD51 inhibitors to target homologous recombination in human cells. *Genes* **12**: 920
- Shu J, Cui D, Ma Y, Xiong X, Sun Y & Zhao Y (2020) SCF β -TrCP-mediated degradation of TOP2 β promotes cancer cell survival in response to chemotherapeutic drugs targeting topoisomerase II. *Oncogenesis* **9**: 8
- Shuck SC, Short EA & Turchi JJ (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* **18**: 64–72
- Sigal A & Rotter V (2000) Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* **60**: 6788–6793
- Da Silva GN, De Camargo EA, Sávio ALV & Salvadori DMF (2014) MRE11A and SKP2 genes are associated with the increased cytotoxicity induced by the synergistic effects of cisplatin and gemcitabine in bladder cancer cells. *Mol Biol Rep* **41**: 4613–4621
- Skaar JR, Pagan JK & Pagano M (2013) Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 369–381
- Skaar JR, Pagan JK & Pagano M (2014) SCF ubiquitin ligase-targeted therapies. *Nat Rev Drug Discov* **13**: 889–903
- Skrypek N, Goossens S, de Smedt E, Vandamme N & Berx G (2017) Epithelial-to-mesenchymal transition: epigenetic reprogramming driving cellular plasticity. *Trends genet* **33**: 943–959
- Slobodkin MR & Elazar Z (2013) The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem* **55**: 51–64
- Sluijmer J & Distel B (2018) Regulating the human HECT E3 ligases. *Cell mol life sci* **75**: 3121–3141

- Smit JJ & Sixma TK (2014) RBR E3-ligases at work. *EMBO Rep* **15**: 142–154
- Sohn S-Y & Hearing P (2012) Adenovirus regulates sumoylation of MRE11-RAD50-NBS1 components through a paralog-specific mechanism. *J Virol* **86**: 9656–9665
- Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T & Kim KH (2003) Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem* **278**: 36676–36687
- Song Y, Niu J, Yue Z, Gao R, Zhang C & Ding W (2017) Increased chemo-sensitivity by knockdown coilin expression involved acceleration of premature cellular senescence in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **489**: 123–129
- Soubeyrand S, Pope L, de Chasseval R, Gosselin D, Dong F, de Villartay JP & Haché RJG (2006) Artemis phosphorylated by DNA-dependent protein kinase associates preferentially with discrete regions of chromatin. *J Mol Biol* **358**: 1200–1211
- Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z & Fuchs SY (2000) WNT/ β -catenin signaling induces the expression and activity of β TrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell* **5**: 877–882
- Spierings DCJ, de Vries EGE, Vellenga E & de Jong S (2003) Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* **10**: 808–822
- Spruck CH, Strohmaier H, Sangfelt O, Müller HM, Hubalek M, Müller-Holzner E, Marth C, Widschwendter M & Reed SI (2002) hCDC4 gene mutations in endometrial cancer. *Cancer Res* **62**: 4535–4539
- Stamos JL & Weis WI (2013) The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a007898
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NGJ, Raams A, Byrd PJ, Petrini JHJ & Taylor AMR (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **99**: 577–587
- Stracker TH, Carson CT & Weitzman MD (2002) Adenovirus oncoproteins inactivate the MRE11-RAD50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* **418**: 348–352
- Strebhardt K (2010) Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 643–660
- Sun X, Shi B, Zheng H, Min L, Yang J, Li X, Liao X, Huang W, Zhang M, Xu S, *et al* (2018) Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway. *Cell Death Dis* **9**: 260
- Sun Y, McCorvie TJ, Yates LA & Zhang X (2019) Structural basis of homologous recombination. *Cell Mol Life Sci* **77**: 3–18
- Sundaresan NR, Bindu S, Pillai VB, Samant S, Pan Y, Huang J-Y, Gupta M, Nagalingam RS, Wolfgeher D, Verdin E, *et al* (2015) SIRT3 blocks aging-associated tissue fibrosis in mice by deacetylating and activating glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol* **36**: 678–692
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A & Bray F (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **71**: 209–249
- Sutherland C (2011) What are the bona fide GSK3 substrates? *Int J Alzheimers Dis* **2011**: 505607

- Sutherland C, Leighton IA & Cohen P (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* **296** (Pt 1): 15–19
- Suzuki H, Chiba T, Suzuki T, Fujita T, Ikenoue T, Omata M, Furuichi K, Shikama H & Tanaka K (2000) Homodimer of two F-box proteins β TrCP1 or β TrCP2 binds to I κ B α for signal-dependent ubiquitination. *J Biol Chem* **275**: 2877–2884
- Swaney MH & Kalan LR (2021) Living in your skin: microbes, molecules, and mechanisms. *Infect Immun* **89**: e00695-20
- Syed A & Tainer JA (2018) The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair. *Annu Rev Biochem* **87**: 263–294
- Symington LS & Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**: 247–271
- Tadi SK, Tellier-Lebègue C, Nemoz C, Drevet P, Audebert S, Roy S, Meek K, Charbonnier JB & Modesti M (2016) PAXX is an accessory c-NHEJ factor that associates with Ku70 and has overlapping functions with XLF. *Cell Rep* **17**: 541–555
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A & Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17**: 5497–5508
- Talens F, Jalving M, Gietema JA & van Vugt MA (2017) Therapeutic targeting and patient selection for cancers with homologous recombination defects. *Expert Opin Drug Discov* **12**: 565–581
- Talmadge JE & Fidler IJ (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* **70**: 5649–5669
- Tan JMM, Wong ESP, Kirkpatrick DS, Pletnikova O, Ko HS, Tay SP, Ho MWL, Troncoso J, Gygi SP, Lee MK, *et al* (2008) Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **17**: 431–439
- Tatebe H, Lim CT, Konno H, Shiozaki K, Shinohara A, Uchihashi T & Furukohri A (2020) RAD50 zinc hook functions as a constitutive dimerization module interchangeable with SMC hinge. *Nat Commun* **11**: 370
- Taylor AMR, Groom A & Byrd PJ (2004) Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair* **3**: 1219–1225
- Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, Szallasi Z, Barry WT, Winer EP, Tung NM, *et al* (2016) Homologous recombination deficiency (HRD) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* **22**: 3764–3773
- Tempé D, Casas M, Karaz S, Blanchet-Tournier M-F & Concordet J-P (2006) Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCF β TrCP. *Mol Cell Biol* **26**: 4316–4326
- Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, Bankson JA, Ravoori M, *et al* (2006) Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* **12**: 939–944

- Thienpont B, van Dyck L & Lambrechts D (2016) Tumors smother their epigenome. *Mol Cell Oncol* **3**: e1240549
- Tomimatsu N, Mukherjee B, Catherine Hardebeck M, Ilcheva M, Vanessa Camacho C, Louise Harris J, Porteus M, Llorente B, Khanna KK um & Burma S (2014) Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nat Commun* **5**: 3561
- Tomkinson B & Lindås AC (2005) Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 1933–1937
- Tooze SA & Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**: 831–835
- Torrino S, Roustan F, Kaminski L, Bertero T, Pisano S, Ambrosetti D, Dufies M, Uhler JP, Lemichez E, Mettouchi A, *et al* (2019) UBD1 is a mechano-regulator controlling cancer aggressiveness. *EMBO Rep* **20**: e46570
- Tripathi V, Agarwal H, Priya S, Batra H, Modi P, Pandey M, Saha D, Raghavan SC & Sengupta S (2018) MRN complex-dependent recruitment of ubiquitylated BLM helicase to DSBs negatively regulates DNA repair pathways. *Nat Commun* **9**: 1016
- Tripathi V, Kaur E, Kharat SS, Hussain M, Damodaran AP, Kulshrestha S & Sengupta S (2019) Abrogation of FBW7 α -dependent p53 degradation enhances p53's function as a tumor suppressor. *J Biol Chem* **294**: 13224–13232
- Tsai CJ, Kim SA & Chu G (2007) Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7851–7856
- Tsvetkov L & Stern DF (2005) Interaction of chromatin-associated PLK1 and Mcm7. *J Biol Chem* **280**: 11943–11947
- Uematsu N, Weterings E, Yano KI, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BPC & Chen DJ (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **177**: 219–229
- Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC & Chaney SG (1998) The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* **58**: 3579–3585
- Vallerga MB, Mansilla SF, Federico MB, Bertolin AP & Gottifredi V (2015) RAD51 recombinase prevents MRE11 nuclease-dependent degradation and excessive PrimPol-mediated elongation of nascent DNA after UV irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E6624–E6633
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cersaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, *et al* (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* **93**: 467–476
- Vineis P, Manuguerra M, Kavvoura FK, Guarrera S, Allione A, Rosa F, di Gregorio A, Polidoro S, Saletta F, Ioannidis JPA, *et al* (2009) A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst* **101**: 24–36
- Vissinga CS, Yeo TC, Warren S, Brawley J v., Phillips J, Cersaletti K & Concannon P (2009) Nuclear export of NBN is required for normal cellular responses to radiation. *Mol Cell Biol* **29**: 1000–1006
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M & Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 385–392

- Vousden KH & Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 275–283
- Walker JR, Corpina RA & Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**: 607–614
- Walters R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Sobock A, Wieland B, Varon R, Lerenthal Y, Lavin MF, *et al* (2009) Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet* **84**: 605–616
- Wang B, Kohli J & Demaria M (2020a) Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends Cancer* **6**: 838–857
- Wang B & Kundu M (2017) Canonical and noncanonical functions of ULK/Atg1. *Curr Opin Cell Biol* **45**: 47–54
- Wang D, Xiao F, Feng Z, Li M, Kong L, Huang L, Wei Y, Li H, Liu F, Zhang H, *et al* (2020b) Sunitinib facilitates metastatic breast cancer spreading by inducing endothelial cell senescence. *Breast cancer res* **22**: 103
- Wang H, Shi LZ, Wong CCL, Han X, Hwang PYH, Truong LN, Zhu Q, Shao Z, Chen DJ, Berns MW, *et al* (2013a) The interaction of CtIP and NBS1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet* **9**: e1003277
- Wang HM, Xu YF, Ning SL, Yang DX, Li Y, Du YJ, Yang F, Zhang Y, Liang N, Yao W, *et al* (2014b) The catalytic region and PEST domain of PTPN18 distinctly regulate the HER2 phosphorylation and ubiquitination barcodes. *Cell Res* **24**: 1067–1090
- Wang L, Zhao X, Fu J, Xu W & Yuan J (2021) The Role of tumour metabolism in cisplatin resistance. *Front Mol Biosci* **8**: 691795
- Wang Q, Goldstein M, Alexander P, Wakeman TP, Sun T, Feng J, Lou Z, Kastan MB & Wang XF (2014a) RAD17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J* **33**: 862–877
- Wang X, Wong SC, Pan J, Tsao SW, Fung KH, Kwong DL, Sham JS & Nicholls JM (1998) Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res* **58**: 5019–5022
- Wang XJ, Yu J, Wong SH, Cheng AS, Chan FK, Ng SS, Cho CH, Sung JJ & Wu WK (2013b) A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy* **9**: 1500–1508
- Wang Z, Liu P, Inuzuka H & Wei W (2014c) Roles of F-box proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**: 233–247
- Warfel NA & El-Deiry WS (2013) p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol* **25**: 52–58
- Watanabe N, Arai H, Iwasaki JI, Shiina M, Ogata K, Hunter T & Osada H (2005) Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic WEE1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11663–11668
- Watanabe N, Arai H, Nishihara Y, Taniguchi M, Watanabe N, Hunter T & Osada H (2004) M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic WEE1 by SCF β -TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4419–4424
- Watanabe T, Nobusawa S, Lu S, Huang J, Mittelbronn M & Ohgaki H (2009a) Mutational inactivation of the Nijmegen breakage syndrome gene (*NBS1*) in glioblastomas is associated with multiple *TP53* mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**: 210–215

- Watanabe T, Noritake J, Kakeno M, Matsui T, Harada T, Wang S, Itoh N, Sato K, Matsuzawa K, Iwamatsu A, *et al* (2009b) Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3 β regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Sci* **122**: 2969–2979
- Wei S, Chu PC, Chuang HC, Hung WC, Kulp SK & Chen CS (2012) Targeting the oncogenic E3 ligase SKP2 in prostate and breast cancer cells with a novel energy restriction-mimetic agent. *PLoS One* **7**: e47298
- Wei S, Yang HC, Chuang HC, Yang J, Kulp SK, Lu PJ, Lai MD & Chen CS (2008) A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells. *J Biol Chem* **283**: 26759–26770
- Welcker M, Larimore EA, Frappier L & Clurman BE (2011) Nucleolar targeting of the FBW7 ubiquitin ligase by a pseudosubstrate and glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* **31**: 1214–1224
- Welcker M, Larimore EA, Swanger J, Bengoechea-Alonso MT, Grim JE, Ericsson J, Zheng N & Clurman BE (2013) FBW7 dimerization determines the specificity and robustness of substrate degradation. *Genes Dev* **27**: 2531–2536
- Wileman T (2013) Autophagy as a defence against intracellular pathogens. *Essays Biochem* **55**: 153–163
- Williams GJ, Lees-Miller SP & Tainer JA (2010) MRE11-RAD50-NBS1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair* **9**: 1299–1306
- Williams RS, Moncalian G, Williams JS, Yamada Y, Limbo O, Shin DS, Grocock LM, Cahill D, Hitomi C, Guenther G, *et al* (2008) MRE11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* **135**: 97–109
- Willis JR & Gabaldón T (2020) The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems. *Microorganisms* **8**: 308
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, *et al* (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**: 1108–1113
- Wood RD, Araújo SJ, Ariza RR, Batty DP, Biggerstaff M, Evans E, Gaillard PH, Gunz D, Köberle B, Kuraoka I, *et al* (2000) DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 173–182
- Wu J, Zhang X, Zhang L, Wu CY, Rezaeian AH, Chan CH, Li JM, Wang J, Gao Y, Han F, *et al* (2012) SKP2 E3 ligase integrates ATM activation and homologous recombination repair by ubiquitinating NBS1. *Mol Cell* **46**: 351–361
- Wu X, Ranganathant V, Weisman DS, Helne WF, Ciccone DN, O'Neill TB, Crick KE, Pierce KA, Lane WS, Rathbun G, *et al* (2000) ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* **405**: 477–482
- Xia Y, Padre RC, De Mendoza TH, Bottero V, Tergaonkar VB & Verma IM (2009) Phosphorylation of p53 by I κ B kinase 2 promotes its degradation by β -TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2629–2634
- Xiao J, Zhang Z, Chen GG, Zhang M, Ding Y, Fu J, Li M & Yun JP (2009) Nucleophosmin/B23 interacts with p21WAF1/CIP1 and contributes to its stability. *Cell cycle* **8**: 889–895
- Xiao Y & Weaver DT (1997) Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair MRE11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **25**: 2985–2991

- Xu C, Wang L, Fozouni P, Evjen G, Chandra V, Jiang J, Lu C, Nicastrì M, Bretz C, Winkler JD, *et al* (2020b) SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing. *Nat Cell Biol* **22**: 1170–1179
- Xu J, Peng J-J, Yang W, Fu K & Zhang Y (2020a) Vaginal microbiomes and ovarian cancer: a review. *Am J Cancer Res* **10**: 743–756
- Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D & Peng J (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**: 133–145
- Xu W, Taranets L & Popov N (2016) Regulating FBW7 on the road to cancer. *Semin Cancer Biol* **36**: 62–70
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C & Lowe SW (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**: 656–660
- Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, *et al* (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**: 1114–1117
- Yamanaka K, Chatterjee N, Hemann MT & Walker GC (2017) Inhibition of mutagenic translesion synthesis: A possible strategy for improving chemotherapy? *PLoS Genet* **13**: e1006842
- Yaneva M, Kowalewski T & Lieber MR (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* **16**: 5098–5112
- Ye Y & Rape M (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 755–764
- Yim H & Erikson RL (2009) Polo-like kinase 1 depletion induces DNA damage in early S prior to caspase activation. *Mol Cell Biol* **29**: 2609–2621
- Yoo S & Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* **27**: 4679–4686
- Yosef R, Pilpel N, Papisov N, Gal H, Ovadya Y, Vadai E, Miller S, Porat Z, Ben-Dor S & Krizhanovsky V (2017) p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J* **36**: 2280–2295
- Yu L, Fan Z, Fang S, Yang J, Gao T, Simões BM, Eyre R, Guo W & Clarke RB (2016) Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating Notch signaling. *Oncotarget* **7**: 33055–33068
- Yu X & Chen J (2004) DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol* **24**: 9478–9486
- Yu X, Fu S, Lai M, Baer R & Chen J (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* **20**: 1721–1726
- Yu Z, Vogel G, Yan C, Dubeau D, Spehalski E, Hébert J, Ferguson DO, Masson JY & Richard S (2012) The MRE11 GAR motif regulates DNA double-strand break processing and ATR activation. *Cell Res* **22**: 305–320
- Yumimoto K & Nakayama KI (2020) Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor. *Semin Cancer Biol* **67**: 1–15

- Yun MH & Hiom K (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**: 460–463
- Zahalka AH, Arnal-Estapé A, Maryanovich M, Nakahara F, Cruz CD, Finley LWS & Frenette PS (2017) Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. *Science* **358**: 321–326
- Zahavi D & Weiner L (2020) Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Antibodies* **9**: 34
- Zeman MK & Cimprich KA (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* **16**: 2–9
- Zhang D, Tang B, Xie X, Xiao YF, Yang SM & Zhang JW (2015) The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **16**: 1005–1013
- Zhang H (2020) Mechanisms of mutagenesis induced by DNA lesions: multiple factors affect mutations in translesion DNA synthesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **55**: 219–251
- Zhang HH, Lipovsky AI, Dibble CC, Sahin M & Manning BD (2006) S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol Cell* **24**: 185–197
- Zhang HT, Gui T, Liu RX, Tong KL, Wu CJ, Li Z, Huang X, Xu QT, Yang J, Tang W, *et al* (2021) Sequential targeting of YAP1 and p21 enhances the elimination of senescent cells induced by the BET inhibitor JQ1. *Cell Death Dis* **12**: 121
- Zhang L, Mei Y, Fu NY, Guan L, Xie W, Liu HH, Yu CD, Yin Z, Yu VC & You H (2012) TRIM39 regulates cell cycle progression and DNA damage responses via stabilizing p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 20937–20942
- Zhang Q, Karnak D, Tan M, Lawrence TS, Morgan MA & Sun Y (2016) FBXW7 facilitates nonhomologous end-joining via K63-linked polyubiquitylation of XRCC4. *Mol Cell* **61**: 419–433
- Zhang Y, Gao Y, Zhang G, Huang S, Dong Z, Kong C, Su D, Du J, Zhu S, Liang Q, *et al* (2011) DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. *Int J Cancer* **128**: 551–561
- Zhao C-Y, Cheng R, Yang Z & Tian Z-M (2018) Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy. *Molecules* **23**: 826
- Zhao L, Li W, Luo X & Sheng S (2021) The multifaceted roles of nucleophagy in cancer development and therapy. *Cell Biol Int* **45**: 246–257
- Zhao Y, Xiong X & Sun Y (2011) DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell* **44**: 304–316
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, *et al* (2002) Structure of the CUL1-RBX1-SKP1-F box SKP2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703–709
- Zheng N & Shabek N (2017) Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annu Rev Biochem* **86**: 129–157
- Zhou X, Dong R, Zhang JY, Zheng X & Sun LP (2020) PROTAC: A promising technology for cancer treatment. *Eur J Med Chem* **203**: 112539
- Zhu J, Petersen S, Tessarollo L & Nussenzweig A (2001) Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **11**: 105–109

Anexo. Publicación científica

ARTICLE OPEN



Cisplatin-induced cell death increases the degradation of the MRE11-RAD50-NBS1 complex through the autophagy/lysosomal pathway

Alejandro Belmonte-Fernández¹, Joaquín Herrero-Ruiz¹, María Galindo-Moreno¹, M. Cristina Limón-Mortés¹, Mar Mora-Santos¹, Carmen Sáez², Miguel Á. Japón², María Tortolero¹ and Francisco Romero¹✉

© The Author(s) 2022

Cisplatin and other platinum-based anticancer agents are among the most widely used chemotherapy drugs in the treatment of different types of cancer. However, it is common to find patients who respond well to treatment at first but later relapse due to the appearance of resistance to cisplatin. Among the mechanisms responsible for this phenomenon is the increase in DNA damage repair. Here, we elucidate the effect of cisplatin on the MRN (MRE11-RAD50-NBS1) DNA damage sensor complex. We found that the tumor suppressor FBXW7 is a key factor in controlling the turnover of the MRN complex by inducing its degradation through lysosomes. Inhibition of lysosomal enzymes allowed the detection of the association of FBXW7-dependent ubiquitylated MRN with LC3 and the autophagy adaptor p62/SQSTM1 and the localization of MRN in lysosomes. Furthermore, cisplatin-induced cell death increased MRN degradation, suggesting that this complex is one of the targets that favor cell death. These findings open the possibility of using the induction of the degradation of the MRN complex after genotoxic damage as a potential therapeutic strategy to eliminate tumor cells.

Cell Death & Differentiation (2023) 30:488–499; <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01100-1>

INTRODUCTION

Cisplatin (CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum II) is a key drug in the fight against cancer. Since its discovery, it has been widely used in chemotherapy treatments. Currently, platinum-based drugs are used for the treatment of many cancers, including cervical, ovarian, testicular, head and neck, breast, bladder, esophageal, stomach, prostate, and lung cancers [1]. Also, to treat Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas, neuroblastoma, sarcomas, multiple myeloma, melanoma, and mesothelioma [2]. Cisplatin, activated by intracellular hydrolysis of chlorides, binds to DNA to form monoadducts as well as intra- and interstrand DNA cross-links [3]. As a result, it causes inhibition of replication and transcription, arrests the cell cycle, and, since cells cannot repair DNA damage, induces cell death [4]. However, the use of cisplatin is often limited by inherent or acquired chemoresistance, leading to therapeutic failure. This is especially relevant after repeated cycles of therapy, which can enhance the ability to repair DNA damage to avoid cell death. Various mechanisms are involved in the repair of DNA damage caused by cisplatin, such as nucleotide excision repair, homologous recombination (HR), and nonhomologous end joining (NHEJ), among others [5]. These observations are the basis for the use of repair inhibitors to enhance the therapeutic effects of DNA-damaging drugs [6].

Double-stranded breaks (DSBs) can be recognized by either the MRN (MRE11-RAD50-NBS1) or the KU70/KU80 complexes. Binding

of the first complex prepares the breaks for HR repair, while binding of the second leads to NHEJ [7]. The MRN complex is made up of two subunits of MRE11, two subunits of RAD50, and two subunits of NBS1, and functions in both DSB detection and repair [8]. The recruitment of MRN to DNA damage sites is mediated by its association with several proteins, such as γ H2AX or RAD17 [9, 10]. MRE11 is the key component of the MRN complex, exhibiting both endonuclease and exonuclease activities from 3'-5' [11]. The proteins UBQLN4, C1QBP, p97/VCP or GRB2 regulate the nuclease activity of MRE11 by preventing binding of MRE11 to DNA or by removing MRE11 from damaged chromatin [12–15].

It has been described that the decrease in DYNLL1, which binds to and inhibits the resection activity of MRE11, restored HR in *BRCA1* mutant cells inducing resistance to cisplatin [16]. In fact, *BRCA1* mutant patients with low *DYNLL1* expression significantly correlated with poor progression-free survival. Furthermore, it has also been shown that *NBS1* or *RAD50* disruption enhanced cisplatin chemosensitization in human tumor cells [17, 18]. These and other findings relate the activity of the MRN complex to platinum-based chemoresistance.

In yeast, activation of the DNA damage checkpoint induced the degradation of core histones and the recruitment of ubiquitin ligases and the proteasome to chromatin [19]. The two main protein degradation pathways in eukaryotic cells are

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla E-41012, Spain. ²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) and Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla E-41013, Spain. ✉email: frport@us.es
Edited by M Piacentini

Received: 27 May 2022 Revised: 17 November 2022 Accepted: 25 November 2022
Published online: 8 December 2022

the ubiquitin-dependent proteasome system and the autophagy/lysosomal pathway. In both cases, ubiquitylated proteins are recognized and degraded by the proteasome or lysosome, respectively [20]. Three enzymes are involved in the ubiquitylation of proteins: E1 ubiquitin activating enzyme, E2 ubiquitin conjugating enzyme, and E3 ubiquitin protein ligase. The E3 ubiquitin ligases are responsible for substrate recognition and thus determine the specificity of the process. The proteasome recognizes ubiquitylated substrates through its ubiquitin receptors, removes ubiquitins, and proteins are digested to peptides [21]. Alternatively, p62/SQSTM1 and other autophagy adaptor proteins target ubiquitylated proteins to the entry of autophagosomes through the LC3-II protein. Autophagosomes fuse to the lysosome to degrade content, including p62 and ubiquitylated proteins [22].

SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) is a multisubunit ubiquitin ligase comprised of three invariant components and an interchangeable component, the F-box protein, which specifically binds to substrates. FBXW7, one of the F-box proteins of the SCF complex, is encoded by a gene that appears frequently mutated or suppressed in human cancers. For this and other reasons, FBXW7 is considered a tumor suppressor, although it may depend on the cellular context [23, 24].

Based on a previous proteomic study, this paper analyzes the association of FBXW7 with the MRN complex and its role in response to platinum-based chemotherapies. We discuss the importance of promoting MRN degradation by SCF (FBXW7) to avoid platinum resistance.

RESULTS

FBXW7 induces lysosomal degradation of the MRN complex

In previous mass spectrometry studies of Flag FBXW7 immunoprecipitates from transiently transfected COS-7 cells [25], we identified a single peptide corresponding to MRE11 residues 468–478 (Supplementary Fig. S1A). To verify that FBXW7 and Mre11 are associated in vivo in normally growing cells, the presence of MRE11 in Flag FBXW7 immune complexes was analyzed by Western blotting. Figure 1A shows that not only endogenous MRE11, but also NBS1 and RAD50 interact directly or indirectly with Flag FBXW7. It also shows that these interactions are specifically detected in the nuclear fraction of cells. Furthermore, reciprocal co-immunoprecipitation experiments revealed that Flag FBXW7 also coprecipitated with MRE11, NBS1 and RAD50 immune complexes, respectively (Fig. 1B). But, most importantly, FBXW7 and the MRN complex at endogenous levels bind to each other under unstimulated physiological conditions, as we were able to demonstrate using an anti-FBXW7 antibody (Fig. 1C and Supplementary Fig. S1B). As at least in our hands, commercial FBXW7 antibodies do not work well in Western blot analyses, we used coimmunoprecipitation of PLK1 as a positive control for the good functioning of FBXW7 immunoprecipitation [25]. To determine whether the SCF (FBXW7) ubiquitin ligase could be involved in the stability of the MRN complex proteins, we first analyzed the effect of proteasomal or lysosomal inhibitors on the amount of MRN complex components. Treatment of U2OS cells with the proteasomal inhibitor MG132 did not increase the levels of MRE11, NBS1 or RAD50 (Supplementary Fig. S1C and Supplementary Table S1). However, inhibition of lysosomal activity by concanamycin A or ammonium chloride did induce an increase in the amount of MRN in the nuclear fraction of these cells (left and center panels of Fig. 1D, respectively, and Supplementary Fig. S1D). The accumulation of BrCA1 after ammonium chloride treatment was used as a control [26]. In addition, activation of the autophagy/lysosome pathway using rapamycin or trehalose caused a slight decrease in the levels of the proteins of the MRN complex (right panels of Fig. 1D and Supplementary Fig. S1D). Therefore, MRN complex proteins are degraded through the

lysosome. Next, we constructed lentivirus expressing *FBXW7* or *FBXW7ΔF*, which encodes a dominant negative form of FBXW7 [27], and infected U2OS cells to study their effects on the MRN complex. We found that FBXW7 decreased the amount of the three proteins of the complex, while FBXW7ΔF prevented this reduction (Fig. 1E and Supplementary Fig. S1E). Cyclin E was used as a known protein that is degraded by FBXW7 [28]. Furthermore, the treatment with concanamycin A avoided the degradation of MRN due to SCF (FBXW7) (Fig. 1F and Supplementary Fig. S1F). Together, these results indicate that SCF (FBXW7) induces the degradation of the MRN complex by the lysosome.

MRN degradation is mediated by the Ub-p62-LC3 pathway

To learn more about the degradation of the MRN complex by SCF (FBXW7)/lysosome, we analyzed the ability of SCF (FBXW7) to target proteins from the MRN complex for ubiquitylation in vivo. HEK293T cells expressing epitope-tagged MRE11, NBS1 or RAD50, and Myc Ub in the presence or absence of epitope-tagged FBXW7 were used to assess MRN ubiquitylation. We observed an increase in K48-linked polyubiquitylation in each of the proteins when cells were also transfected with *FBXW7* (Fig. 2A). However, when we examined the in vitro ubiquitylation of transcribed and translated [³⁵S]-labeled MRE11, NBS1 or RAD50 by recombinant SCF (FBXW7) produced in insect cells, only high molecular weight ubiquitylated forms of MRE11 were detected (Fig. 2B). These results suggest that MRE11 is the direct substrate of FBXW7 and that, once bound, SCF (FBXW7) also targets NBS1 and RAD50 for ubiquitylation.

Degradation of ubiquitylated proteins through the autophagy/lysosome pathway is usually mediated by an ubiquitin-binding protein (such as p62), which binds directly to ubiquitylated proteins and to autophagosome-associated LC3 [29]. To determine the implication of these proteins in MRN degradation, we explored the potential in vivo association of the MRN complex with p62/LC3 by means of coimmunoprecipitation assays. We detected the association between MRN and p62/LC3 by inhibiting lysosomal enzymes with ammonium chloride, an interaction that was not observed using extracts from untreated cells, probably because proteins were degraded by the lysosome (Fig. 2C). Even more, knockdown experiments showed that reduced expression of *p62* or *LC3* increased the levels of the MRN complex proteins (Fig. 2D). Similar results were obtained using cells transfected with siRNA FBXW7 or an *FBXW7*^{-/-} cell line (Fig. 2D and Supplementary Fig. S2). Overall, these data demonstrate that degradation of MRN by the lysosome is mediated by p62/LC3.

SCF (FBXW7) promotes the association of MRN with p62/LC3 in the nuclei of U2OS cells

The proteins of the MRN complex are mainly located in the nucleus [30]. However, p62 and LC3 are found in both the nucleus and the cytoplasm [29]. To find out where the association of MRN with p62/LC3 takes place, we performed subcellular fractionation experiments. By blocking lysosomal activity with ammonium chloride, we showed that the in vivo association of MRN with p62/LC3 occurs exclusively in the nuclear fraction of U2OS cells (Fig. 3A). However, these assays do not rule out that there are also associations in the cytoplasm, mainly because of the detection limitations of coimmunoprecipitation experiments. Although, they would clearly be less relevant than those in the nucleus. In the same vein, light microscopy examination revealed that endogenous RAD50 (or MRE11) and LC3 (or p62) are localized in the periphery of the nuclei of cells treated with concanamycin A, which is not observed in untreated cells (Fig. 3B and Supplementary Fig. S3A, B, C). Therefore, we can conclude that the MRN-p62/LC3 interaction occurs primarily in the nuclei of U2OS cells.

To establish the involvement of SCF (FBXW7) in the MRN-p62/LC3 association, we used U2OS cells expressing *FBXW7* or

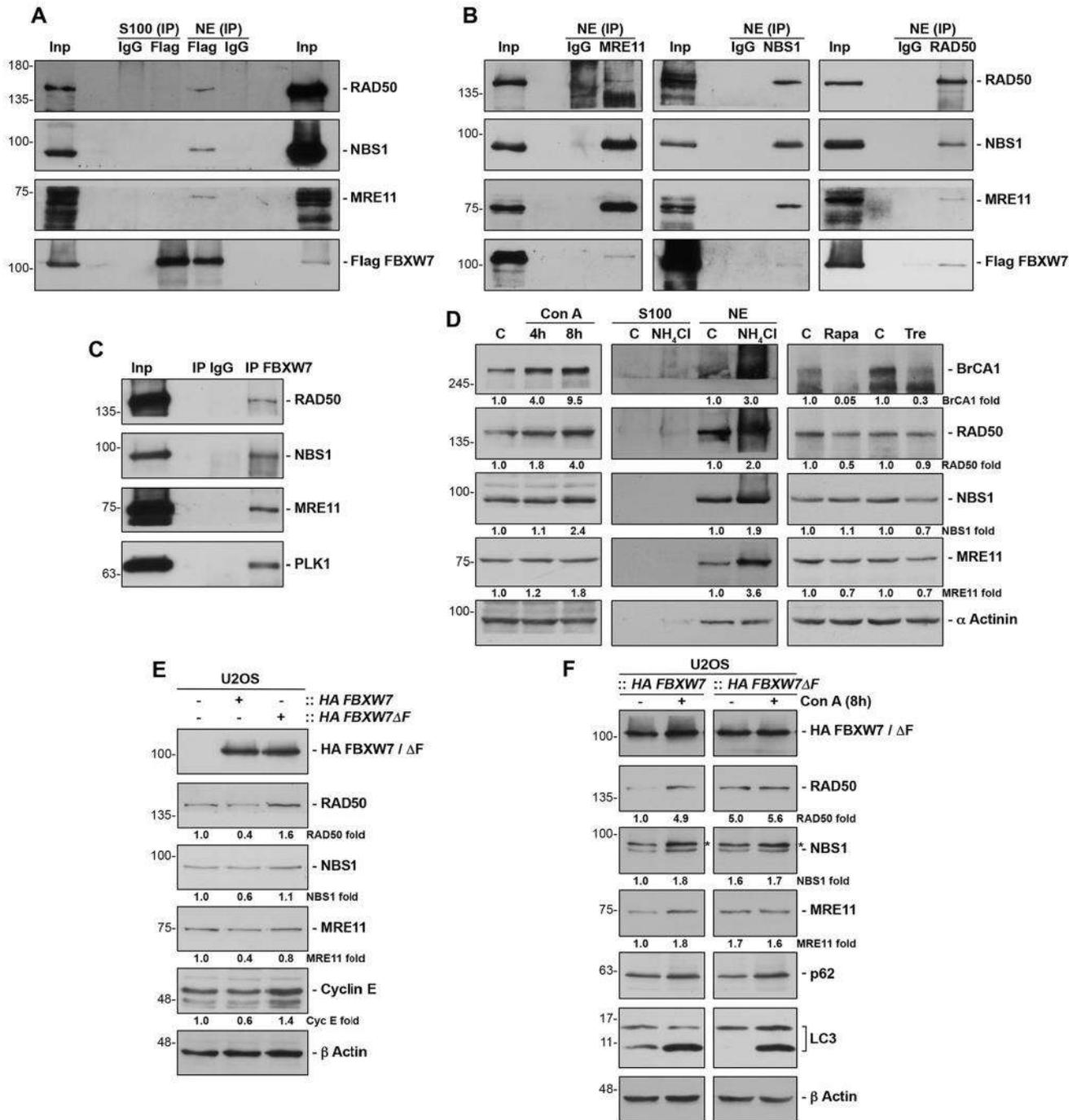
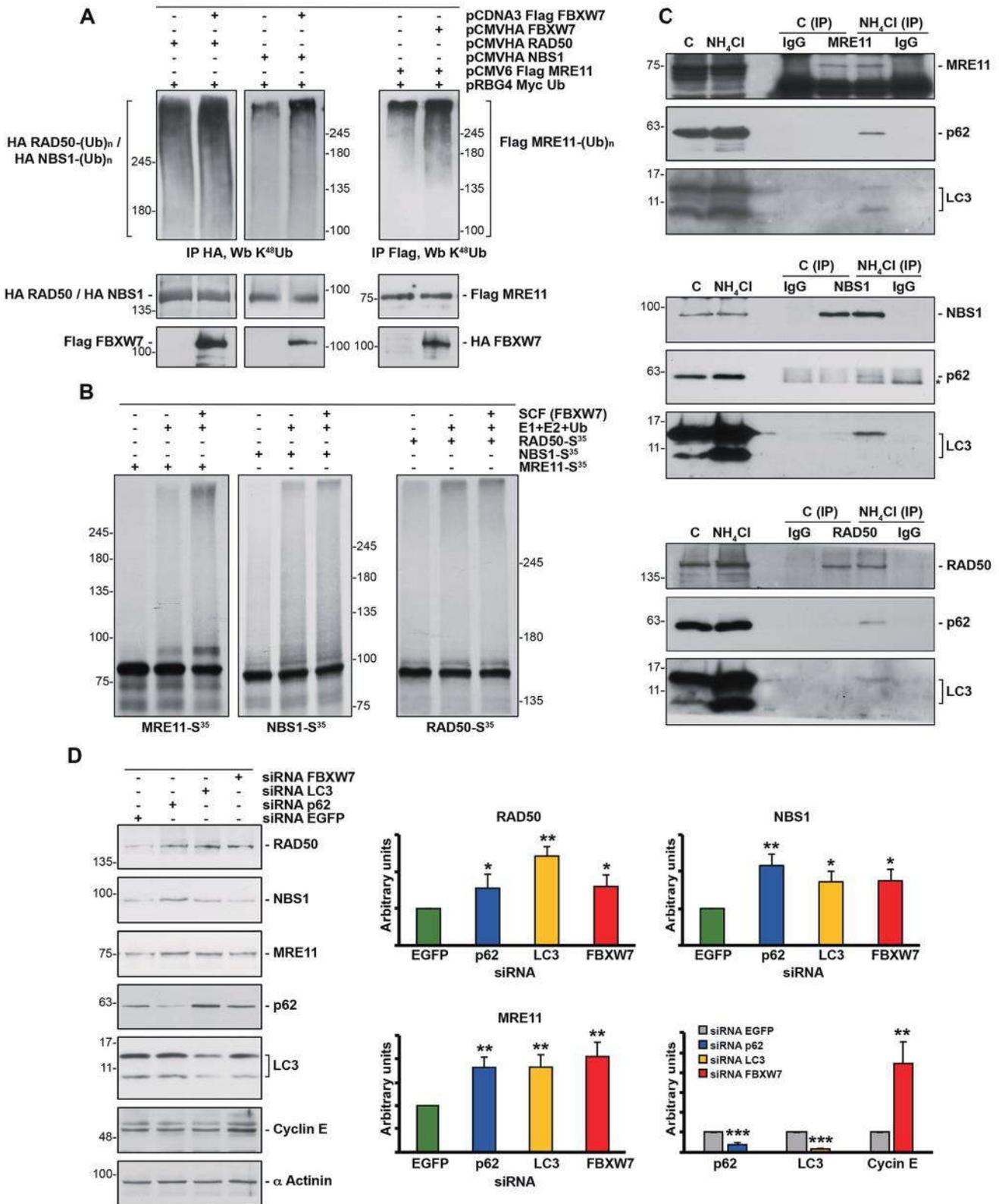


Fig. 1 FBXW7 interacts with the MRN complex and induces its degradation by lysosomes. **A** COS-7 cells were transiently transfected with pCDNA3 Flag FBXW7 and nuclear (NE) and cytosolic extracts (S100) immunoprecipitated with anti-Flag or normal mouse serum (IgG) as a control. Immunoprecipitated materials were analyzed by Western blotting. Inp: the input lane was loaded with 1/20 of the extract used in each assay. Data are representative of two independent experiments. **B** Similar to A, but using anti-MRE11, anti-NBS1, or anti-RAD50 antibodies. Data are representative of two independent experiments. **C** Nuclear extracts of U2OS cells were used to immunoprecipitate endogenous FBXW7, and the obtained complexes were analyzed by immunoblotting. IgG: immunoprecipitation using normal rabbit serum, as a control. Inp: the input lane was loaded with 1/20 of the nuclear extract. Western blot against PLK1 was used as a control of the efficiency of FBXW7 immunoprecipitation. Data are representative of three independent experiments. **D** U2OS cells were treated with Con A (for the indicated times), NH₄Cl (24 h), rapamycin (Rapa, 16 h) or trehalose (Tre, 24 h), whole cell extracts or nuclear and cytosolic extracts (where indicated) prepared, and membranes immunoblotted with the indicated antibodies. C: extracts of untreated cells. Western blots are representative of at least three replicates. **E** Whole cell extracts from U2OS or transduced U2OS::HA FBXW7 or U2OS::HA FBXW7ΔF cells were electroblotted and probed with the indicated antibodies. Western blot against cyclin E was used as a control of the efficiency of FBXW7 or FBXW7ΔF expression. **F** U2OS::HA FBXW7 and U2OS::HA FBXW7ΔF cells were treated or not with Con A (8 h) and analyzed by immunoblotting. *non-specific band from a previous immunoblotting. Data from E and F are representative results from three independent experiments. Quantitative fold change in proteins was determined relative to the loading control (α actinin or β actin).



FBXW7ΔF from lentiviral constructs. We found that FBXW7 increased the MRN-p62/LC3 association. But, most importantly, the dominant negative mutant of FBXW7 almost completely prevented the interaction (Fig. 3C and Supplementary Fig. S3D). These results indicate that SCF (FBXW7) is responsible for the MRN-p62/LC3 association in vivo.

FBXW7 induces the lysosomal localization of the MRN complex

As we have shown above, FBXW7 promotes, on the one hand, the association of the MRN complex with the autophagy machinery in cell nuclei and, on the other, the degradation of the complex by lysosomes. Then, we decided to carry out a more precise study to

Fig. 2 SCF (FBXW7) polyubiquitylates MRN proteins and these associate with p62/LC3. **A** HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids and treated with ammonium chloride 4 h before collection. Extracts were prepared and polyubiquitylated Flag MRE11, HA NBS1, or HA RAD50 visualized after Western blot analysis of the corresponding immunoprecipitations. Brackets mark a ladder of bands corresponding to polyubiquitylated proteins. **B** In vitro ubiquitylation assay of in vitro transcribed and translated MRE11, NBS1 or RAD50 labeled with [³⁵S] was carried out in the presence or absence of the following products: recombinant SCF (FBXW7) complex expressed in Sf21 insect cells, E1 (His₆-E1), E2 (His₆-UbcH3 and UbcH5a), and ubiquitin (Ub). The samples were incubated at 30 °C for 1 h and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Polyubiquitylated proteins appear as a ladder of bands. **C** U2OS cells were treated or not with ammonium chloride for 24 hours prior to harvesting. NP40 extracts were used to immunoprecipitate endogenous MRE11, NBS1, or RAD50. Normal mouse or rabbit sera (IgG) were used as a control. Complexes were analyzed by immunoblotting. C: extracts from U2OS cells; NH₄Cl: extracts from U2OS cells treated with ammonium chloride. *non-specific band. **D** U2OS cells were interfered with the indicated siRNAs, and whole cell extracts were blotted with the designated antibodies. The graphs show the quantification of protein levels using ImageJ software. Error bars represent the SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Student's t-test).

distinguish between the cytosol and the microsomal fraction enriched in lysosomes to determine whether MRN could also be localized in that fraction. We were also interested in knowing the potential role of FBXW7 in that localization. To do that, we first tested various cell lines and found that HeLa cells were the best model to perform this research. Next, we prepared cytosolic, lysosomal, and nuclear fractions and observed that inhibition of lysosomal activity with ammonium chloride allowed us to detect the components of the MRN complex in the lysosome-rich fraction (Fig. 4A and Supplementary Fig. S4A). Furthermore, the presence of FBXW7 from a lentiviral construct increased the lysosomal localization of MRN, while another F-box protein such as βTrCP did not (Fig. 4B, Supplementary Fig. S4B, and Supplementary Table S2). Even more, the dominant negative version of FBXW7 reduced the presence of MRN in lysosomes compared to FBXW7, suggesting that this localization depends on its polyubiquitylation by SCF (FBXW7) (Fig. 4C, Supplementary Fig. S4C, and Supplementary Table S2). Similarly, microscopy studies of normally growing cells showed that blocking lysosomal enzymes made it possible to detect NBS1 in lysosomes visualized with an anti-LAMP1 antibody (Fig. 4D, left panels, and Supplementary Fig. S4D). However, the expression of FBXW7ΔF avoided this localization (Fig. 4D, right panels, and Supplementary Fig. S4D). Taken together, these results suggest that the MRN-p62/LC3 association initially occurs in the nucleus, and then the MRN proteins move to lysosomes to be degraded by the enzymes localized there.

The degradation of the MRN complex by the SCF (FBXW7)/lysosome pathway is increased after DNA damage-induced cell death

Autophagy is induced by starvation and other cellular stressors such as hypoxia, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, or pathogen infection [31]. To understand the physiological conditions that increase MRN degradation by the autophagy/lysosome pathway, we first evaluated the effect of serum deprivation. We cultured HeLa cells for 3 days in medium supplemented with 0.15% FCS and compared the amount of MRN with that found in cells growing in complete medium. We observed that starvation-induced autophagy, detected by increased levels of LC3-II and decreased levels of p62, did not induce degradation of the proteins of the MRN complex (Fig. 5A and Supplementary Table S3). As a control of autophagy induction, we blocked lysosomal enzymes with concanamycin A under the same conditions. Next, given the role of the MRN complex as a sensor of DNA damage, we explored the effect of DNA-damaging agents such as cisplatin or doxorubicin on MRN levels. We performed a dose-response assessment between the concentration of cisplatin and the amount of protein of the MRN complex after 24 hours of treatment. We found that the amount of MRN decreased when the concentration of cisplatin was sufficient to induce apoptosis, as determined by PARP cleavage, caspase 3 activation, and the appearance of cells positive for annexin V (Fig. 5B, C, and Supplementary Table S3). Similar results were obtained when cells were treated with doxorubicin (Supplementary Fig. S5 and

Supplementary Table S4). Moreover, both treatments entailed an increase in autophagy, which was observed with the LC3-II and p62 markers. To confirm that the decrease in the proteins of the complex was due to their degradation by the lysosome, we inhibited lysosomal activity with ammonium chloride during treatment with cisplatin. This compound not only inhibits lysosomal enzymes, but also enhances cisplatin cytotoxicity and caspase activity [32]. Under these conditions, the proteins of the complex did not decrease (Fig. 5D and Supplementary Table S3). Not only that, the reduction of FBXW7 levels in knockdown experiments, confirmed by the increase in cyclin E, also prevented the degradation of the proteins of the MRN complex due to cisplatin (Fig. 5E and Supplementary Table S3). Subsequently, we checked whether the observed degradation of MRN proteins led to an increase in the lysosomal localization of the MRN complex elicited by FBXW7. To do this, we analyzed the localization of the MRN complex in lysosomes using light microscopy in U2OS and U2OS::HA FBXW7ΔF cells treated with cisplatin and concanamycin A to block autophagic flux. Figure 6 shows that treatment with concanamycin A in U2OS cells (Fig. 6A, left panels, and Fig. 6B) allows to detect a partial localization of NBS1 in the lysosomes, which increases substantially when the cells are treated with cisplatin and concanamycin A (note the arrow). However, the expression of FBXW7ΔF (Fig. 6A, right panels, and Fig. 6B) avoids this localization. Finally, to find out whether overexpression of FBXW7ΔF, which reduces MRN degradation (Supplementary Fig. S6), would lead to a decrease in sensitivity to cisplatin, we performed a cell viability assay. We generated a stable doxycycline-inducible U2OS cell line overexpressing HA FBXW7ΔF and compared the number of colonies that appeared after cisplatin treatment when it expressed HA FBXW7ΔF versus when it did not. Figure 6C shows that FBXW7ΔF increases the viability of cisplatin-treated cells. Namely, the increase of SCF (FBXW7) substrates, among which MRN are included, favors cell viability after DNA damage. Overall, we can conclude that SCF (FBXW7) induces polyubiquitylation and degradation of the MRN complex, especially after suffering catastrophic DNA damage, through the autophagy/lysosome pathway. Under these conditions, FBXW7 enhances cisplatin-induced cell death.

DISCUSSION

The F-box proteins are the determinants of the specificity of SCF ubiquitin ligase complexes, and, through their substrates, they participate in multiple cellular processes. Specifically, the F-box protein FBXW7 regulates stability of numerous proteins involved in cell-cycle regulation, proliferation, differentiation, and apoptosis. FBXW7 primarily targets oncoproteins, such as cyclin E, PLK1, AURKA, c-MYC, mTOR, NOTCH, MCL1 or c-JUN, but also tumor suppressors such as p53 [24]. Consistent with that, the FBXW7 gene appears mutated in a wide variety of cancers. In fact, 3.23% of 46 305 human cancers analyzed had mutations in FBXW7, especially endometrial cancer, colorectal cancer, cervical cancer, and esophagogastric adenocarcinoma [33].

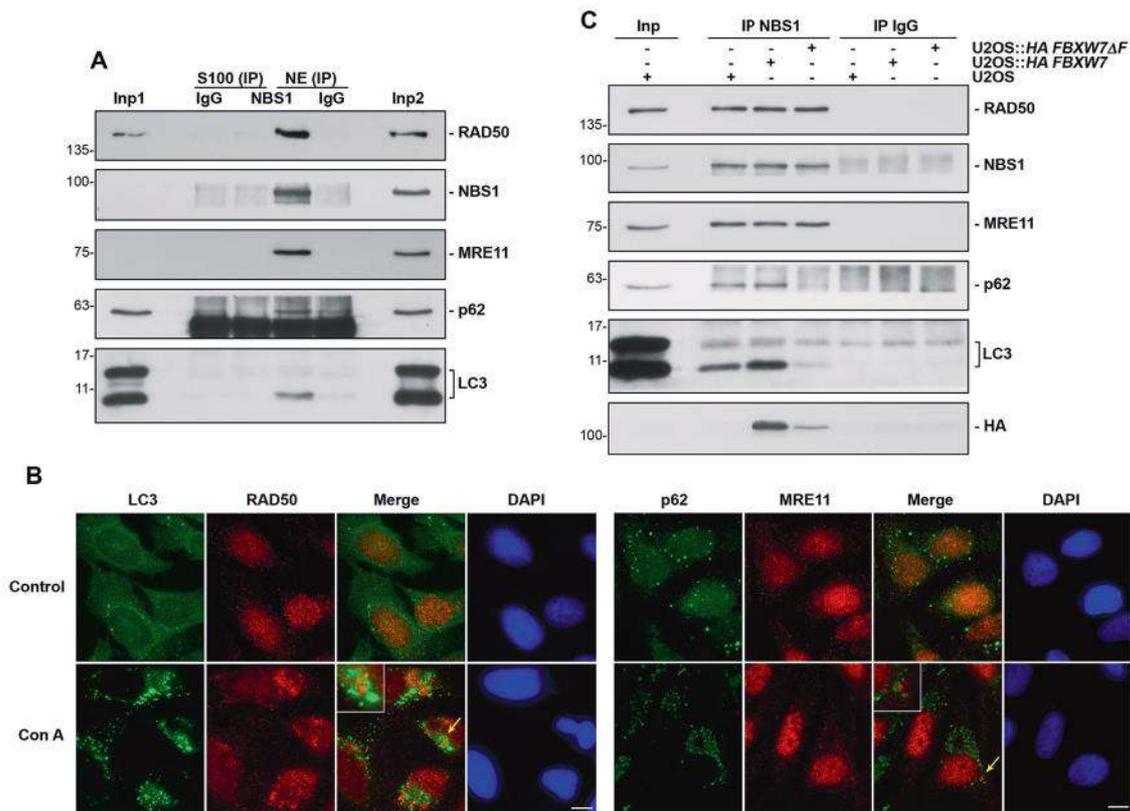


Fig. 3 The interaction of MRN with p62/LC3 occurs in the nuclei of U2OS cells and is promoted by FBXW7. **A** Cytosolic (S100) and nuclear (NE) extracts were prepared from U2OS cells treated with ammonium chloride. Immunoprecipitations with an anti-NBS1 rabbit monoclonal antibody or with normal rabbit serum were performed and complexes immunoblotted with the indicated antibodies. Inp1, 2: the input lanes were loaded with 1/20 of the extract used in each assay (Inp1: S100, Inp2: NE). **B** U2OS cells treated or not with Con A for 8 h were analyzed by light microscopy. Yellow arrows indicate magnified areas (x2). The bars represent 10 μ m. **C** Similar to A, but using only nuclear extracts from the indicated cell lines treated with ammonium chloride.

In this work, we found that endogenous FBXW7 is associated with the MRN complex in normally growing mammalian cells, inducing its degradation through the autophagy/lysosome pathway. Autophagy is a highly selective process that occurs in all eukaryotic cells to recycle defective or useless proteins or organelles. It takes place both under physiological conditions and after being induced by various cellular stresses [34]. Nucleophagy is a subtype of selective autophagy that targets nuclear components. It is involved in maintaining cell homeostasis, at least in some organisms, and when it is disturbed, various pathologies can occur, including cancer [35]. FBXW7 induces the polyubiquitylation of MRN, which allows its association with p62/LC3 and, therefore, its degradation by lysosomes. In fact, FBXW7 Δ F, which prevented the ubiquitylation of the MRN complex, largely reduced the interaction of MRN with p62/LC3. To support these results, both MRN and p62/LC3 have a perinuclear location when cells are treated with lysosomal inhibitors, similar to that found when other nuclear components are degraded by lysosomes [36]. Moreover, rapamycin treatment of U2OS cells also reduced the MRN protein complex, as described for the degradation of other autophagic substrates [37]. Taken together, our data reveal that FBXW7 is involved in the regulation of basal levels of the MRN complex. Furthermore, to our knowledge, this would be the first or one of the first physiological types of mammalian nucleophagy described to date [38].

Several reports have implicated FBXW7 in the response to DNA damage, due to ubiquitylation of several key regulatory proteins such as p53, PLK1 or SOX9 [23, 25, 39], and in DNA damage repair. Regarding this last process, FBXW7 promotes K48-linked polyubiquitylation and degradation of BLM, an ATP-dependent RecQ DNA

helicase involved in the regulation of HR and NHEJ DSB repair pathways [40]. Moreover, FBXW7 also polyubiquitylates XRCC4, in this case through the K63 linkage, to enhance DNA binding of KU70/KU80 and facilitate NHEJ repair [41]. Now, we provide evidence showing that DNA damage-induced cell death increases the degradation of MRN by the FBXW7/lysosome. We found that in vivo treatment of cells with chemotherapeutic agents such as cisplatin or doxorubicin did not alter the stability of the MRN complex, unless the drug concentrations used induced cell death. These results suggest that, while the damage caused by these agents can be repaired, the MRN complex remains intact to perform its function as a sensor for DNA breaks. In contrast, when damage exceeds the ability of cells to repair DNA, DNA break sensors should be degraded to promote, or at least not interfere, cell death. In fact, the expression of a dominant negative mutant of FBXW7 reduced cell death after cisplatin treatment, although we cannot guarantee that it is solely due to the greater stability of MRN. In a similar way, some studies have associated cell death with the loss of nuclear KU70 and KU80, or with the cytosolic accumulation of these proteins [42]. It was reported that oxidative stress-induced apoptosis in pancreatic acinar cells caused caspase-dependent degradation of KU proteins and decreased KU binding to nuclear transporters, which subsequently resulted in a reduction in nuclear KU70/KU80 [43]. Conversely, in the early stages of cancer, in which uncontrolled cell proliferation occurs, KU levels and their ability to bind to DNA increase. Repair of high DNA damage would prevent further genomic instability [44]. Other authors correlated the reduction in KU proteins after transient focal cerebral ischemia in mice with apoptotic DNA fragmentation, suggesting that loss of KU and consequent failure of the DNA repair mechanism could

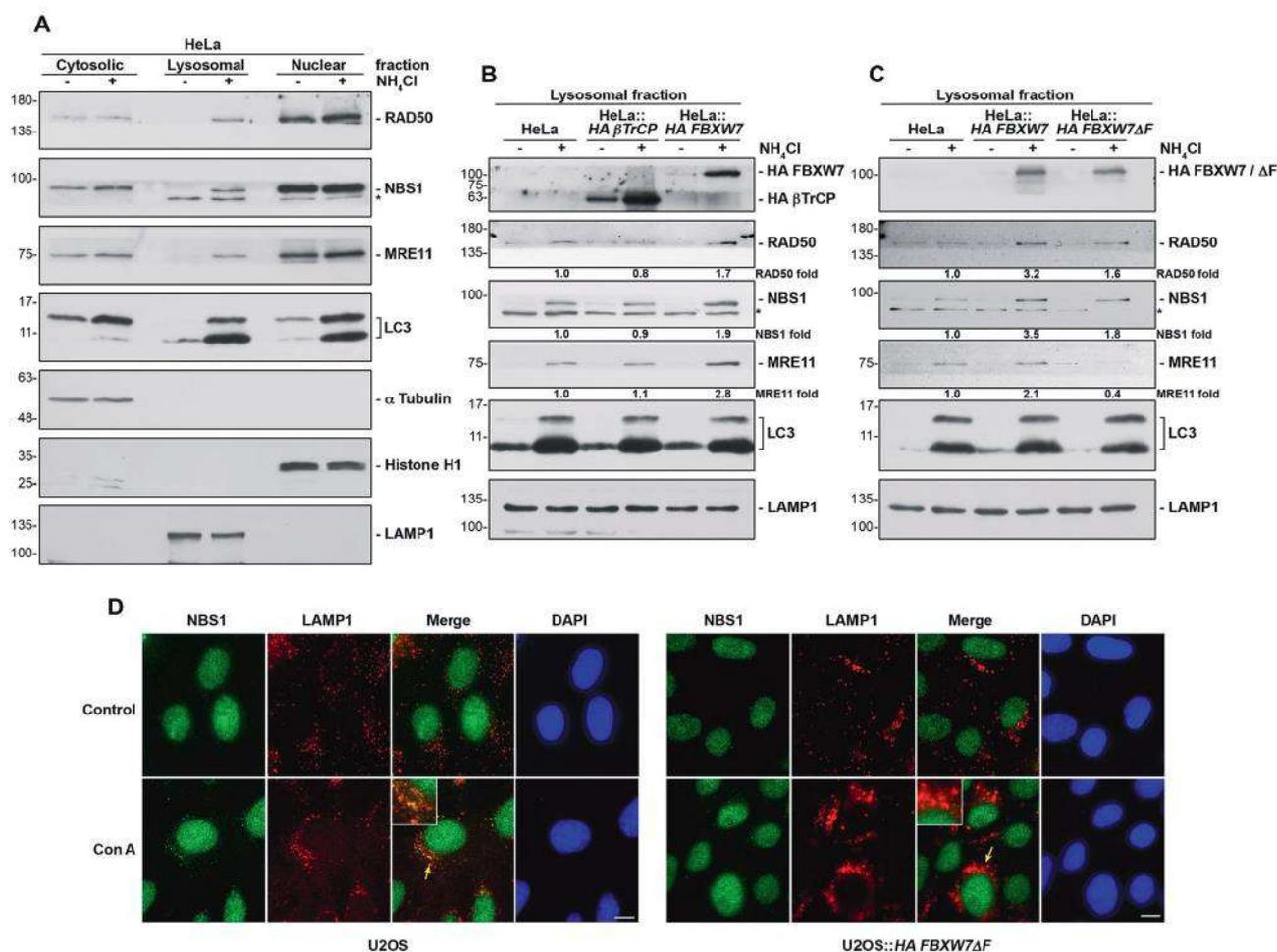


Fig. 4 The MRN complex is localized in lysosomes in a FBXW7-dependent manner. **A** Subcellular fractions were prepared from HeLa cells treated or not with ammonium chloride for 24 h, as described in Materials and Methods. The amount of proteins used from the cytosolic, lysosomal, and nuclear fractions represented 5%, 30%, and 2.5% of the total proteins of each fraction, respectively. The extracts were immunoblotted with the indicated antibodies. The purity of the fractions was tested with anti- α Tubulin (cytosolic fraction), anti-Histone H1 (nuclear fraction), and anti-LAMP1 (lysosome-rich fraction). **B** The lysosomal fractions of HeLa, HeLa::HA β TrCP, and HeLa::HA FBXW7 treated or not with ammonium chloride for 24 h were prepared as in A. Equal amounts of protein were analyzed by SDS-PAGE and immunoblot. **C**. Similar to B using the indicated cell lines. *non-specific band. Quantitative fold change in proteins was determined relative to the LC3 protein. Data from **A**, **B**, and **C** are representative results from 1-3 independent experiments. **D** U2OS and U2OS::HA FBXW7 Δ F cells treated or not with Con A for 8 h were analyzed by light microscopy. Yellow arrows indicate magnified areas (x2). The bars represent 10 μ m.

contribute to DNA fragmentation [45]. Gama et al, however, showed that apoptosis induced by different drugs increased ubiquitylation and degradation of KU70 through the proteasome [46]. On the basis of these findings, it is conceivable that MRN degradation via the autophagy/lysosomal pathway may contribute to DNA damage-induced cell death.

Overexpression of the MRN complex has been reported to be associated with the appearance of cisplatin-resistant tumor cells, leading to a poor prognosis [47]. Therefore, the importance of finding compounds that prevent the repair of damage caused by cisplatin is highlighted to avoid the appearance of resistant cells and induce the death of tumor cells. In fact, for years there have been attempts to find an inhibitor or combination of inhibitors that allows the elimination of these tumor cells with some encouraging results [48, 49]. Based on our results showing that induction of apoptosis after DNA damage increases MRN degradation, we could suggest that if we were able to increase the specific degradation of MRN by FBXW7/lysosome after cisplatin treatment, tumor cells could be eliminated, preventing the appearance of resistance to genotoxic drugs. A small molecule could be designed to enhance MRN degradation, similar to those

described previously [50]. Furthermore, since it is a physiological degradation, perhaps a lower dose of cisplatin could degrade MRN in the presence of that compound, thus preventing drug toxicity in the patient. However, further studies are required to probe this idea.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, cloning, and sequencing

pCDNA3 Flag FBXW7, pCMVHA FBXW7, and pCMVHA FBXW7 Δ F have been previously described [25, 51]. pCMV6 Flag MRE11 and pRG4 Myc Ub were from Origene (Rockville, MD, USA) and ATCC (Manassas, VA, USA), respectively. pCMVHA RAD50, pCMVHA NBS1, pLenti 6.3 HA FBXW7, pLenti 6.3 HA FBXW7 Δ F, pLenti 6.3 HA β TrCP and pCDNA5 FRT/TO-HA FBXW7 Δ F were obtained by cloning the corresponding PCR fragments in pCMVHA [52] or pLenti 6.3 or pCDNA5 FRT/TO from Addgene (Watertown, MA, USA). The sequences of the constructs were verified on both strands with an automatic sequencer.

Viral transductions

Recombinant lentivirus expressing HA FBXW7, HA FBXW7 Δ F or HA β TrCP were produced in the HEK293T cell line. Cells were transfected using Xfect

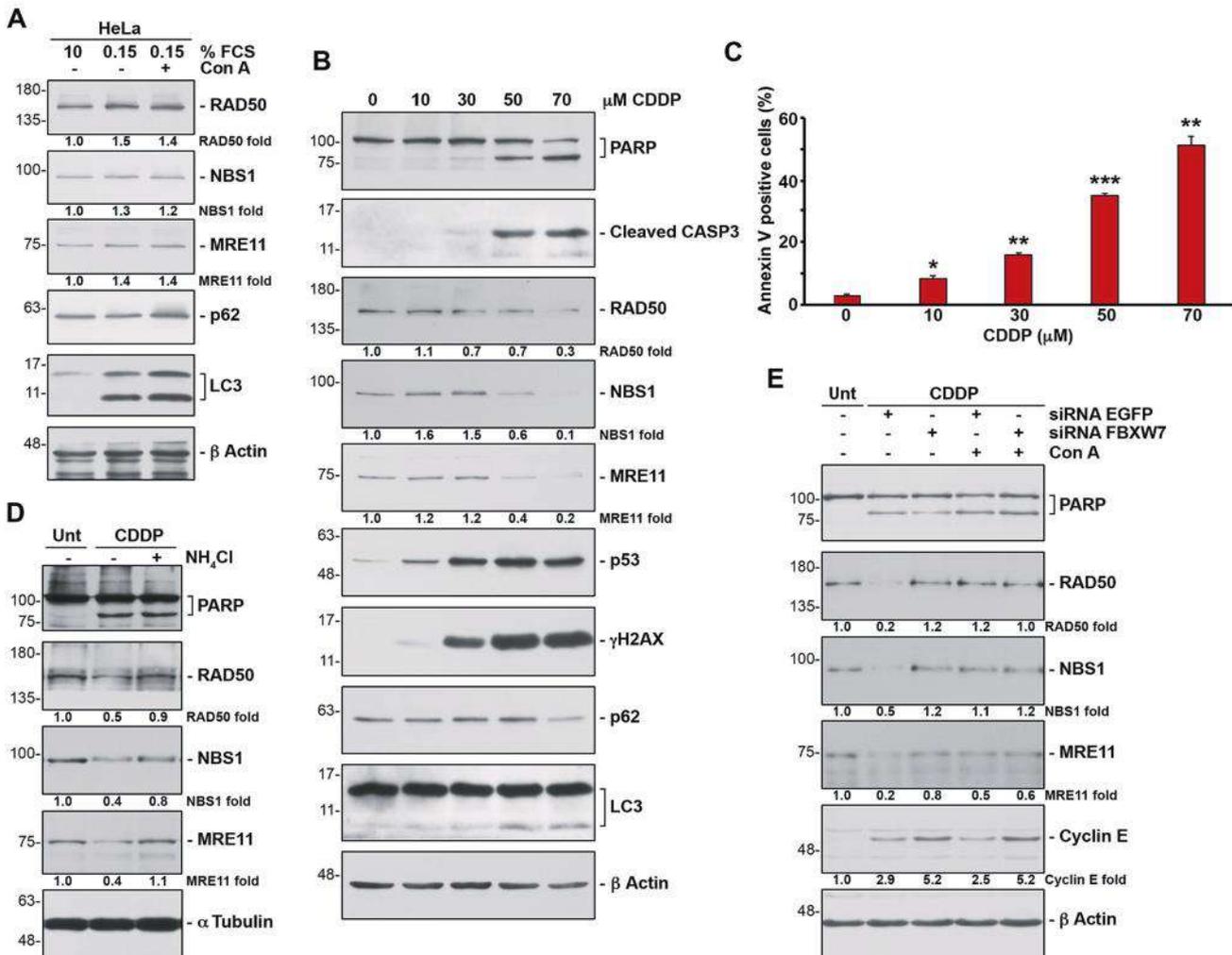


Fig. 5 Cisplatin-induced cell death increases the degradation of the MRN complex through FBXW7/lysosome. **A** HeLa cells were grown in serum containing complete medium (10% FCS) or in serum starved medium (0.15% FCS) treated or not with Con A 8 h before harvesting. Whole cell extracts were electroblotted and probed with different antibodies. **B** U2OS cells were incubated with different concentrations of cisplatin (CDDP) for 24 h. Whole cell extracts were analyzed by immunoblotting. **C** Percentage of annexin V positive U2OS cells treated as in B detected by flow cytometry. Error bars represent the SD ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's t -test). **D** U2OS cells were treated or not with CDDP (50 μM) or with CDDP and ammonium chloride for 24 h and whole cell extracts analyzed by Western blotting. Unt: untreated cells. **E** U2OS cells transfected with siRNA FBXW7 (or siRNA EGFP as a control) were treated with CDDP (50 μM) for 24 h. Whole cell extracts were electroblotted and probed with the indicated antibodies. All of data are representative of at least two independent experiments. Quantitative fold change in proteins was determined relative to the loading control (α tubulin or β actin).

reagent (Clontech, Mountain View, CA, USA) with the following plasmids: one derivative of pLenti6.3 as described above and pMD2-G, pMDLg-pRRE and pRSV-Rev (Addgene). After 48 h of transfection, the cell supernatant was harvested and passed through a 0.45 μm Puradisc 25 mm filter (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Subsequently, the viruses were concentrated using a Lenti-X concentrator (Clontech). Cells were transduced with supernatant containing lentivirus for 24 h, and transduced cells were selected after seven days in 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ blasticidin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cell culture, transient and stable transfections, drugs, and cell lysis

Routinely, COS-7, U2OS, A549, HeLa, and HEK293T cells (from ATCC) and derivatives were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) from BioWest, Nuaille, France as described [53]. The COS-7, U2OS, HeLa and HEK293T cell lines were recently authenticated by STR profiling. DLD1 and DLD1 *FBXW7*^{-/-} cells [54] were grown in McCoy's 5A medium (BioWest) supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 100 U/ml penicillin from Gibco. A U2OS cell line with inducible expression of HA *FBXW7* ΔF was also constructed as

previously described [55] using pCDNA5 FRT/TO-HA *FBXW7* ΔF , pOG44 (Addgene) and the U2OS Flp In T-REX host cell line [56]. 72 h after transfection, cells were selected in DMEM with 10% tetracycline-free foetal bovine serum (Gibco) supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of hygromycin (Gibco). The expression of the resulting foci was tested. Gene expression was induced by the addition of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline (DOX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 24 h. Serum starvation was obtained by growing HeLa cells for 3 days in medium supplemented with 0.15% FCS. The DNA constructs were transiently transfected by electroporation or by using a lipid transfection reagent (Xfect, Clontech). Cells were harvested and lysed 18 h or 48 h after transfection, respectively. Where appropriate, transfected cells were retransfected with other plasmids. In the indicated experiments, cells were treated with cisplatin (CDDP, Sigma-Aldrich), doxorubicin (Dx, Sigma-Aldrich), MG132 (20 μM , Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ammonium chloride (40 mM, Sigma-Aldrich), concanamycin A (Con A, 50 nM, Sigma-Aldrich), rapamycin (10 μM , Sigma-Aldrich) and trehalose (100 mM, Sigma-Aldrich), and harvested at various times.

Whole cell extracts were prepared at 4 $^{\circ}\text{C}$ in 420 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 (NP40), 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl

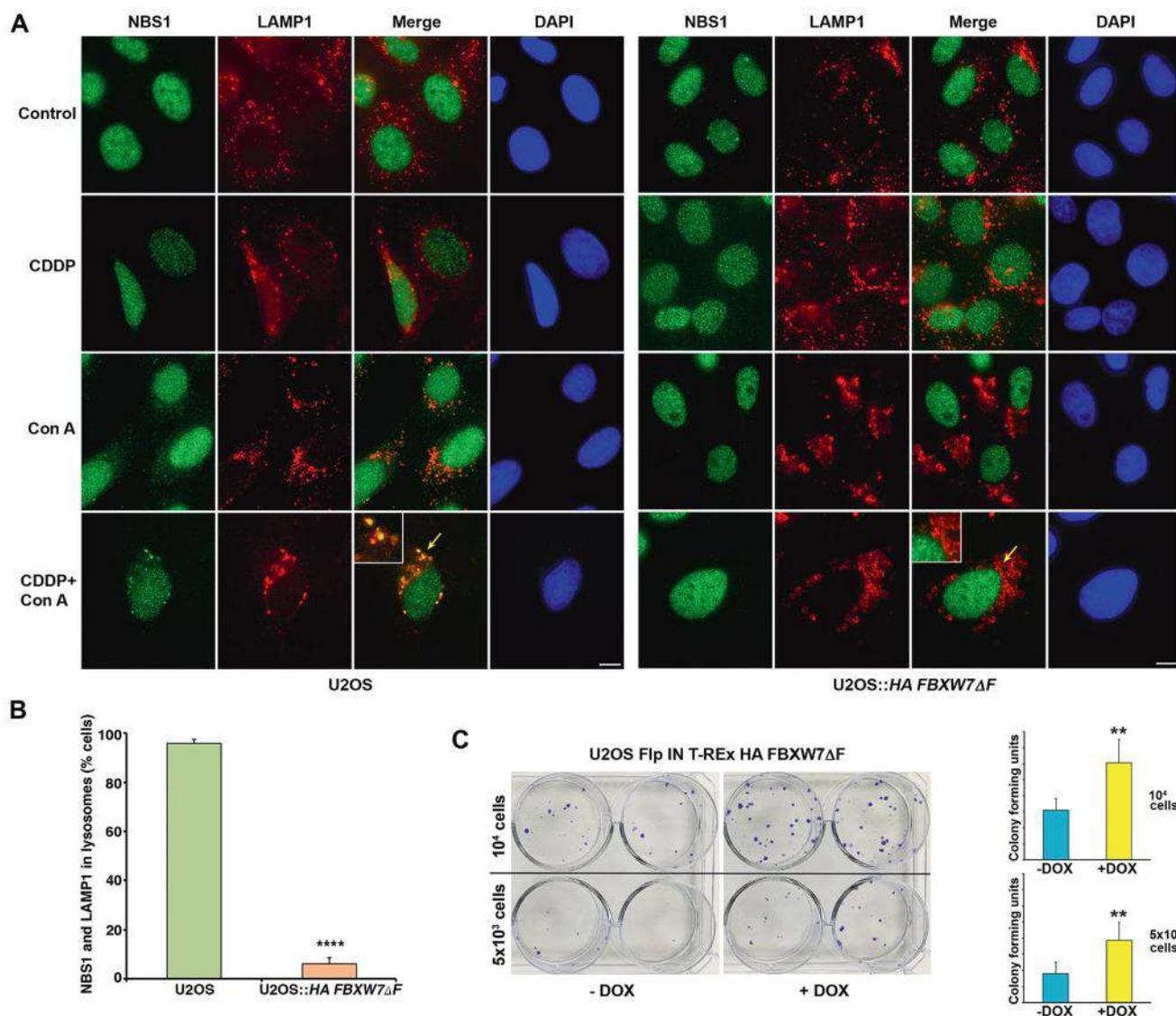


Fig. 6 Cisplatin-induced increase of MRN in lysosomes is prevented by FBXW7ΔF. **A** U2OS and U2OS::HA FBXW7ΔF cells treated or not with cisplatin (CDDP) for 24 h and/or Con A for 8 h were analyzed by light microscopy. Yellow arrows indicate magnified areas (x2). The bars represent 10 μm. **B** Percentage of U2OS versus U2OS::HA FBXW7ΔF cells displaying NBS1 in lysosomes (visualized with anti-LAMP1) after cisplatin (CDDP) and Con A treatment. A minimum of 50 cells were analyzed in triplicate for each condition. Student's *t*-test was used to determine statistical significance. *****p* < 0.0001. **C** Colony assays showing cell viability for U2OS Flp In T-Rex HA FBXW7ΔF cells induced or not with doxycycline (DOX) and treated with CDDP (30 μM) for 4 h. Colony forming units from initial 5 × 10³ and 10⁴ cells of each condition were quantified using ImageJ software, and represented in graphs. Error bars represent the SD (*n* = 3). ***p* < 0.01 (Student's *t*-test).

fluoride (PMSF), 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml leupeptin and 10 μg/ml chymostatin for 20 min, and sonicated. The extracts were centrifuged at 20,000 *g* for 20 min and the supernatants were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Electrophoresis, Western blot analysis, and antibodies

Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gels were electroblotted onto nitrocellulose membranes and probed with the following antibodies: anti-HA-peroxidase monoclonal antibody (#12013819001, Roche, Basel, Switzerland); anti-cyclin E (sc-377100), anti-MRE11 (sc-135992), anti-BrCA1 (sc-6954), anti-histone H1 (sc-393358), anti-α actinin (sc-17829) and anti-p53 (sc-126) monoclonal antibodies, and anti-MCL1 (sc-819) polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology); anti-α tubulin (T9026), anti-β actin (A5441) and anti-Flag (F3165) monoclonal antibodies, and anti-p62 (SAB5701338) polyclonal antibody (Sigma-Aldrich); anti-PARP (#551024) and anti-cyclin B (#610220) monoclonal antibodies (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA); anti-PLK1 (#05-844) and anti-γH2AX (#05-636) monoclonal

antibodies (EMD Millipore, Merck, Darmstadt, Germany); anti-cleaved caspase-3 (#9664), anti-NBS1 (#14956) and anti-K48 (#8081) polyubiquitin monoclonal antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-RAD50 monoclonal antibody (GTX70228, GeneTex, Irvine, CA, USA); and anti-LC3 (NB100-2220) and anti-LAMP1 (NB120-19294) polyclonal antibodies (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Peroxidase-coupled donkey anti-rabbit IgG (NA934V) and sheep anti-mouse IgG (NA931) were obtained from GE Healthcare. Immunoreactive bands were visualized using the Enhanced Chemiluminescence Western blotting system (ECL, GE Healthcare).

Protein level quantification was carried out using ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/>). Original Western blots for all relevant figures are shown in "Supplementary Data/Original blots".

Co-immunoprecipitation experiments

1–2 mg of protein from cytosolic and nuclear fractions or NP40 extracts (420 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatin and 1 μg/ml leupeptin,

centrifuged and then diluted to 150 mM NaCl) were incubated with normal mouse (sc-2025) or rabbit (sc-2027) sera (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min and subsequently with protein G or A-sepharose beads (GE Healthcare), respectively, for 1 h at 4 °C. After centrifugation, the beads were discarded and the supernatants incubated for 2 h with anti-FBXW7 (A301-720A, Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA), anti-Flag (F3165, Sigma-Aldrich), anti-MRE11 (#4847, Cell Signaling Technology), anti-NBS1 (#14956, Cell Signaling Technology), anti-RAD50 (NB110-60483, Novus Biologicals) or with normal mouse or rabbit sera, followed by protein G or A-sepharose beads for 1 h. The beads were washed, and the bound proteins were solubilized by adding SDS sample buffer and heated at 95 °C for 5 min.

Subcellular fractionation

Cytosolic extracts (S100) and nuclear extracts (NE) were prepared as described [57].

The lysosome-enriched cellular fraction was obtained as previously described [58]. Briefly, cells were resuspended in hypotonic buffer (40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.5) for 30 min on ice. Later, they were homogenized by shearing through a 28.5-gauge needle 30 times. After centrifugation at 1000 g for 10 min, the supernatant was centrifuged again at 12,000 g for 10 min. This second supernatant was the cytosolic fraction, while the pellet, enriched for the lysosome, was further washed in an isotonic buffer (150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 7.5) and dissolved in a lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) for further analysis.

Knockdown experiments

Cells were transfected with FBXW7 α -, LC3- or p62-siRNA [58, 59] using the Oligofectamine method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to suppress the expression of endogenous genes. EGFP-siRNA [58] was used as a non-specific control. Cells were harvested 48 h after transfection and the reduction in protein levels was confirmed by Western blotting.

In vitro and in vivo ubiquitylation assays

In vitro ubiquitylation was performed in a volume of 10 μ l containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 0.6 mM DTT, 2 mM ATP, 0.5 μ g recombinant SCF (FBXW7) complex expressed in Sf21 insect cells, 1.5 ng/ μ l E1 (His₆-ubiquitin-activating enzyme, Boston Biochem, Cambridge, MA, USA), 10 ng/ μ l His₆-Ubch3 (E2, Boston Biochem), 10 ng/ μ l Ubch5a (E2, Boston Biochem), 2.5 μ g/ μ l ubiquitin (Sigma-Aldrich), 1 μ M ubiquitin aldehyde (Boston Biochem), and 1 μ l [³⁵S]-methionine-labelled in vitro transcribed/translated MRE11, NBS1 or RAD50, as substrate. The reactions were incubated at 30 °C for 1 h and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

In vivo ubiquitylation experiments were performed in HEK293T cells transfected with the indicated plasmids and treated with ammonium chloride 4 h before harvesting. Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), lysed at 95 °C for 15 min in NP40 buffer supplemented with 5% SDS and 10 mM iodoacetamide, and then diluted four times in NP40 buffer supplemented with 10 mM iodoacetamide. Epitope-tagged MRE11, NBS1, or RAD50 were immunoprecipitated and proteins separated by SDS-PAGE, electroblotted, and probed with different antibodies.

AnnexinV binding assays

U2OS cells were treated with CDDP or Dx for 24 h. One million cells were washed in cold PBS and resuspended in 100 μ l of annexin V binding buffer containing 5 μ l propidium iodide and 5 μ l of annexin V-FITC (Annexin V-FITC apoptosis detection kit I, BD Biosciences), incubated for 15 min at room temperature in the dark and diluted in 400 μ l of annexin V binding buffer. Fluorescence was measured on a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) within 1 h. Cell populations (viable, early apoptotic, and late apoptotic) were identified by measuring fluorescence on FITC-A and PerCP-Cy5-5-A channels. Annexin V binding assays were repeated three times in independent experiments. Data were analyzed using Diva software.

Immunofluorescence microscopy

Cells were grown on coverslips, fixed in -20 °C 100% methanol for 10 min on ice, and permeabilized with 0.25% Triton X-100 for 10 min at room temperature (RT). Cells were incubated with blocking buffer (1% BSA, 0.1%

Tween 20 in PBS) for 1 h at RT. Coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h at RT, washed three times with 1% PBS and once with blocking buffer, and incubated with the appropriate fluorescent secondary antibody for 1 h at RT. The coverslips were then washed three times with 1% PBS and mounted on microscopy slides using mounting reagent with DAPI (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany). Staining was analyzed using a Leica DMi8 inverted microscope with a 63x oil-immersion objective using the same laser parameters. All microscope images were analyzed with ImageJ software. Primary antibodies used: anti-RAD50 mouse monoclonal antibody (GTX70228, GeneTex), anti-NBS1 rabbit monoclonal antibody (#14956, Cell Signaling Technology), anti-MRE11 mouse monoclonal antibody (sc-135992, Santa Cruz Biotechnology), anti-p62 rabbit polyclonal antibody (NBP1-49955, Novus Biologicals), anti-LC3 rabbit polyclonal antibody (NP100-2220, Novus Biologicals) and anti-LAMP1 mouse monoclonal antibody (sc-20011, Santa Cruz Biotechnology).

Cell viability assays

Briefly, U2OS Flp In T-Rex HA FBXW7 Δ F cells were induced or not by adding 2 μ g/ml DOX for 24 h, and then treated with CDDP (30 μ M) for 4 h and washed. After 24 h, 5 \times 10³ and 10⁴ cells of each condition were seeded in 6-well plates and incubated for 8–12 days. Subsequently, colonies were stained with 0.5% crystal violet solution in methanol for 20 min, washed, and air-dried. Stained colonies were counted using ImageJ software. All assays were carried out in triplicate.

Quantification and statistical analysis

Statistical details of the experiments (number of replicates and use of standard deviation) are included in the Figure Legends. Statistical analyses were performed with unpaired Student's *t*-tests. Significance is indicated in the figures as **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 and *****p* < 0.0001.

DATA AVAILABILITY

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

REFERENCES

- Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;21:37–50.
- Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *J Cancer Sci Ther*. 2019;11:97–103.
- Chvátlová K, Brabec V, Kašpárková J. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:1812–21.
- Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*. 2010;2010:1–16.
- Wang L, Zhao X, Fu J, Xu W, Yuan J. The role of tumour metabolism in cisplatin resistance. *Front Mol Biosci*. 2021;8:691795.
- Chemikova SB, Game JC, Brown JM. Inhibiting homologous recombination for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2012;13:61–68.
- Ackerson SM, Romney C, Schuck PL, Stewart JA. To join or not to join: decision points along the pathway to double-strand break repair vs. chromosome end protection. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:708763.
- Bian L, Meng Y, Zhang M, Li D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: Implications for cancer treatment. *Mol Cancer*. 2019;18:1–14.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 2005;123:1213–26.
- Wang Q, Goldstein M, Alexander P, Wakeman TP, Sun T, Feng J, et al. Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J*. 2014;33:862–77.
- Lu R, Zhang H, Jiang Y, Wang Z, Sun L, Zhou Z. Post-translational modification of mre11: Its implication in DDR and diseases. *Genes (Basel)*. 2021; 12. <https://doi.org/10.3390/genes12081158>.
- Bai Y, Wang W, Li S, Zhan J, Li H, Zhao M, et al. C1QBP promotes homologous recombination by stabilizing MRE11 and controlling the assembly and activation of MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Mol Cell*. 2019;75:1299–1314.e6.
- Ye Z, Xu S, Shi Y, Bacolla A, Syed A, Moiani D, et al. GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11. *Sci Adv*. 2021; 7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe9254>.
- Kilgas S, Singh AN, Paillas S, Then CK, Torrecilla I, Nicholson J, et al. p97/VCP inhibition causes excessive MRE11-dependent DNA end resection promoting cell

- killing after ionizing radiation. *Cell Rep.* 2021; 35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109153>.
15. Jachimowicz RD, Beleggia F, Isensee J, Velpula BB, Goergens J, Bustos MA, et al. UBQLN4 represses homologous recombination and is overexpressed in aggressive tumors. *Cell.* 2019;176:505–519.e22.
 16. He YJ, Meghani K, Caron MC, Yang C, Ronato DA, Bian J, et al. DYNLL1 binds to MRE11 to limit DNA end resection in BRCA1-deficient cells. *Nature.* 2018;563:522–6.
 17. Abuzeid WM, Jiang X, Shi G, Wang H, Paulson D, Araki K, et al. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Invest.* 2009;119:1974–85.
 18. Araki K, Yamashita T, Reddy N, Wang H, Abuzeid, Khan K, et al. Molecular disruption of NBS1 with targeted gene delivery enhances chemosensitisation in head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2010;103:1822–30.
 19. Challa K, Schmid CD, Kitagawa S, Cheblal A, Iesmantavicius V, Seeber A, et al. Damage-induced chromatin dynamics link Ubiquitin ligase and proteasome recruitment to histone loss and efficient DNA repair. *Mol Cell.* 2021;81:811–829.e6.
 20. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:128.
 21. Coleman KG, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras: harnessing the ubiquitin-proteasome system to induce degradation of specific target. *Proteins Annu Rev Cancer Biol.* 2018;2:41–58.
 22. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021;1:634–50.
 23. Galindo-Moreno M, Giraldez S, Limón-Mortés MC, Belmonte-Fernández A, Reed SI, Sáez C, et al. SCF(FBXW7)-mediated degradation of p53 promotes cell recovery after UV-induced DNA damage. *FASEB J.* 2019; 33. <https://doi.org/10.1096/fj.201900885R>.
 24. Galindo-Moreno M, Giraldez S, Limón-Mortés MC, Belmonte-Fernández A, Sáez C, Japón MÁ, et al. p53 and FBXW7: sometimes two guardians are worse than one. *Cancers (Basel).* 2020;12:985.
 25. Giraldez S, Herrero-Ruiz J, Mora-Santos M, Japón MA, Tortolero M, Romero F. SCFFBXW7 α modulates the intra-S-phase DNA-damage checkpoint by regulating Polo like kinase-1 stability. *Oncotarget.* 2014;5:4370–83.
 26. Blagosklonny MV, An WG, Melillo G, Nguyen P, Trepel JB, Neckers LM. Regulation of BRCA1 by protein degradation. *Oncogene.* 1999;18:6460–8.
 27. Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JA, Harper JW, Eisenman RN, et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:9085–90.
 28. Koepf DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science.* 2001;294:173–7.
 29. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy: ATG8 family proteins, LIR Motifs and cargo receptors. *J Mol Biol.* 2020;432:80–103.
 30. Stracker TH, Carson CT, Weizman MD. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-Nbs1 DNA repair complex. *Nature.* 2002;418:348–52.
 31. Morrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2013;8:105–37.
 32. Xu Y, Wang N, Ding Y, Wang C, Yu Y, Liu S, et al. Ammonium chloride enhances cisplatin cytotoxicity through DNA double-strand breaks in human cervical cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;30:1195–1200.
 33. Lan H, Sun Y. Tumor suppressor FBXW7 and its regulation of DNA damage response and repair. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:3012.
 34. Konstantinidis G, Tavernarakis N. Autophagy of the nucleus in health and disease. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:3685.
 35. Zhao L, Li W, Luo X, Sheng S. The multifaceted roles of nucleophagy in cancer development and therapy. *Cell Biol Int.* 2021;45:246–57.
 36. Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, et al. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy.* 2009;5:795–804.
 37. Cenni V, Capanni C, Columbaro M, Ortolani M, D'Apice MR, Novelli G, et al. Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria. *Eur J Histochem.* 2011;55:200–5.
 38. Papandreou ME, Tavernarakis N. Nucleophagy: from homeostasis to disease. *Cell Death Differ.* 2019;26:630–9.
 39. Hong X, Liu W, Song R, Shah JJ, Feng X, Tsang CK, et al. SOX9 is targeted for proteasomal degradation by the E3 ligase FBW7 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:8855–69.
 40. Kharat SS, Tripathi V, Damodaran AP, Priyadarshini R, Chandra S, Tikoo S, et al. Mitotic phosphorylation of Bloom helicase at Thr182 is required for its proteasomal degradation and maintenance of chromosomal stability. *Oncogene.* 2016;35:1025–38.
 41. Zhang Q, Kamak D, Tan M, Lawrence TS, Morgan MA, Sun Y. FBXW7 facilitates nonhomologous end-joining via K63-linked polyubiquitylation of XRCC4. *Mol Cell.* 2016;61:419–33.
 42. Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* 2004;23:2797–808.
 43. Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem.* 2003;278:36676–87.
 44. Pucci S, Mazzarelli P, Rabitti C, Gai M, Gallucci M, Flammia G, et al. Tumor-specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies. *Oncogene.* 2001;20:739–47.
 45. Kim GW, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Early decrease in DNA repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 2001;32:1401–7.
 46. Gama V, Yoshida T, Gomez JA, Basile DP, Mayo LD, Haas AL, et al. Involvement of the ubiquitin pathway in decreasing Ku70 levels in response to drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2006;312:488–99.
 47. Altan B, Yokobori T, Ide M, Bai T, Yanoma T, Kimura A, et al. High expression of mre11-rad50-nbs1 is associated with poor prognosis and chemoresistance in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2016;36:5237–47.
 48. Shkundina IS, Gall AA, Dick A, Cocklin S, Mazin AV. New rad51 inhibitors to target homologous recombination in human cells. *Genes (Basel).* 2021; 12. <https://doi.org/10.3390/genes12060920>.
 49. Roberti M, Schipani F, Bagnolini G, Milano D, Giacomini E, Falchi F, et al. Rad51/BRCA2 disruptors inhibit homologous recombination and synergize with olaparib in pancreatic cancer cells. *Eur J Med Chem.* 2019;165:80–92.
 50. Zhou X, Dong R, Zhang JY, Zheng X, Sun LP. PROTAC: A promising technology for cancer treatment. *Eur J Med Chem.* 2020;203:112539.
 51. Liu N, Li H, Li S, Shen M, Xiao N, Chen Y, et al. The Fbw7/human CDC4 tumor suppressor targets proliferative factor KLF5 for ubiquitination and degradation through multiple phosphodegron motifs. *J Biol Chem.* 2010;285:18858–67.
 52. Giraldez S, Galindo-Moreno M, Limón-Mortés MC, Cristina Rivas A, Herrero-Ruiz J, Mora-Santos M, et al. G1/S phase progression is regulated by PLK1 degradation through the CDK1/ β TrCP axis. *FASEB J.* 2017;31:2925–36.
 53. Limón-Mortés MC, Mora-Santos M, Espina Á, Pintor-Toro JA, López-Román A, Tortolero M, et al. UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1- β TrCP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Sci.* 2008;121:1825–31.
 54. Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature.* 2004;428:77–81.
 55. Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, et al. The RIDDLE Syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell.* 2009;136:420–34.
 56. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21(CIP1)/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science.* 1997;277:831–4.
 57. Romero F, Germani A, Puvion E, Camonis J, Varin-Blank N, Gisselbrecht S, et al. Vav binding to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C: Evidence for Vav-hnRNP interactions in an RNA-dependent manner. *J Biol Chem.* 1998;273:5923–31.
 58. Galindo-Moreno M, Giraldez S, Sáez C, Japón M, Tortolero M, Romero F. Both p62/SQSTM1-HDAC6-dependent autophagy and the aggresome pathway mediate CDK1 degradation in human breast cancer. *Sci Rep.* 2017; 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10506-8>.
 59. van Drogen F, Sangfelt O, Malyukova A, Matskova L, Yeh E, Means AR, et al. Ubiquitylation of Cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 Isoforms. *Mol Cell.* 2006;23:37–48.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Oksana Brehey for her technical assistance. This article is dedicated to MT for her dedication to science and education.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MT and FR performed study concept and design. AB-F, JH-R, MG-M, MCL-M and, MM-S provided acquisition, analysis, and interpretation of data, and statistical analysis. CS and MAJ performed development of methodology. CS, MAJ, MT, and FR wrote the manuscript with input from all other authors. All authors read and approved the final paper.

FUNDING

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2017-87358-C2-1/2-R and PID2020-118774RB-C21 and -C22, and Junta de

Andalucía (2021/BIO-211). AB-F is the recipient of a Ph.D. fellowship from the Vicerrectorado de Investigación Plan Propio de Investigación (VI PPI) from Universidad de Sevilla. JH-R is a Talento Doctor fellow (Junta de Andalucía-FEDER). MM-S is a Marie Curie fellow (Grant number 101024268).

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01100-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Francisco Romero.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

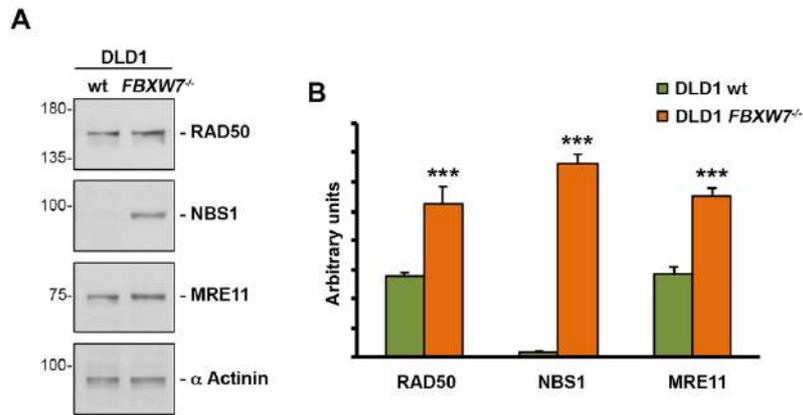
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

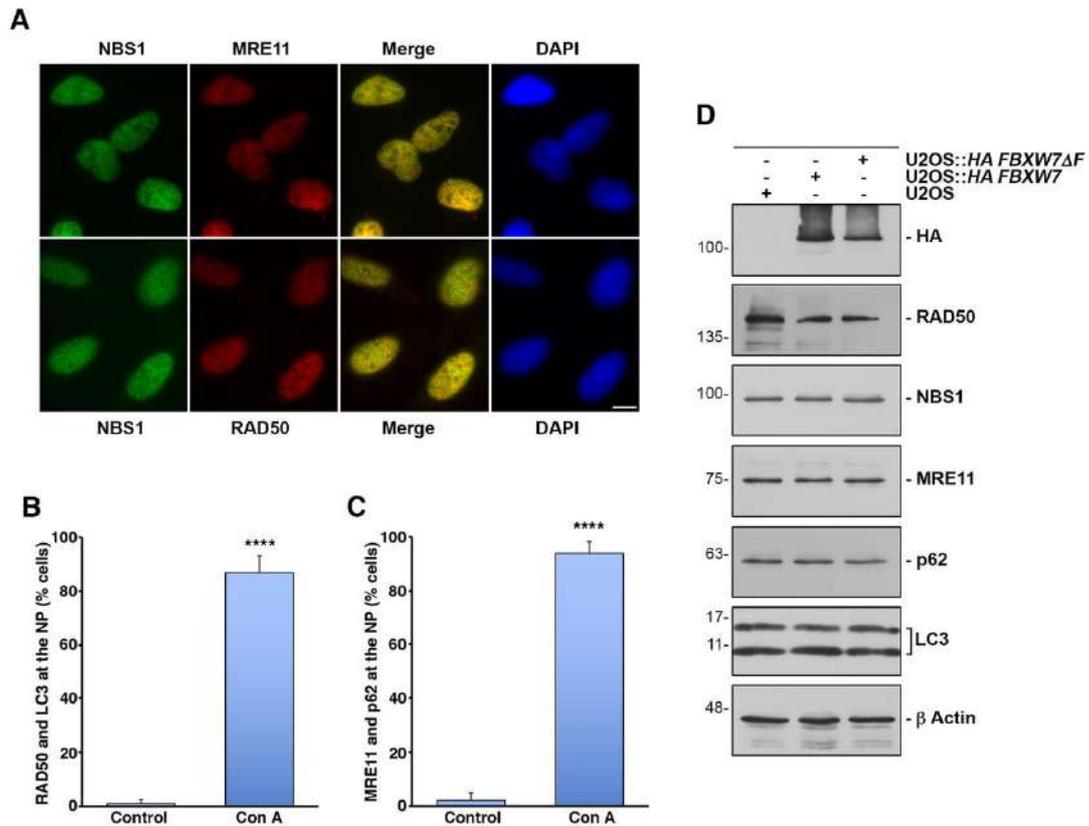
© The Author(s) 2022

from figure 1F using ImageJ software. Error bars represent the SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (Student's *t* test).



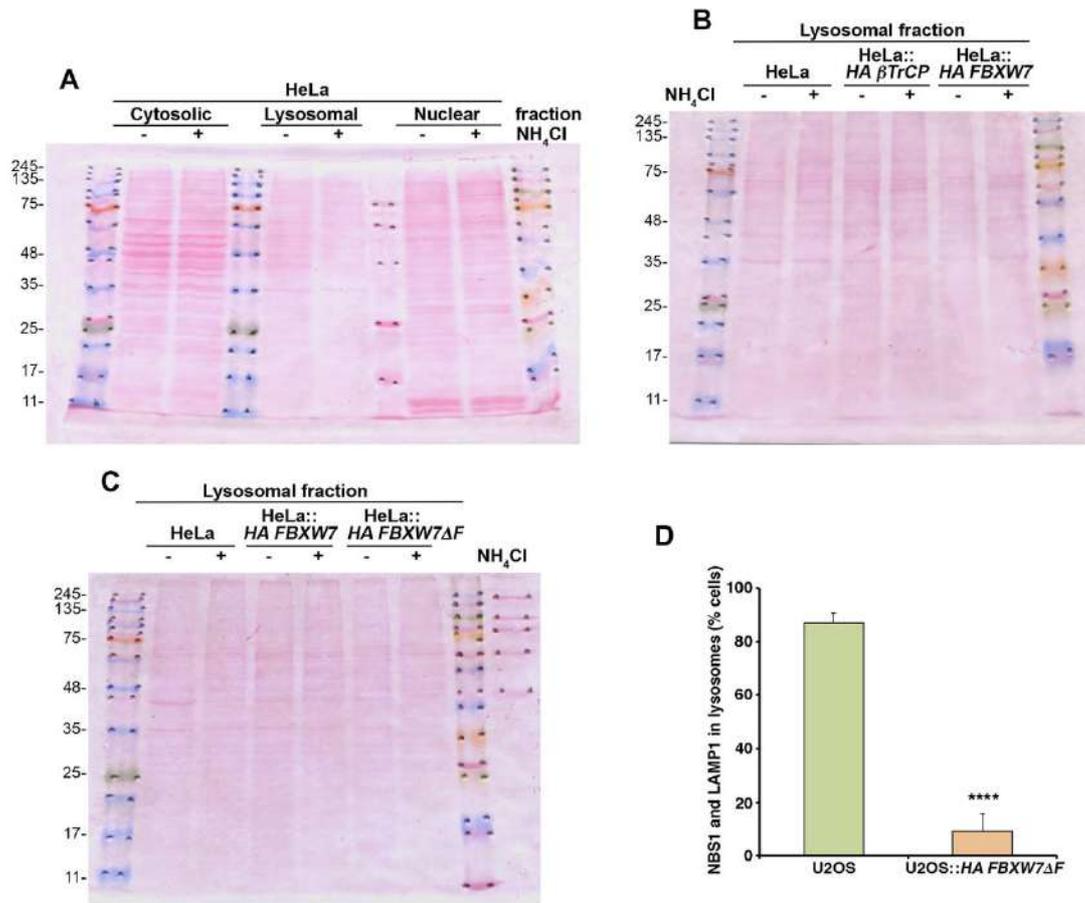
Supplementary Figure S2. Expression level of MRN complex proteins in DLD1 *FBXW7*^{-/-} cells.

A. Whole cell extracts from DLD1 and DLD1 *FBXW7*^{-/-} cells were prepared, transferred and blotted with the indicated antibodies. **B.** The graph shows the quantification of MRN levels from the supplementary figure S2A using ImageJ software. Error bars represent the SD (n = 3). ***p < 0.001 (Student's *t* test).



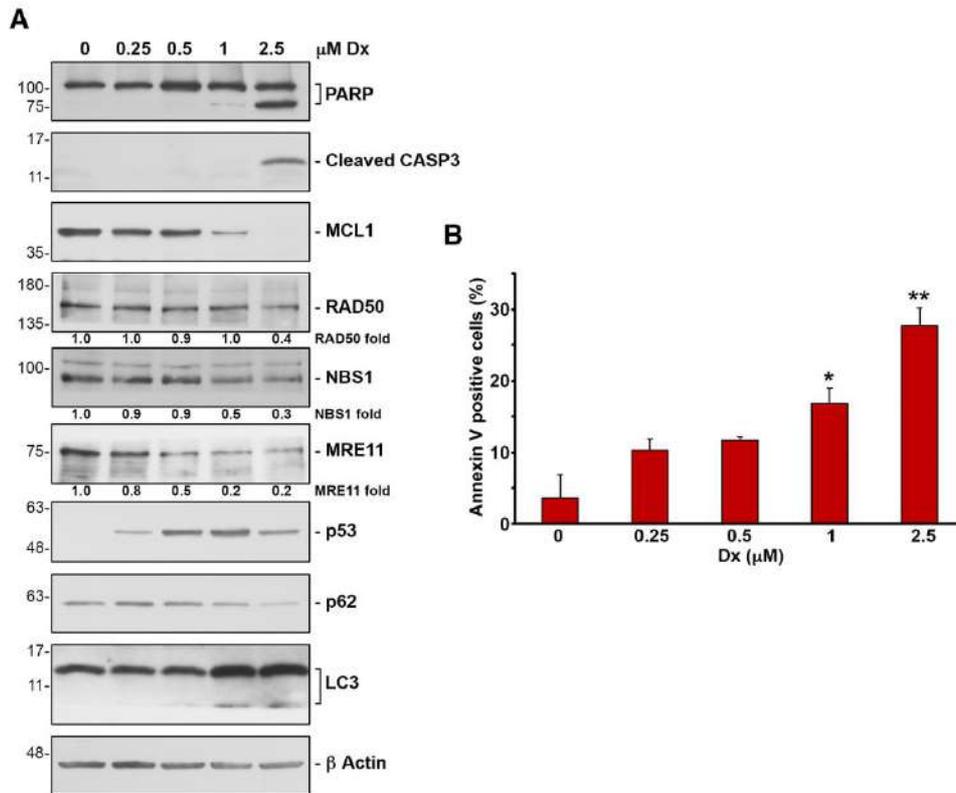
Supplementary Figure S3. MRE11, NBS1, and RAD50 have the same localization in normally growing U2OS cells, and are localized in the nuclear periphery, along with LC3 and p62, after Con A treatment.

A. U2OS cells were grown on coverslips, fixed and incubated with the indicated antibodies, as described in Materials and Methods. Staining was analyzed using a Leica DMi8 inverted microscope with a 63x oil-immersion objective using the same laser parameters. All microscope images were analyzed with ImageJ software. The bars represent 10 μ m. **B.** Quantification of U2OS cells treated or not with Con A for 8 h showing RAD50 and LC3 in the nuclear periphery. NP: nuclear periphery. Error bars represent the SD (n = 3). ****p < 0.0001 (Student's *t* test). **C.** Similar to B, but quantifying the percentage of cells showing MRE11 and p62 labeling at the nuclear periphery. **D.** Comparison of the levels of the proteins of interest in the nuclear extracts of cells U2OS, U2OS::HA FBXW7 and U2OS::HA FBXW7 Δ F treated with ammonium chloride used in the experiment of Figure 3C.



Supplementary Figure S4. Comparison of the percentage of U2OS versus U2OS::*HA FBXW7ΔF* cells treated with Con A displaying NBS1 in lysosomes.

A, B, C. Ponceau staining from filters used in figures 4A, B, C. Images show the similar load level of the lanes of each fraction. **D.** Quantification of Con A-treated U2OS and U2OS::*HA FBXW7ΔF* cells showing NBS1 in lysosome visualized with anti-LAMP1. Error bars represent the SD (n = 3). ****p < 0.0001 (Student's *t* test).



Supplementary Figure S5. Doxorubicin-induced cell death increases the degradation of the MRN complex.

A. U2OS cells were incubated with different concentrations of doxorubicin (Dx) for 24 h. Whole cell extracts were analyzed by immunoblotting. Western blots are representative of two replicates. **B.** Percentage of annexin V positive U2OS cells treated as described before were detected by flow cytometry. Error bars represent the SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01 (Student's *t* test).

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. Densitometric analysis of replicate immunoblots similar to that shown in Supplementary Figure S1.

FIG S1C

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Control	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
1h MG132	0.87112	0.93232	0.90172	0.04327
2h MG132	0.76978	0.81255	0.79117	0.03024
4h MG132	0.79488	0.84197	0.81843	0.03330
8h MG132	0.87854	0.91098	0.89476	0.02294
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Control	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
1h MG132	1.05455	1.12476	1.08966	0.04965
2h MG132	1.14955	1.06564	1.10760	0.05933
4h MG132	0.97023	0.89655	0.93339	0.05210
8h MG132	0.81993	0.78564	0.80279	0.02425
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Control	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
1h MG132	1.08055	1.09776	1.08916	0.01217
2h MG132	1.12121	1.20966	1.16544	0.06254
4h MG132	0.77033	0.81843	0.79438	0.03401
8h MG132	0.89476	0.91878	0.90677	0.01698

Supplementary Table S2. Densitometric analysis of replicate immunoblots similar to that shown in Figure 4.

FIG 4B

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
HeLa + NH ₄ Cl	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
HeLa:: <i>HA β TrCP</i> + NH ₄ Cl	0.79133	0.92455	0.85794	0.09420
HeLa:: <i>HA FBXW7</i> + NH ₄ Cl	1.71881	1.60121	1.66001	0.08316
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
HeLa + NH ₄ Cl	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
HeLa:: <i>HA β TrCP</i> + NH ₄ Cl	0.89021	0.78388	0.83705	0.07519
HeLa:: <i>HA FBXW7</i> + NH ₄ Cl	1.89176	2.04655	1.96916	0.10945
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
HeLa + NH ₄ Cl	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
HeLa:: <i>HA β TrCP</i> + NH ₄ Cl	1.10912	0.95077	1.02995	0.11197
HeLa:: <i>HA FBXW7</i> + NH ₄ Cl	2.76812	3.04955	2.90884	0.19900

FIG 4C

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
HeLa + NH ₄ Cl	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
HeLa:: <i>HA FBXW7</i> + NH ₄ Cl	3.21176	2.85532	3.03354	0.25204
HeLa:: <i>HA FBXW7 Δ F</i> + NH ₄ Cl	1.58055	1.21832	1.39944	0.25614
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
HeLa + NH ₄ Cl	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
HeLa:: <i>HA FBXW7</i> + NH ₄ Cl	3.47777	3.19465	3.33621	0.20020
HeLa:: <i>HA FBXW7 Δ F</i> + NH ₄ Cl	1.80811	1.68475	1.74643	0.08723
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
HeLa + NH ₄ Cl	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
HeLa:: <i>HA FBXW7</i> + NH ₄ Cl	2.06634	1.80855	1.93745	0.18229
HeLa:: <i>HA FBXW7 Δ F</i> + NH ₄ Cl	0.38844	0.75187	0.57016	0.25698

Supplementary Table S3. Densitometric analysis of replicate immunoblots similar to that shown in Figure 5.

FIG 5A

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
10% FCS	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
0.15% FCS	1.45222	1.59178	1.52200	0.09868
0.15% FCS + ConA	1.38088	1.54465	1.46277	0.11580
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
10% FCS	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
0.15% FCS	1.32433	1.38854	1.35644	0.04540
0.15% FCS + ConA	1.20882	1.31874	1.26378	0.07773
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
10% FCS	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
0.15% FCS	1.35676	1.45454	1.40565	0.06914
0.15% FCS + ConA	1.44098	1.60567	1.52333	0.11645

FIG 5B

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
0 μ M CDDP	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
10 μ M CDDP	1.07087	1.25342	1.16215	0.12908
30 μ M CDDP	0.67865	0.79122	0.73494	0.07960
50 μ M CDDP	0.74455	0.65065	0.69760	0.06640
70 μ M CDDP	0.34376	0.28865	0.31621	0.03897
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
0 μ M CDDP	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
10 μ M CDDP	1.64087	1.50878	1.57483	0.09340
30 μ M CDDP	1.48345	1.57186	1.52766	0.06252
50 μ M CDDP	0.57066	0.63487	0.60277	0.04540
70 μ M CDDP	0.12954	0.20176	0.16565	0.05107
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
0 μ M CDDP	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
10 μ M CDDP	1.17477	1.03954	1.10716	0.09562
30 μ M CDDP	1.14843	1.19129	1.16986	0.03031
50 μ M CDDP	0.37745	0.43491	0.40618	0.04063
70 μ M CDDP	0.15533	0.24722	0.20128	0.06498

FIG 5D

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP	0.49097	0.60566	0.54832	0.08110
CDDP + NH ₄ Cl	0.90122	0.96466	0.93294	0.04486
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP	0.42276	0.54512	0.48394	0.08652
CDDP + NH ₄ Cl	0.78843	0.87012	0.82928	0.05776
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP	0.38043	0.48843	0.43443	0.07637
CDDP + NH ₄ Cl	1.08922	0.93456	1.01189	0.10936

FIG 5E

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP + siRNA EGFP	0.18045	0.19188	0.18617	0.00808
CDDP + siRNA FBXW7	1.19177	1.27754	1.23466	0.06065
CDDP + siRNA EGFP + ConA	1.18045	1.32132	1.25089	0.09961
CDDP + siRNA FBXW7 + ConA	1.02754	1.05531	1.04143	0.01964
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP + siRNA EGFP	0.52766	0.63552	0.58159	0.07627
CDDP + siRNA FBXW7	1.22199	1.34365	1.28282	0.08603
CDDP + siRNA EGFP + ConA	1.13176	1.18099	1.15638	0.03481
CDDP + siRNA FBXW7 + ConA	1.15154	1.00961	1.08058	0.10036
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP + siRNA EGFP	0.24454	0.18376	0.21415	0.04298
CDDP + siRNA FBXW7	0.74772	0.61455	0.68114	0.09417
CDDP + siRNA EGFP + ConA	0.44876	0.48832	0.46854	0.02797
CDDP + siRNA FBXW7 + ConA	0.64452	0.62787	0.63620	0.01177
	Cyclin E			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
Unt	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
CDDP + siRNA EGFP	2.90232	3.40956	3.15594	0.35867
CDDP + siRNA FBXW7	5.24456	6.32786	5.78621	0.76601
CDDP + siRNA EGFP + ConA	2.51877	3.14032	2.82955	0.43950
CDDP + siRNA FBXW7 + ConA	5.23077	6.56176	5.89627	0.94115

Supplementary Table S4. Densitometric analysis of replicate immunoblots similar to that shown in Supplementary Figure S5.

FIG S5A

	RAD50			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
0 μ M Dx	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
0.25 μ M Dx	0.98232	1.07076	1.02654	0.06254
0.5 μ M Dx	0.92112	0.89098	0.90605	0.02131
1 μ M Dx	0.94987	1.08999	1.01993	0.09908
2.5 μ M Dx	0.42876	0.52455	0.47666	0.06773
	NBS1			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
0 μ M Dx	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
0.25 μ M Dx	0.94434	1.02955	0.98695	0.06025
0.5 μ M Dx	0.92111	0.98954	0.95533	0.04839
1 μ M Dx	0.53453	0.46886	0.50170	0.04644
2.5 μ M Dx	0.32966	0.29292	0.31129	0.02598
	MRE11			
	Replicate 1	Replicate 2	Mean value	SD
0 μ M Dx	1.00000	1.00000	1.00000	0.00000
0.25 μ M Dx	0.78821	0.92965	0.85893	0.10001
0.5 μ M Dx	0.52176	0.69987	0.61082	0.12594
1 μ M Dx	0.21943	0.30766	0.26355	0.06239
2.5 μ M Dx	0.23887	0.28551	0.26219	0.03298