



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA AUTOFAGIA EN EL
MANTENIMIENTO DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA DE CÉLULAS
DE MAMÍFERO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

GABRIEL MUCIÑO HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

SUSANA CASTRO OBREGÓN

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ, [Instituto de Biotecnología](#)

ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA, [Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Abril, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para Teo

Ilhuicac xochitlahtolli

(Tocoltzitzin Toltecame incuic)

Amo queman titlamomatise tlahlamiquilstli,
ihuan amo queman ticasicamatise Toltecatoytl;
nochipa oncas yancuic tlahlamiquilstli
ihuan huehuetlamatilistli ipan tonemilis.

*

Cactli cahuitl ihuan Sencahuitl tlayeyecolli...

—

Poema sin fin

(Canto a los abuelos Toltecas)

Jamás agotaremos el conocimiento
ni alcanzaremos la perfección.
Siempre habrá algo nuevo
o algo viejo
que aprender en la vida

*

Sin tiempo y para todo tiempo...

Natalio Hernández

Del poemario "Yancuic Anahuac Cuicatl" / "Canto Nuevo de Anáhuac (1994)

El trabajo aquí presentado fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Susana Castro Obregón en el Laboratorio AL-104 del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, que es parte de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Durante la realización de este trabajo se contó con los siguientes apoyos:

- Beca CONACyT 416724,
- Apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para presentar el trabajo en congresos nacionales e internacionales.
- Financiamiento económico Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN2206015- IN206518 - IN209221,
- Financiamiento económico CONACyT CB2013-220515
- Financiamiento económico por parte de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México SECTEI/008/2018 "Red Colaborativa de Investigación Traslacional para el Envejecimiento Saludable de la Ciudad de México (RECITES)"

La realización del trabajo experimental se logró gracias al apoyo de las siguientes personas:

- Dra. Beatriz Aguilar Maldonado, Técnico Académico del laboratorio AL-104 en el IFC.
- M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo de la Unidad del Bioterio.
- Dra. Ruth Rincón Heredia, M.C. Rodolfo Paredes Díaz y Dr. Abraham Rosas Arellano de la Unidad de Imagenología del IFC.
- Ing. Manuel Ortíz Benavides e Ing. Aurey Galván Lobato miembros del Taller de Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico del IFC.
- Dra. Leonor Pérez Martínez, Investigadora del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
- M. en C. Ana María Escalante e Ing. Francisco Pérez Eugenio de la Unidad de Cómputo del IFC.
- Dr. Horacio Merchant Larios y M en C. José Alejandro Marmolejo Valencia del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.
- Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas, Investigador del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de la UNAM.
- A la Dra. María Sandra Cabrera Benítez, Investigadora de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Agradecimientos

A la Dra. Susana Castro Obregón por integrarme a su equipo de trabajo, por ser una excelente guía académica y por fomentar mi interés en la ciencia.

A la Dra. Beatriz Aguilar Maldonado con quien quedo endeudado por todo el apoyo, enseñanzas y su inmejorable amistad.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez y a la Dra. Angélica Zepeda Rivera, quienes como parte de mi Comité Tutor aportaron análisis y sugerencias para el desarrollo del trabajo experimental y para mi formación.

Al personal administrativo del Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

A toda la comunidad del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, quienes son una comunidad abierta a la cooperación y colaboración, facilitando la superación de obstáculos experimentales.

A todas las personas con quienes pude generar un vínculo amistoso invaluable durante esta etapa de la vida.

A toda la comunidad de la UNAM, por propiciar un ambiente dinámico en aspectos académicos, culturales y sociales.

ÍNDICE.

	Página
• <i>Abstract</i>	9
• Resumen	11
• Abreviaturas	13
1. Introducción	15
1.1. Núcleo celular.	16
1.2. Rupturas de doble cadena en el DNA	18
1.3. Mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena en el DNA.	20
1.4. Respuesta de daño al DNA.	21
1.5. Autofagia.	23
1.6. La autofagia contribuye a proteger el genoma.	28
1.7. Expulsión de material nuclear por fallas en la reparación del DNA.	31
1.8. Nucleofagia	32
2. Planteamiento del problema.	35
3. Hipótesis	36
4. Objetivos	36
4.1. Objetivo general	36
4.2. Objetivos particulares	36
5. Estrategia experimental	37
5.1. Inducción de daño al DNA.	37
5.1.1. Cultivo celular	37
5.2. Evaluación y monitoreo del daño en el DNA.	38
5.2.1. Ensayo cometa	38
5.3. Evaluación y monitoreo intracelular de proteínas.	40
5.3.1. Inmunofluorescencia	41
5.3.2. <i>Western Blot</i>	42
5.3.3. Inmunodetección con partículas de oro mediante microscopía electrónica de transmisión (immunogold)	44
5.3.4. Microscopía de superresolución	47
5.4. Bloqueo del flujo autofágico.	47
5.4.1. Transfección de siRNA.	48
6. Resultados.	49
6.1. Establecimiento del modelo de daño y reparación del DNA en fibroblastos.	49

6.2. El estrés genotóxico propicia la formación basal de alteraciones nucleares que se incrementan por el estrés genotóxico.	51
6.3. La autofagia es necesaria para la formación de protrusiones nucleares y para la remoción de MiNu en fibroblastos primarios.	53
6.4. La nucleofagia elimina complejos de corte de topoisomerasa II y componentes nucleolares.	61
7. Discusión.	68
8. Conclusiones.	73
9. Perspectivas.	75
10. Referencias bibliográficas.	77
11. Anexos.	87
11.1. Tabla 1. Lista de anticuerpos empleados.	87
11.2. Lista de publicaciones generadas durante el programa de doctorado.	88
11.3. Lista de publicaciones en colaboración.	88
11.4. Artículo original: <i>Nucleophagy contributes to genome stability through degradation of type II topoisomerases A and B and nucleolar components.</i>	90
11.5. Artículo de revisión: <i>Autophagy as a target for therapeutic uses of multifunctional peptides.</i>	102

Estudio de la contribución de la autofagia en el mantenimiento de la estabilidad genómica de células de mamífero

Abstract.

This work focuses on the role of nucleophagy, a specialized form of autophagy, to promote genome stability and cell survival through the clearance of anomalous nuclear material.

Genome instability contributes to neurodevelopmental disorders, neurodegeneration, cancer development, and premature aging. Therefore, how normal, healthy cells maintain genome stability avoiding accumulation of nuclear damaged material needs to be understood. In this work, we hypothesized that nucleophagy could be a mechanism to keep nuclear and genome integrity in normal (noncancerous) cells, in response to DNA damaging agents. We found that primary mouse embryonic fibroblasts developed nuclear buds and micronuclei which increase in frequency in response to multiple DNA double strand breaks. The nuclear buds and micronuclei observed were surrounded by the autophagic proteins LC3 and BECN1, in proximity with lysosomal markers, indicative of their potential elimination by nucleophagy. Inhibition of autophagy reduced the frequency of nuclear buds, suggesting an active role of the autophagic machinery in their formation. Surprisingly, we observed that the number of micronuclei increased in the absence of the autophagic protein ATG4, supporting the notion that buds and micronuclei have different mechanisms of formation. We also observed basal development of nuclear buds and micronuclei in control cells, which were also surrounded by autophagy machinery.

Interestingly, some of these nuclear alterations contained damaged DNA and DNA Topoisomerase 2, an enzyme involved in DNA entanglements resolution. Another protein present in nuclear alterations was Fibrillarin, a nucleolar component. The nucleolus is a subnuclear compartment with a high density of nucleic acids and proteins that creates a distinct environment that limits the accessibility of DNA repair factors. We considered that nucleosomal damage could also be removed by expelling nucleolar damaged material into the cytoplasm to be a nucleophagy target.

Collectively, our data show that nucleophagy contributes to preserve nuclear cell physiology by constantly clearing damaged DNA through nuclear buds and micronuclei elimination. We think nucleophagy also contributes to maintain nuclear proteostasis under intense genotoxic stress. Finally, we propose that the nucleophagic clearance of damaged DNA and nucleolar material promotes cellular survival.

Key words: nucleophagy, DNA damage, proteostasis, nuclear protrusions, micronuclei, nucleoli.

Resumen.

Este trabajo se enfoca en entender el papel de una forma especializada de autofagia denominada nucleofagia, para promover la estabilidad del genoma y la supervivencia celular mediante la eliminación de material nuclear anómalo.

La inestabilidad genómica es subyacente a desórdenes del neurodesarrollo, la neurodegeneración, el desarrollo del cáncer, así como al envejecimiento prematuro. Por ello, es importante entender cómo es que las células normales y sanas mantienen la estabilidad del genoma y evitan la acumulación de material nuclear dañado. En este trabajo, planteamos que la nucleofagia puede ser un mecanismo para mantener la integridad nuclear y la integridad genómica como respuesta a agentes que dañan el DNA en células normales (no cancerosas). Así, en fibroblastos embrionarios de ratón detectamos la presencia de protuberancias nucleares y micronúcleos (MiNu), los cuales incrementan en frecuencia ante la inducción de múltiples rupturas de doble cadena en el DNA. Además, detectamos que las protuberancias nucleares y los micronúcleos son rodeados por las proteínas autofágicas LC3 y BECN1, que además se identificaron en proximidad con marcadores lisosomales, lo cual es indicativo de su potencial eliminación mediante nucleofagia. Al inhibir la autofagia se redujo la frecuencia de protuberancias nucleares, lo que además sugiere un papel activo de la maquinaria autofágica en la formación de estas alteraciones nucleares. También observamos que el número de micronúcleos incrementó en ausencia de la proteína autofágica ATG4, lo que apoya la noción de que las protuberancias nucleares y los micronúcleos tienen mecanismos de formación diferentes. Asimismo, en células control observamos el desarrollo basal de protuberancias nucleares y micronúcleos, también rodeados por proteínas de la maquinaria autofágica.

Resulta relevante que algunas de las alteraciones nucleares observadas, además de DNA dañado, contenían la proteína Topoisomerasa 2, una enzima involucrada en la resolución de intrincamientos formados entre las cadenas del DNA. A su vez, otra proteína identificada en las alteraciones nucleares fue la Fibrilarina, que es componente del nucleolo. El nucleolo es un compartimento subnuclear con una alta densidad de ácidos nucleicos y proteínas que crean un ambiente particular que limita el acceso a los factores de reparación del DNA. Por lo anterior, consideramos que el daño nucleosomal podría ser removido expulsando componentes nucleolares en protuberancias nucleares y micronúcleos (MiNu).

Colectivamente, nuestros datos muestran que la nucleofagia contribuye a preservar la fisiología del núcleo de las células removiendo constantemente DNA dañado a través de la eliminación de protuberancias nucleares y MiNu. Además, proponemos que la nucleofagia también contribuye a mantener la proteostasis, durante el estrés genotóxico intenso. Finalmente, proponemos que esta eliminación nucleofágica del DNA dañado y del material nucleolar, promueve la supervivencia celular.

Palabras clave: nucleofagia, daño al DNA, proteostasis, protrusiones nucleares, micronúcleo, nucléolo.

Abreviaturas.

CMA	autofagia mediada por chaperonas por las siglas en inglés para <i>Chaperone Mediated Autophagy</i> .
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico por las siglas en inglés para <i>Deoxirribonucleic acid</i> .
DDR	Respuesta de daño al DNA por las siglas en inglés para <i>DNA damage response</i> .
DSBs.	Rupturas de doble cadena en el DNA por las siglas en inglés para <i>DNA double Strand breaks</i> .
EDTA	Ácido etilen-diamino tetracético por las siglas en inglés para <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> .
GFP	Proteína verde fluorescente por las siglas en inglés para <i>Green Fluorescent Protein</i> .
IF	Inmunofluorescencia
HR	Recombinación homóloga por las siglas en inglés para <i>Homologue recombination</i>
LIR	Región de interacción con LC3, por las siglas en inglés para <i>LC3 interaction región</i>
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón por las siglas en inglés para <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> .
MiNu	Micronúcleos
NHEJ	Unión de extremos no homólogos por las siglas en inglés para <i>Non-Homologous End Joining</i> .
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida, por las siglas en inglés para <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> .
PBS	Amortiguador salino de fosfatos por las siglas en inglés para <i>Phosphate buffer saline</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido Ribonucleico por las siglas en inglés para <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno por las siglas en inglés para <i>Reactive Oxigen Species</i> .
SDS	Dodecilsulfato de sodio por las siglas en inglés para <i>Sodium Dodecil sulphate</i> .
siRNA	RNA pequeños interferentes por las siglas en inglés para <i>small intefering RNA</i>

TBS	Amortiguador salino de Tris, por las siglas en inglés para <i>Tris-Buffered saline</i>
TBST	Amortiguador salino de Tris adicionado con Tween 20
TOP2A	Topoisomerasa 2 alfa
TOP2B	Topoisomerasa 2 beta
TOP2cc	Complejos de corte de Topoisomerasa 2
UBA	Asociación a Ubiquitina por las siglas en inglés para <i>Ubiquitin Associated</i> .
UV	Ultravioleta
WB	<i>Western Blot</i>
WF	Widefield.
WT	Silvestre por las siglas en inglés para <i>Wilde type</i> .

1.- Introducción.

A lo largo de la vida de los organismos, las células que los conforman son expuestas a distintas condiciones que perturban su homeóstasis. Mientras tales perturbaciones no tengan un impacto letal inmediato, las células implementan procesos para adaptarse y sobrevivir. El proceso de adaptación se lleva a cabo en distintas etapas que incluyen primero la remoción (en caso de ser posible) del estímulo que genera la perturbación, seguida por la reparación del daño molecular y/o daño en organelos y culminando con el restablecimiento de las condiciones fisiológicas (Galluzzi et al., 2015).

Las células sometidas a estímulos de estrés intensos y/o prolongados, activan procesos que pretenden evitar la propagación de daños, ya sea inhibiendo la proliferación de las células afectadas o promoviendo su eliminación. Estos mecanismos pueden tener efectos sobre otros procesos celulares e incluso pueden conducir a la generación de señales moleculares con efectos paracrinos (Galluzzi et al., 2018).

Aunque los mecanismos de adaptación al estrés contribuyen a la formidable resiliencia del organismo, también contribuyen a su degeneración con el paso del tiempo e incluso pueden conducir al envejecimiento del organismo y/o al desarrollo de condiciones patológicas.

Dado que la información sobre el funcionamiento y regulación de cada parte de la célula está codificada en el DNA y considerando que el genoma de las células está constantemente expuesto a procesos y factores endógenos y exógenos que alteran su estructura, integridad y estabilidad, resultan de particular relevancia los elementos de protección y los mecanismos de respuesta a perturbaciones que lo afectan.

A este respecto, el núcleo de las células eucariotas brinda protección física al genoma, pero además constituye una estructura que regula el tráfico de moléculas con el citoplasma. Por otro lado, y de manera complementaria para la protección del genoma, ante las distintas perturbaciones que afectan directamente a la estructura del DNA, se activan diferentes maquinarias moleculares de reparación, como parte

de la denominada respuesta de daño al DNA, la cual además de la reparación de daños genómicos, involucra diversos eventos de señalización altamente ordenados con efectos en el resto de la célula, de manera que se favorezca el proceso de reparación.

1.1 Núcleo celular.

En organismos eucariotas, el núcleo de las células es un organelo altamente compartimentalizado, conformado por una envoltura nuclear y un nucleoplasma (figura 1). En el nucleoplasma se encuentra el DNA asociado con histonas, organizado en regiones específicas denominadas territorios cromosómicos (Denais & Lammerding, 2014; Gay & Foiani, 2015). También en el nucleoplasma se encuentran múltiples moléculas organizadas en subestructuras o cuerpos nucleares con funciones específicas cuya delimitación no involucra la presencia de membranas lipídicas. El nucléolo es el cuerpo nuclear de mayor tamaño y es una estructura en la que se lleva a cabo la síntesis del RNA ribosomal, así como una parte del ensamblaje de los ribosomas (Nunes & Moretti, 2017).

Con respecto a la envoltura nuclear, esta es una estructura con múltiples elementos que incluyen principalmente:

a) Una membrana nuclear conformada por dos bicapas lipídicas organizadas en una membrana interna y una membrana externa, las cuales están separadas por un espacio luminal. La membrana externa se encuentra hacia el citoplasma y está unida al retículo endoplásmico (Denais & Lammerding, 2014; Gauthier & Comaills, 2021; Gay & Foiani, 2015).

b) La lámina nuclear, que es una delgada red proteica localizada debajo de la membrana interna nuclear. Los principales componentes de la lámina nuclear son las láminas tipo A (lámina A y lámina C) y las láminas tipo B (lámina B1 y lámina B2). Esta estructura brinda fortaleza, flexibilidad y rigidez, además de soporte mecánico y es una plataforma de anclaje para otras moléculas y estructuras (Denais & Lammerding, 2014; Gauthier & Comaills, 2021; Gay & Foiani, 2015). Sirve de anclaje de la

cromatina, regulando así la arquitectura del genoma con influencia en la expresión génica.

c) Complejos del poro nuclear, que son puntos en los cuales se fusionan las membranas nucleares interna y externa. Estos poros están compuestos de múltiples subunidades proteicas denominadas nucleoporinas. La principal función de estos complejos es controlar el tráfico de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (Denais & Lammerding, 2014; Gauthier & Comaills, 2021; Gay & Foiani, 2015).

La morfología nuclear es un marcador común para determinación y clasificación de las células, así como del estado fisiológico o patológico de las mismas. Además de la típica forma circular, el núcleo puede estar alargado o desplegar invaginaciones. Se pueden presentar alteraciones de la cromatina o cambios en la composición de la envoltura nuclear que propicien el colapso de esta envoltura y en consecuencia pérdida de la compartimentalización (Gauthier & Comaills, 2021).

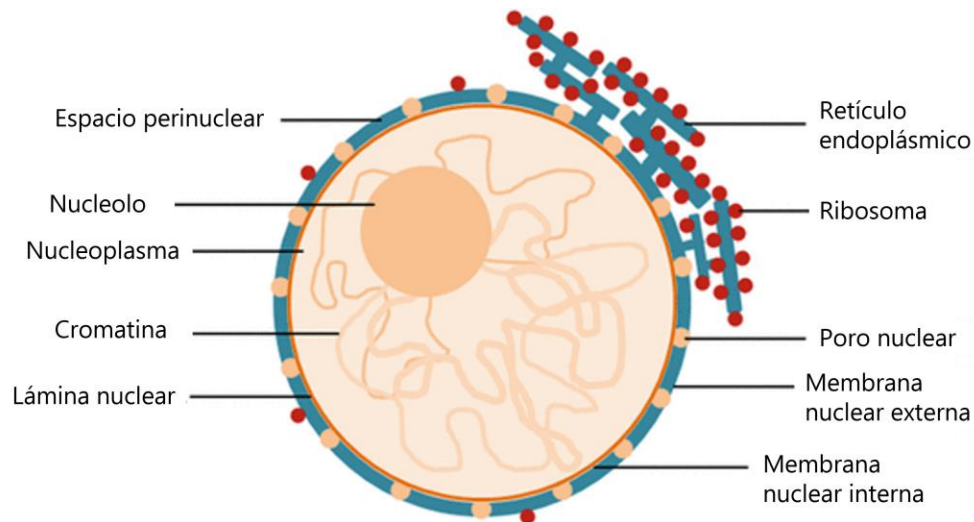


Figura 1. Estructura del núcleo en interfase. (modificado de Vimal, 2018) La estructura general del núcleo está conformada por el nucleoplasma y por la envoltura nuclear. Ambos elementos, contienen a su vez otros componentes importantes para regular la estructura y función del núcleo.

1.2.- Rupturas de doble cadena en el DNA.

Las alteraciones en la secuencia del DNA han permitido el surgimiento de variantes génicas, que han sido uno de los factores necesarios para la evolución de los organismos. Sin embargo, toda alteración en el genoma de las células implica un riesgo de afectación en la correcta funcionalidad de los componentes celulares e incluso de la propia célula.

Dentro de las alteraciones que puede sufrir el DNA, las rupturas de doble cadena (DSBs, por las siglas en inglés para *DNA double Strand breaks*), son consideradas como las más dañinas y letales. Las rupturas de doble cadena en el DNA interrumpen la continuidad de secuencias, pudiendo afectar secuencias ubicadas dentro de un gen o bien en elementos regulatorios de la expresión de genes, pudiendo alterar de este modo la funcionalidad de los productos de la expresión de los genes afectados. Las cadenas rotas y sueltas, a su vez pueden fusionarse con otras cadenas sueltas, generando rearrreglos cromosómicos (Gill Super, 2015; Lengauer et al., 1998; Ou & Schumacher, 2019). Por lo tanto, es esencial para la célula detectar los daños al DNA y repararlos antes de que causen inestabilidad al genoma.

La frecuencia de rupturas en el DNA es muy alta, causada tanto por agentes externos como por procesos fisiológicos, por lo que el genoma está en constante dinamismo. De manera fisiológica y controlada se generan rupturas transitorias de doble cadena en el DNA, por ejemplo, durante el entrecruzamiento meiótico en la reproducción sexual, con la finalidad de que los cromosomas homólogos intercambien material genético en la gametogénesis (Aleksandrov et al., 2020; Goodarzi & Jeggo, 2013). De igual forma la extraordinaria diversidad de receptores de células T y de inmunoglobulinas producidas por células B, necesarios para el reconocimiento de antígenos, depende de eventos de recombinación en el DNA de estas células. Lo anterior depende de la generación transitoria de DSBs en el DNA de los denominados segmentos V(D)J presentes en los genes que codifican para el receptor de células T y para las inmunoglobulinas (Aleksandrov et al., 2020; Goodarzi & Jeggo, 2013). Estudios recientes sugieren que también durante la neurogénesis que ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso ocurre recombinación en genes neuronales (Alt et al., 2017). Esta activa generación de DSBs y su reparación podría explicar el mosaicismo genómico que se ha descubierto en el cerebro, indicando que

también en células post-mitóticas hay dinamismo genómico (Rohrback et al., 2018). Asimismo, la activación de algunas neuronas requiere la generación de DSBs en regiones promotoras de genes de expresión temprana, lo cual facilita el remodelamiento de la cromatina para permitir el acceso de la maquinaria de transcripción (Madabhushi et al., 2015; Suberbielle et al., 2013). Es importante recalcar que los ejemplos descritos, implican la inducción transitoria y regulada de las rupturas en el DNA, las cuales necesariamente son reparadas, ya que, de lo contrario, los defectos en su reparación son causantes de desórdenes del desarrollo, desórdenes inmunológicos y neurológicos, así como de distintos tipos de cáncer (Chapman et al., 2012).

Además, dado que la doble hélice del DNA adopta estructuras más complejas como super-enrollamientos, concatenaciones o nudos, estas estructuras complejas deben ser resueltas para permitir la replicación y la transcripción (Riccio et al., 2020). Así, en la resolución de estas estructuras complejas participan las topoisomerasas, que son enzimas capaces de generar rupturas transitorias en la doble hélice. Particularmente las topoisomerasas de tipo II (TOP2A y TOP2B en mamíferos), catalizan una ruptura de doble cadena en el DNA y mantienen separados los extremos resultantes mediante un complejo intermediario formado por la proteína TOP2 y el DNA (complejos de corte o TOP2cc). Esta ruptura y separación permite el paso de una segunda cadena intacta de DNA a través de la cadena cortada. Finalmente, la misma TOP2 vuelve a ligar los extremos cortados en el DNA (Buzun et al., 2020). Por lo anterior, cualquier perturbación que evite la actividad catalítica y completa de las TOP2, conduce a la generación de rupturas permanentes de doble cadena en el DNA con consecuencias negativas para la célula e incluso pudiendo ser letales. Esto ha sido aprovechado para el desarrollo de compuestos antitumorales como el Etopósido, la *Mitoxantrona* y la *Doxorubicina* que actúan estabilizando los complejos TOP2-DNA, desalinean los extremos de DNA e impiden su ligación (Vann et al., 2021).

Por otro lado, diversos agentes fisicoquímicos de fuente endógena o exógena pueden provocar DSBs en forma directa o indirecta. Entre los agentes endógenos que conducen a las DSBs, encontramos a productos derivados de reacciones metabólicas como el formaldehído y las especies reactivas de oxígeno, mientras que algunos agentes exógenos como la radiación X o la radiación ionizante o bien

diversos compuestos químicos también generan dichas lesiones (Aleksandrov et al., 2020).

1.3.- Mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena en el DNA.

Los principales mecanismos de reparación de DSBs, en forma general involucran la síntesis de un segmento de las cadenas de DNA dañadas, para lo cual, se requiere de una cadena homóloga, al menos en un segmento, la cual funciona como templado para la síntesis de una cadena complementaria, que al final es ligada al resto de la cadena afectada (figura 2).

En células eucariotas, la reparación de DSBs ocurre por una de las siguientes dos vías:

a) Unión de extremos no homólogos.

Esta es una vía rápida que repara el DNA tomando una mínima referencia (homología de hasta 4 bp) en la secuencia homóloga de la cadena de DNA que funciona como templado (Scully et al., 2019). Por ello, esta es una vía propensa a errores que pueden conducir a otras alteraciones en el DNA como inserciones, deleciones o sustituciones en el sitio de ruptura e incluso también se pueden generar translocaciones entre distintas partes del genoma. Esta vía puede actuar durante todo el ciclo celular, aunque es favorecida en la fase G1 (Chapman et al., 2012; Scully et al., 2019).

b) Recombinación homóloga

Esta vía requiere de una extensa homología entre el fragmento a reparar y un segmento de una cadena que es utilizado como templado. Dado que la mayor homología de una secuencia homóloga deriva de la cromátida hermana, esta vía opera en fases posteriores a la replicación del DNA, es decir en la fase tardía S y en la fase G2 del ciclo celular (Chapman et al., 2012; Goodarzi & Jeggo, 2013).

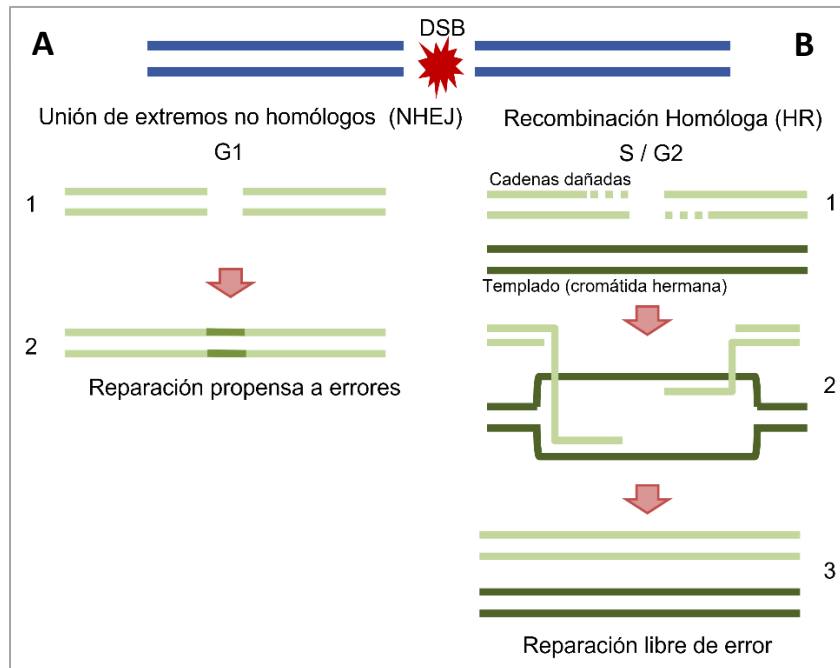


Figura 2. Esquema general de los mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena en el DNA. Ante la aparición de una DSB, las células pueden activar dos vías de reparación en función de la fase del ciclo celular. **A.** En la unión de extremos no homólogos que ocurre en la fase G1, la reparación es más directa y no requiere un alto grado de homología para proceder a la reparación, lo que la convierte en una vía susceptible a errores. Inicialmente también hay una resección, pero ésta abarca un segmento muy corto (paso **1**), tras lo cual se puede continuar con la ligación de los extremos afectados (paso **2**). En A y en B, las líneas en verde claro representan a las moléculas de DNA que son sometidas a reparación. **B.** En la recombinación homóloga, que es favorecida en las fases S y G2 del ciclo celular, se utiliza a la cromátida hermana no dañada como templado para la reparación. En general, los extremos en los sitios de ruptura son sometidos a una resección que deja extremos con segmentos de cadenas sencillas libres (paso **1**). Estos extremos libres invaden las cadenas en la molécula templado (en color verde oscuro) desplazando sus cadenas apareadas en un segmento (paso **2**). Enseguida mediante síntesis, se extiende la secuencia en los segmentos dañados, los cuales al final son ligados al resto de la molécula inicial afectada (paso **3**).

1.4.- Respuesta de daño al DNA.

La denominada respuesta de daño al DNA (DDR por sus siglas en inglés para *DNA damage response*) consiste en una red altamente interconectada de rutas moleculares intracelulares para detectar y reparar diversos tipos específicos de lesiones en el genoma. La secuencia de eventos de esta respuesta involucra el reconocimiento de modificaciones específicas en el DNA, con el consecuente reclutamiento de un grupo de proteínas que reparan la lesión, además de proteínas

que se acumulan en los sitios de daño para luego transducir señales que modulen procesos celulares como la replicación del DNA, la transcripción, el control del ciclo celular, la modulación de la síntesis y recambio de proteínas y la modulación de procesos de supervivencia o de muerte celular, tal como se ilustra en la figura 3 (Blackford & Jackson, 2017; Eliopoulos et al., 2016).

El reclutamiento y activación de las distintas maquinarias moleculares requiere de interacciones intermoleculares que en gran medida son mediadas por modificaciones postraduccionales sobre las proteínas reclutadas y sobre el núcleo de histonas en la vecindad de los puntos de la lesión, facilitando el acceso al DNA dañado (Shiloh & Ziv, 2013).

Particularmente las DSBs son detectadas tanto por el complejo MRN (conformado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1) (Marcomini & Gasser, 2015; Prokhorova et al., 2020), como por el heterodímero Ku70-Ku80 (Marcomini & Gasser, 2015). El complejo MRN, mediante la proteína NBS1 recluta a la proteína cinasa ATM, reteniéndola en los sitios de daño (Shiloh & Ziv, 2013). Así, ATM unida a los sitios de ruptura se autofosforila y activa, lo que le permite a su vez fosforilar a otras proteínas (Eliopoulos et al., 2016). Entre los blancos de fosforilación por ATM, se encuentra la serina 139 en la variante de histona H2AX y es entonces denominada γ H2AX. Esta fosforilación en la histona H2AX también puede ser mediada por otras cinasas como ATR y DNA-PK (Bonner et al., 2008; Scully et al., 2019). γ H2AX dirige el reclutamiento y anclaje de múltiples proteínas necesarias para la reparación del DNA. Una vez que la integridad del DNA es restaurada, la histona γ H2AX puede ser desfosforilada o bien puede ser removida de la cromatina (Bonner et al., 2008). Estos eventos permiten monitorear la cinética de reparación de las DSBs, mediante la detección de aparición y desaparición de la γ H2AX.

ATM también fosforila a las proteínas CHK1 y CHK2 que bloquean la actividad de CDC25, un regulador positivo de la progresión del ciclo celular (Prokhorova et al., 2020). A su vez tanto ATM como CHK2 fosforilan y activan a p53 (Eliopoulos et al., 2016), el cual, a través de su actividad transcripcional, promueve la síntesis de diferentes proteínas, así como la expresión de microRNAs, todos ellos involucrados en el arresto del ciclo celular, la inducción ya sea de la muerte celular o de

senescencia celular y la inducción de respuestas de adaptación al estrés como la autofagia (Prokhorova et al., 2020).

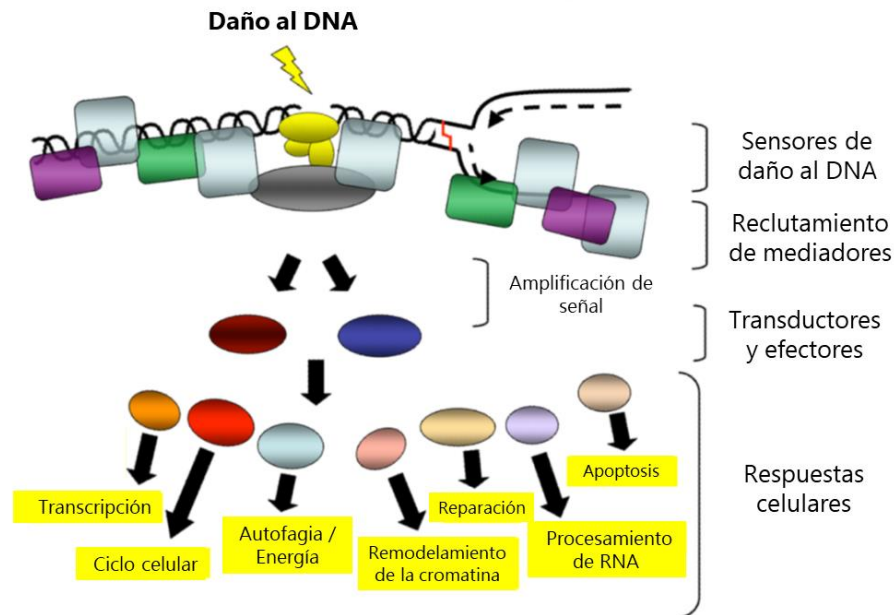


Figura 3. Respuesta de daño al DNA (modificado de Jackson & Bartek, 2009). Las alteraciones en la estructura del DNA son reconocidas por proteínas, que inician una cascada de señalización con consecuencias en diversos procesos en el resto de la célula y que son regulados de forma que se favorezca la reparación del DNA.

1.5.- Autofagia.

La autofagia es el nombre común asignado al conjunto de rutas moleculares que operan en células eucariotas, mediante las cuales, distintos sustratos celulares son dirigidos al lisosoma para su degradación y reciclaje (Klionsky, Petroni, et al., 2021; Rogov et al., 2014)

La autofagia contribuye a mantener la homeostasis metabólica de las células operando a nivel basal para regular el recambio de organelos y macromoléculas. Sin embargo, la perturbación de la homeóstasis celular por estímulos de estrés provenientes de fuente endógena o exógena, inducen la autofagia, promoviendo así

la degradación de estructuras y/o macromoléculas tóxicas o acumuladas en exceso (Ambrosio & Majello, 2020a; Klionsky, Petroni, et al., 2021; Papandreou & Tavernarakis, 2021; Rogov et al., 2014) .

Con base en diferencias morfológicas, señales inductoras, tipos de sustrato y los mecanismos en que estos son dirigidos al lisosoma, se han caracterizado tres tipos de autofagia en células de mamífero (figura 4). La **autofagia mediada por chaperonas (CMA**, por sus siglas en inglés) opera como un tipo de autofagia exclusiva de proteínas portadoras del pentapéptido KFERQ (o una secuencia que comparta las características fisicoquímicas de este péptido), el cual es reconocido por las proteínas chaperonas HSPA8/HSC70, tras lo cual son translocadas a la membrana lisosomal, donde son reconocidas e internalizadas en forma dependiente de la proteína LAMP2A. En la **microautofagia**, el sustrato interactúa directamente con la membrana lisosomal y es introducido al lisosoma mediante invaginaciones de la misma membrana. Sobre este mecanismo se han identificado algunas variantes como la denominada **microautofagia endosomal**, en la que los sustratos son introducidos a endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares en lugar del lisosoma. Estos procesos pueden ser no selectivos o bien, estar mediados por el reconocimiento entre las proteínas chaperonas HSPA8/HSC70 y el pentapéptido KFERQ presente en los sustratos proteicos. Finalmente, en la **macroautofagia** los sustratos son encerrados en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales se fusionan con el lisosoma, liberando su contenido para degradación y reciclaje (Klionsky, Petroni, et al., 2021; Papandreou & Tavernarakis, 2021; Rogov et al., 2014; Tekirdag & Cuervo, 2018).

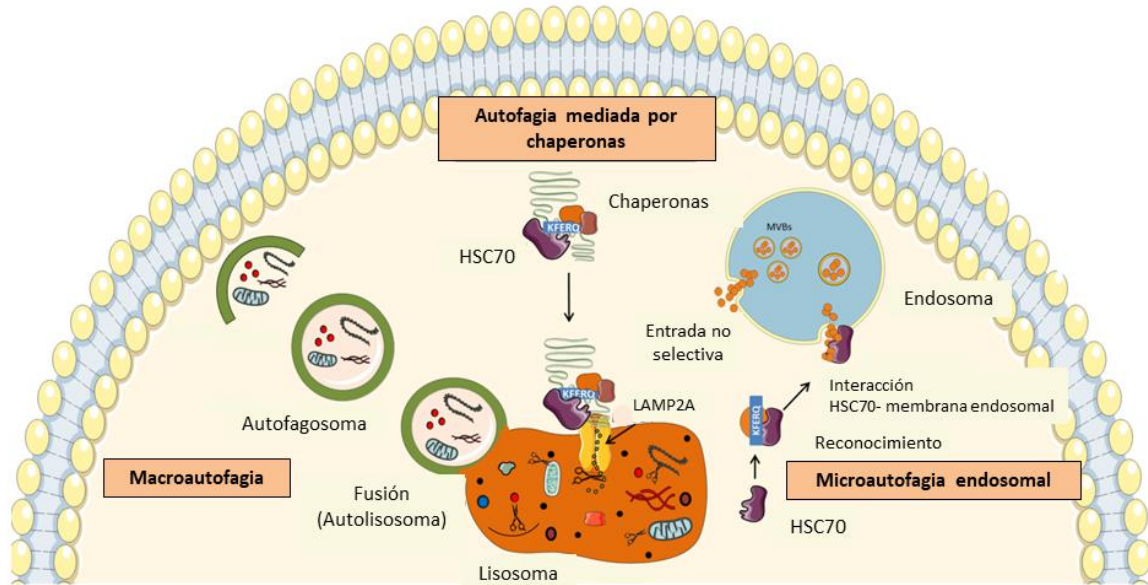


Figura 4. Tipos de autofagia. El proceso de autofagia utiliza distintas rutas para degradar en los lisosomas componentes celulares desde proteínas dañadas, organelos y patógenos. La macroautofagia transporta material citoplasmático hacia el lisosoma, mediante una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, la cual se fusiona con el lisosoma, liberando su contenido para degradación por diversas enzimas lisosomales. La autofagia mediada por chaperonas (CMA, por sus siglas en inglés) internaliza proteínas al interior del lisosoma tras el reconocimiento del motivo KFERQ en las proteínas blanco, por la proteína chaperona HSC70 seguida por la translocación de la proteína a través de la proteína LAMP2A. La microautofagia endosomal consiste en el engullimiento selectivo (mediado por el reconocimiento de HSC70 y el motivo KFERQ) o no selectivo de componentes proteicos en endosomas tardíos o en cuerpos multivesiculares.

Considerando que el presente trabajo se centra en la macroautofagia, en lo sucesivo se emplea el término autofagia para referirse a la macroautofagia.

Como ya se mencionó, el rasgo distintivo de la autofagia es la formación de autofagosomas que secuestran a los sustratos de esta vía. Los autofagosomas son vesículas de doble membrana y su tamaño varía entre 0.5 y 1.5 μm dependiendo de la señal inductora, el sustrato y el tipo celular (Rogov et al., 2014). La biogénesis del autofagosoma en mamíferos comienza en diversos sitios, frecuentemente en subdominios del retículo endoplásmico denominados "omegasomas" que son ricos en fosfatidil-inositol-3-fosfato (Melia et al., 2020). La posterior elongación de la doble membrana de los autofagosomas puede implicar la contribución de membrana proveniente de distintos puntos de la célula como el complejo de Golgi,

la membrana externa mitocondrial o la membrana plasmática (Gómez-Sánchez et al., 2021). La formación del autofagosoma es orquestada por un conjunto de proteínas ATG, las cuales interactúan entre sí y con otras macromoléculas en forma secuencial y selectiva propiciando la iniciación de la formación del autofagosoma, seguida por la elongación de su membrana y finalizando en su fusión con el lisosoma (Ambrosio & Majello, 2020a; Klionsky, Petroni, et al., 2021; Papandreou & Tavernarakis, 2021).

La inducción de la cascada autofágica (figura 5) está sujeta al control ejercido por el complejo 1 de MTOR (mTORC1). Este complejo molecular integra estímulos de varias rutas, propiciando su activación o inhibición, como, por ejemplo:

- 1) Activación de mTORC1 estimulada ya sea por factores de crecimiento, o ante la disminución en los niveles de ATP aunado a aumento de los niveles de AMP, o bien como consecuencia de la carencia de aminoácidos.
- 2) Inhibición de mTORC1 como consecuencia de daño al DNA, o ante una concentración excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en conjunto con una baja disponibilidad de oxígeno.

El complejo mTORC1 incluye a la cinasa de Serina/Treonina llamada mTOR, junto con otras subunidades reguladoras (Simon et al., 2017). Así, mediante fosforilación de las proteínas ULK1/2 y ATG13, mTORC1 ejerce un efecto inhibitorio de la autofagia. Las proteínas ULK1/2 y ATG13 forman parte de un complejo iniciador de la autofagia, el cual también incluye a las proteínas ATG101 y FIP200 (Simon et al., 2017). Ante situaciones de estrés como la generada por la carencia de aminoácidos, el complejo mTORC1 es inactivado, lo que propicia entre otras cosas la desfosforilación y liberación de ULK1. Enseguida ULK1/2 fosforila y activa a otras proteínas como FIP200, ATG13 y ATG14, siendo esta última quien recluta a la proteína Beclin1 (BECN1 o ATG6) (Papandreou & Tavernarakis, 2021; Simon et al., 2017). Estos eventos constituyen el inicio del proceso de formación de una estructura primordial llamada fagóforo, que posteriormente se convierte en el autofagosoma. Así, el reclutamiento de BECN1 al sitio de nucleación del fagóforo permite su asociación con las proteínas VPS34, VPS15, ATG14 y AMBRA1 formando un nuevo complejo multiproteico. Mediante la actividad cinasa de VPS34 (PI3KC3) se genera fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), el cual permite el reclutamiento de proteínas como ZFYVE1 y WIPI2 que

promueven la formación de una membrana de aislamiento (Ambrosio & Majello, 2020a; Klionsky, Petroni, et al., 2021; Simon et al., 2017). A su vez, WIPI2 favorece el reclutamiento de ATG12, que se une covalentemente a la proteína ATG5 mediante la acción de ATG3 y ATG10 por un mecanismo semejante a la ubiquitinación; ATG12-ATG5 forman un complejo con ATG16L1 que también es reclutado al fagóforo (Fracchiolla et al., 2020). Las proteínas de la familia LC3 (MAP1LC3, por ejemplo) son procesadas por la proteasa ATG4 que cataliza el corte de su extremo carboxilo terminal dando origen a la forma LC3-I. Esta última forma posteriormente es conjugada con fosfatidiletanolamina en la membrana del fagóforo, mediante un proceso tipo ubiquitinación catalizado por las proteínas ATG3 y ATG7, y con ayuda del complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 que actúa como tipo E3. La forma lipidada resultante es denominada LC3-II y contribuye a la formación y maduración del autofagosoma (Ambrosio & Majello, 2020a; Rogov et al., 2014; Simon et al., 2017). Durante su maduración, el autofagosoma es dirigido hacia el lisosoma, con la participación de proteínas ATG y del citoesqueleto. La fusión entre las membranas del autofagosoma y del lisosoma es promovida por proteínas SNARE como Sintaxina 17 (STX17) y la proteína asociada a sinaptosoma SNAP29 en el autofagosoma, así como por VAMP8 en el lisosoma. De este modo, en el autolisosoma resultante de tal fusión y con la acción de las hidrolasas ácidas presentes, se realiza la degradación de los sustratos secuestrados. El destino de los sustratos digeridos depende del estímulo autofágico. Por ejemplo, ante la falta de nutrientes, los residuos resultantes son transportados fuera del lisosoma para ser reciclados (Papandreou & Tavernarakis, 2021).

La selectividad de la autofagia requiere la participación de receptores que unen sustratos específicos con la membrana del autofagosoma. Los sustratos son reconocidos a través de determinantes moleculares como la presencia de regiones mal plegadas en proteínas, o la presencia de ubiquitinas conjugadas. Entre los receptores autofágicos identificados, se encuentra la proteína p62/SQSTM1, que posee un dominio UBA, mediante el cual se asocia con agregados proteicos poliubiquitinados y también posee un dominio LIR de unión a LC3, lo que permite dirigir los sustratos de degradación hacia LC3 localizado en la membrana de los fagóforos y así guiar su elongación alrededor del cargo para formar los autofagosomas (Rogov et al., 2014; Simon et al., 2017).

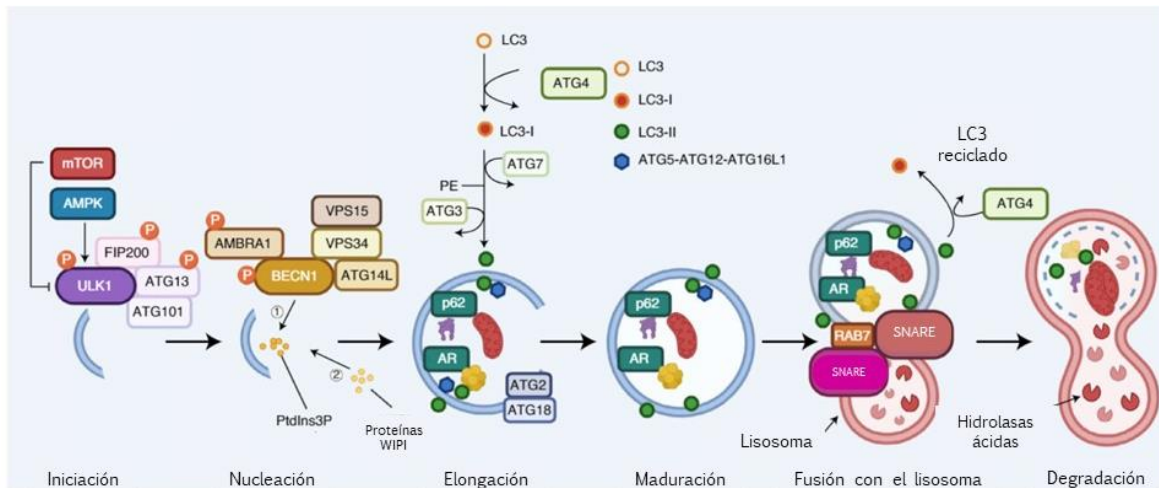


Figura 5. Maquinaria central de la autofagia (**modificado de Aman et al., 2021**). La descripción de la vía autofágica, se centra en la formación del autofagosoma que puede iniciar en distintos sitios pudiendo tener contribuciones de membrana del complejo de Golgi o de la membrana externa mitocondrial o bien de la membrana plasmática. El autofagosoma se elonga y rodea a los blancos que al final son degradados tras la fusión con el lisosoma. En forma general, el proceso de autofagia ocurre en las siguientes fases: 1. Iniciación, 2. Nucleación de proteínas en los sitios de formación del fagóforo, 3. Elongación de la membrana del fagóforo, 4. Maduración del autofagosoma, 5. Fusión con el lisosoma y 6. Proceso de degradación en el interior del lisosoma. AR= Receptor autofágico, por sus siglas en inglés.

1.6.- La autofagia contribuye a proteger el genoma.

En distintos modelos experimentales en los que se induce daño al DNA, simultáneamente se activa también la autofagia (figura 6). En respuesta a DSBs, la cinasa ATM es activada y reclutada a los sitios de daño, donde fosforila y activa a diversas proteínas relacionadas con la autofagia:

- LKB1 que promueve la inhibición de mTORC1, con lo cual se elimina el efecto inhibitorio sobre la autofagia (Prokhorova et al., 2020).
- AATF (*Apoptosis Antagonizing Transcription Factor*, también conocido como Che-1), que es una proteína de unión a la RNA polimerasa II, con lo cual incrementa la transcripción de Redd1 (también conocido como DDIT4 por *DNA damage inducible transcript 4*) y DEPTOR (*DEP domain containing mTOR interacting protein*), dos inhibidores de mTOR (Desantis et al., 2015), lo cual permite la activación de la autofagia.

- PTEN, el cual se acumula en el núcleo y a su vez activa a la cinasa AMPK (AMP-activated protein kinase), que puede fosforilar directamente a ULK, promoviendo la autofagia (Prokhorova et al., 2020).
- P53 es un factor transcripcional que puede encontrarse en el citosol y se transloca al núcleo como consecuencia del estrés genotóxico. En estas condiciones ATM también fosforila a p53 y promueve su estabilización (Ambrosio & Majello, 2020b), de modo que se favorecen los siguientes efectos: a) En el citosol, p53 se une a FIP200, reprimiendo su interacción con ULK1, ATG13 y ATG101, evitando así la formación de autofagosomas. Sin embargo, al translocarse al núcleo por el estrés genotóxico, se elimina su efecto inhibitor, favoreciendo la inducción de autofagia (Prokhorova et al., 2020). b) En el núcleo, p53 activa la transcripción de genes pro-autofágicos, incluyendo *uvrag*, *atg7*, *ulk1* y *ulk2* (Ambrosio & Majello, 2020b; Kenzelmann Broz et al., 2013), c) p53 activa la transcripción de algunos inhibidores de mTOR, como *igfl1*, *tsc2*, *pten* y a la subunidad beta1 de AMPK (J. H. Chen et al., 2015; Prokhorova et al., 2020).

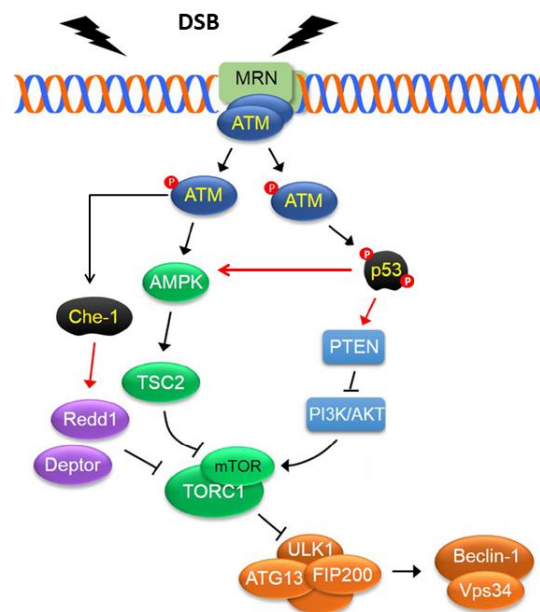


Figura 6. Representación de rutas que interconectan la respuesta de daño al DNA con la autofagia (modificado de Eliopoulos et al., 2016). Se muestran las principales rutas por las que la respuesta ante las DSBs, conducen a la inducción de la autofagia.

Es necesario aclarar que pueden existir otras rutas activadas como consecuencia del estrés genotóxico que además pueden inducir autofagia, sin embargo, no todas ellas han sido exploradas específicamente en el contexto de la inducción de DSBs.

De manera recíproca, la autofagia modula eventos y moléculas que tienen efecto sobre las maquinarias de reparación del DNA. Algunos trabajos en células de mamífero resaltan que, en células deficientes en autofagia se observan defectos en los procesos de reparación del DNA. Por ejemplo, al bloquear la expresión de FIP200 (proteína necesaria para la formación de autofagosomas) y luego de inducir daño al DNA evidenciado por la presencia de la histona γ H2AX, se observó una persistencia del daño y una reducción en la viabilidad de las células (Bae & Guan, 2011). Aunque no se exploró el mecanismo por el cual sucede esta susceptibilidad, en otros trabajos se ha identificado que, al inhibir la autofagia, las células acumulan a la proteína adaptadora p62/SQSTM1 en el núcleo. De este modo, durante el estrés genotóxico, p62/ SQSTM1 en el núcleo, interactúa tanto con RNF168 como con FLNA. En el primer caso, la interacción con RNF168 reduce la poliubiquitinación de histonas que a su vez evita el reclutamiento de proteínas de la maquinaria de reparación (Wang et al., 2016). La interacción con FLNA evita que reclute a RAD51 hacia los puntos de daño como parte de la reparación por recombinación homóloga. Más aún, la interacción con p62/ SQSTM1 promueve que tanto FLNA y RAD51 sean degradados por el proteasoma, propiciando que la reparación sea menos eficiente (Hewitt et al., 2016).

También se destaca que ante la generación de DSBs, la proteína BECN1 que participa en el proceso de formación de los autofagosomas, es reclutada a los sitios de daño donde interactúa con la TOP2B, promoviendo la reparación tanto por recombinación homóloga, como por unión de extremos no homólogos (F. Xu et al., 2017).

El papel de la autofagia protegiendo al genoma parece estar conservado en la evolución. Por ejemplo, en levaduras, la autofagia puede degradar a la forma acetilada de la proteína Sae2/RBBP8, una endonucleasa de DNA que participa en la resección necesaria para la reparación de DSBs (Hewitt & Korolchuk, 2017).

1.7.- Expulsión de material nuclear por fallas en la reparación del DNA.

La deficiencia en los procesos de reparación de las DSBs tiene como consecuencia la inestabilidad genómica y una de las manifestaciones de tal inestabilidad es la expulsión de material nuclear hacia el citoplasma, en forma independiente del núcleo principal (Blackford & Stucki, 2020; Miller et al., 2021). Por un lado, asociado con la senescencia celular, se ha descrito la expulsión de "fragmentos citoplasmáticos de cromatina" como consecuencia del estrés genotóxico y de otros inductores de senescencia (Ivanov et al., 2013; Miller et al., 2021). Estos fragmentos son expulsados a través de la membrana nuclear mediante un proceso de protrusión ocasionado por defectos en la integridad de la lámina nuclear. La caracterización de estos fragmentos a diferencia de los MiNu, indica que el DNA se encuentra en el citoplasma sin envoltura nuclear (Miller et al., 2021). Igualmente, asociado con el estrés genotóxico, la formación de MiNu implica la exclusión de material nuclear hacia el citoplasma. Sin embargo, en este caso, los MiNu, además de contener fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, también poseen distintos componentes de la envoltura nuclear. El tamaño de estas estructuras varía entre 1/40 hasta 1/3 con respecto al tamaño del núcleo principal. (Medvedeva et al., 2007; Miller et al., 2021).

El origen de los MiNu depende de la fase del ciclo celular en la que se presenten las fallas en la reparación de DSBs. Así, la persistencia de DSBs durante la mitosis, implica la fragmentación de cromosomas. Los fragmentos generados segregan aleatoriamente en las células hijas, pudiendo incluso quedar fuera del núcleo principal como un micronúcleo (Blackford & Stucki, 2020; Fenech et al., 2011). Mientras tanto, en células en interfase, la acumulación de DSBs conduce a la formación de brotes o protrusiones que al final son expulsados del núcleo principal en forma de MiNu (Kalsbeek & Golsteyn, 2017; Kisurina-Evgenieva et al., 2016; Medvedeva et al., 2007).

Dado que tanto los MiNu como los fragmentos citoplasmáticos de cromatina incluyen material genético anómalo (en calidad y/o en cantidad), esto representa una fuente de inestabilidad genómica. Esta inestabilidad puede ser consecuencia de que dicho material podría ser sujeto a procesos de replicación y/o transcripción,

fuera de los tiempos y condiciones normales de la célula en la que se encuentren (Hintzsche et al., 2017; Y. Huang et al., 2011; Terradas et al., 2010). Con respecto a las células que desarrollan MiNu, la muerte celular apoptótica es uno de los destinos inmediatos (Y. Huang et al., 2011; Utani et al., 2010). Se plantea que de este modo se evita la propagación de células con daño al DNA e inestabilidad genómica. Sin embargo, una importante proporción de células logran evadir la muerte celular y sobrevivir con MiNu en su citoplasma (Hintzsche et al., 2017; Y. Huang et al., 2011). Por lo anterior, es relevante entender y determinar cuál es el destino final de los MiNu en células que logran sobrevivir.

La persistencia de MiNu en la célula, a su vez puede propiciar la reincorporación del material genómico al núcleo principal de la célula. En células con capacidad proliferativa se ha observado que luego de la aparición de un micronúcleo y durante una siguiente ronda de división celular, los micronúcleos desaparecen y presuntamente son reincorporados al núcleo principal de una de las células hijas (Y. Huang et al., 2011). Esta reincorporación es responsable de la aparición de rearrreglos cromosómicos en la célula hija que heredó y reincorporó el micronúcleo a su núcleo principal (Utani et al., 2010; Ye et al., 2019).

Por lo anterior, cuando las células con micronúcleos logran sobrevivir, un punto de control importante para mitigar la inestabilidad genómica y/o evitar más alteraciones genómicas, es la eliminación de los micronúcleos. A este respecto se ha propuesto que la eliminación puede ocurrir mediante la extrusión fuera de la célula o bien por degradación tanto del material genómico como no genómico (Hintzsche et al., 2017).

Diversos trabajos se han enfocado en la degradación de MiNu, algunos de ellos describiendo su degradación mediante la vía autofágica.

1.8.- Nucleofagia

Nucleofagia es el término que se ha acuñado para referirse a la degradación de componentes del núcleo o incluso del núcleo completo mediante la vía autofágica. Este proceso se encuentra conservado evolutivamente y se presenta tanto en

levaduras como en mamíferos, en distintos contextos fisiológicos y patológicos (Papandreou & Tavernarakis, 2021).

Como se ha dicho, las células activan la autofagia para contender con distintos tipos de estrés. Para ello, una de las funciones de este proceso degradativo, en su modalidad de nucleofagia, es promover la supervivencia de las células mediante la eliminación de material nuclear expulsado al citoplasma, para tratar de restaurar la estabilidad genómica y prevenir daño al organismo por inflamación. Si los MiNu no son eliminados, eventualmente se daña la envoltura micronuclear exponiendo el DNA al citoplasma, que es detectado por cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*) que activa la vía STING del sistema inmune innato, lo cual genera inflamación (Kwon et al., 2020). De hecho, los fragmentos citoplásmicos de cromatina que desencadenan la senescencia también inducen inflamación por la vía cGAS-STING si no son eliminados (Dou et al., 2017). Las primeras evidencias experimentales sugirieron que la nucleofagia es necesaria para el proceso de reducción de la poliploidía en células cancerosas sometidas a estrés genotóxico intenso. En este caso se observó la presencia de vesículas de doble membrana, presumiblemente autofagosomas, que se ubicaron en posición cercana o rodeando invaginaciones de los núcleos multilobulados de las células poliploides (J. A. Erenpreisa et al., 2000). Una mejor caracterización de tales vesículas de doble membrana permitió identificar que algunas de ellas contenían a la enzima lisosomal Catepsina B (J. Erenpreisa et al., 2011).

Posteriormente y respecto al material nuclear que es expulsado hacia el citoplasma como consecuencia del estrés genotóxico, tanto en células cancerosas como en células senescentes, una proporción del material aberrante ha sido detectado en colocalización con proteínas de la maquinaria autofágica. Incluso, en el caso de las células senescentes se identificó la ubiquitinación de los denominados fragmentos citoplasmáticos de cromatina (Ivanov et al., 2013). Por su parte mediante colocalización con las proteínas p62/SQSTM1 y LC3 se sugiere la formación de autofagosomas rodeando tanto a fragmentos citoplasmáticos de cromatina, como a MiNu, que posteriormente son dirigidos a degradación lisosomal, evidenciada por la colocalización con la proteína LAMP2A presente en la membrana del lisosoma (Ivanov et al., 2013; Rello-Varona et al., 2012).

Para la etapa de degradación, además de proteasas, los lisosomas cuentan con ribonucleasas de la familia T2, con actividad óptima a pH entre 4 y 5 que cortan cadenas sencillas de RNA (Luhtala & Parker, 2010), así como con la endonucleasa DNAasa II que degrada DNA en forma óptima a pH entre 4.5 y 5.5 (Evans & Aguilera, 2003; Ohkouchi et al., 2013).

2.- Planteamiento del problema.

Con respecto a la nucleofagia, las observaciones experimentales apuntan a que el DNA que es expulsado del núcleo hacia el citoplasma es dirigido en autofagosomas hacia el lisosoma para su degradación. En estos autofagosomas, el DNA además puede ir acompañado de componentes variables además de la histona γ H2AX, marcador de daño al DNA, por lo cual es importante identificar dichos componentes. La acción del etopósido interrumpe el ciclo catalítico de las TOP2, propiciando la estabilidad y persistencia de los denominados "complejos de corte" conformados por TOP2 unida al DNA (conocidos en inglés como TOP2cc) (Vann et al., 2021). Hasta ahora se ha reportado que estos complejos de corte pueden ser removidos por acción del proteasoma o bien por acción de enzimas específicas que cortan al DNA (Atkin et al., 2019; Riccio et al., 2020). En este trabajo se propone que la autofagia también podría participar en la eliminación de estos complejos de corte, en forma similar a la degradación de complejos moleculares anómalos y persistentes resultantes del entrecruzamiento del DNA con algunas proteínas. Estos complejos moleculares se generan por la exposición a agentes como el formaldehído o la radiación UV (Mu et al., 2016).

Por otro lado, en células cancerosas que sobreviven a estrés genotóxico prolongado, se observa que, en etapas crónicas, algunos componentes del nucléolo son expulsados hacia el citoplasma, donde son rodeados por autofagosomas para su posterior eliminación en los lisosomas. Sin embargo, queda la posibilidad que esta expulsión del material nucleolar ocurra también en fases agudas del estrés genotóxico.

Finalmente, la participación de la nucleofagia en la degradación de MiNu se sustenta principalmente en modelos experimentales que emplean células cancerosas. Sin embargo, considerando la constante formación de DSBs incluso en condiciones fisiológicas mencionadas en la introducción, este proceso puede ser un mecanismo general para mantener la estabilidad genómica en células normales.

3.- Hipótesis.

La nucleofagia contribuye a mantener la integridad nuclear y la estabilidad genómica en células normales, a través de la degradación de material nuclear anómalo que se expulsa al citoplasma.

4.- Objetivos.

4.1.- Objetivo general:

Determinar si en condiciones de estrés genotóxico intenso, la nucleofagia es capaz de degradar material nuclear anómalo expulsado al citoplasma.

4.2.-Objetivos particulares

- Establecer un modelo de daño y reparación al DNA.
- Evaluar si como consecuencia de la generación múltiples DSBs en células de mamífero no tumorales,
 - a) Se induce la formación de protuberancias nucleares y MiNu.
 - b) Se induce la nucleofagia.
- Determinar si la inhibición de la vía autofágica conduce a deficiencias en la reparación del DNA y a una acumulación de protuberancias nucleares y MiNu.
- Identificar componentes nucleares presentes en las protuberancias nucleares y MiNu y que sean blanco de degradación de la vía nucleofágica.

5.- Estrategia experimental.

5.1 Inducción de daño al DNA.

Se eligió trabajar con cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón como modelo de células no tumorales. Asimismo, se evaluó un tipo particular de daño en el DNA, optando por las DSBs. Como se muestra en la figura 7, se estableció una dosis subletal de etopósido que permita evaluar el daño en el DNA, su reparación, así como el involucramiento de la autofagia. Para inducir daño en el DNA se encontró que es suficiente tratar a las células con etopósido 120 μ M durante 2 horas. La reparación de las DSBs fue monitoreada hasta 5 horas posteriores a que se retiró el etopósido. Una vez establecidas las fases de daño y reparación en el DNA, se evaluó el posible involucramiento de la maquinaria autofágica en el proceso de reparación y en el mantenimiento de la estabilidad genómica a través de la degradación de material nuclear anómalo.

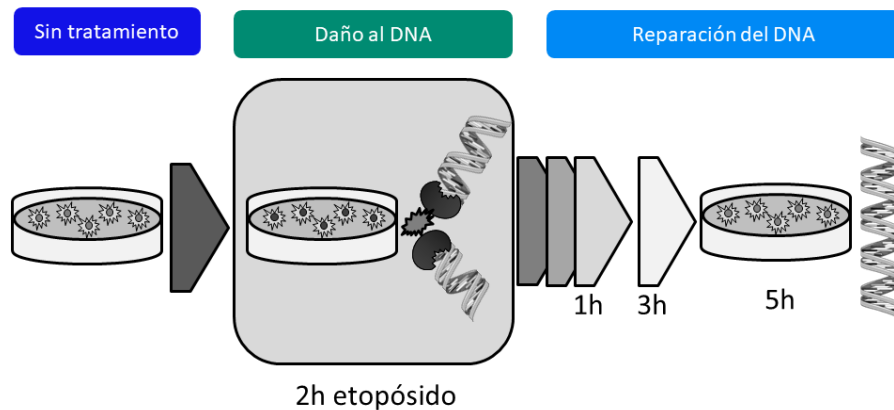


Figura 7. Esquema de trabajo establecido para evaluar el daño al DNA, su reparación y la interrelación con la maquinaria autofágica para mantener la estabilidad genómica.

5.1.1 Cultivo celular.

Se trabajó con fibroblastos embrionarios de ratón (MEF por sus siglas en inglés) obtenidos de ratones silvestres de la cepa CD1 o bien de ratones transgénicos que expresan la proteína GFP-LC3 de manera ubicua en la cepa C57BL/6J (Mizushima et

al., 2004). Los fibroblastos fueron aislados de embriones en las etapas E13.5 siguiendo el protocolo estándar previamente reportado (J. Xu, 2005).

Una vez aislados, los MEFs fueron cultivados en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX™ (DMEM+Glutamax™)* suplementado con 10% de Suero fetal bovino y con una mezcla de antibióticos de Penicilina/Estreptavidina a 100 U/mL. El medio y los suplementos fueron adquiridos de la marca GIBCO® *Life Technologies™, Grand Island, NY, USA*.

Las condiciones de cultivo consistieron en temperatura de 37°C, CO₂ al 5%, O₂ atmosférico. Se trabajó con cultivos celulares que alcanzaron aproximadamente entre un 70 y 80% de confluencia.

5.2. Evaluación y monitoreo del daño en el DNA.

Se implementó el ensayo cometa para monitoreo de las DSBs y su reparación. Este ensayo consiste en una electroforesis en gel del genoma de células individuales. Brevemente consiste en colocar células (tratadas o no con agentes que dañan el DNA) en una matriz sólida (agarosa), para posteriormente someterlas a lisis controlada, de modo que se eliminen los componentes citoplásmicos, dejando el DNA nuclear aislado. El DNA es sometido a electroforesis y a tinción con un colorante fluorescente de DNA. De este modo, al observar al microscopio se observa el DNA no dañado y agrupado en un nucleoide principal, mientras que, en caso de existir cadenas sueltas de DNA derivadas de una ruptura, estas migran alejándose del nucleoide principal, adoptando una figura en forma de cometa.

5.2.1.- Ensayo cometa.

Soluciones y reactivos:

- Solución de lisis:
 - 0.03 M de EDTA
 - 1% de SDS.

- Solución de desenrollamiento y electroforesis.

- 60 mM de Tris.
- 90 mM de ácido acético.
- 2.5 mM de EDTA
- Ajustar pH a 9.0

- Solución de neutralización:
 - 500 mM de Tris-HCl.
 - Ajustar pH a 7.5.

- Solución de tinción de DNA para ensayo cometa.
 - Solución de SYBR Green diluyendo el stock 1:10,000 en PBS.
 - Solución stock: *SYBR™ green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Eugene, OR, USA)*, concentración 10,000X.

Procedimiento.

- Resuspender las células en PBS a una densidad de 1×10^3 células/ μL .
- Mezclar las células en proporción volumen a volumen de 1:5, con una solución de 0.75% de agarosa de bajo punto de fusión, fundida y mantenida a 37°C.
- Tomar un volumen entre 50 y 100 μL de la mezcla anterior y colocarlo en un portaobjetos previamente cubierto con una capa solidificada de agarosa de punto de fusión normal al 1%.
- Colocar un cubreobjetos sobre la mezcla para dispersarla sobre el portaobjetos.
- Colocar el portaobjetos con la mezcla dispersada a 4°C durante 2 minutos.
- Incubar el portaobjetos con la mezcla dispersada durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Remover mediante deslizamiento, el cubreobjetos previamente colocado sobre la mezcla dispersada.
- Cubrir el portaobjetos que tiene la mezcla dispersada y solidificada, con una solución de lisis previamente mantenida a 4°C.
- Incubar durante 60 minutos el portaobjetos con la solución de lisis y protegido de la luz.

- Retirar la solución de lisis y aplicar solución de desenrollamiento para retirar los residuos de la solución de lisis.
- Cubrir el portaobjetos con solución de desenrollamiento e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos y protegido de la luz.
- Colocar el portaobjetos sumergido en solución de desenrollamiento en una cámara de electroforesis.
- Someter el cubreobjetos a electroforesis durante 20 minutos aplicando 25 voltios.
- Retirar residuos de la solución de desenrollamiento, empleando solución de neutralización.
- Cubrir el portaobjetos con solución de neutralización e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y cubierto de la luz.
- Retirar la solución de neutralización y repetir la incubación 2 veces más de la misma forma que el paso anterior.
- Retirar la solución de neutralización y aplicar PBS para retirar el exceso de solución de neutralización.
- Cubrir el portaobjetos con solución de tinción de DNA para ensayo cometa, e incubar durante 15 minutos y cubierto de la luz.
- Retirar el exceso de la solución anterior y observar al microscopio.

5.3. Evaluación y monitoreo intracelular de proteínas.

Para monitorear la localización de proteínas durante las fases de daño y reparación del DNA se utilizó la inmunodetección en conjunto con distintas técnicas de microscopía. Para ello se emplearon anticuerpos primarios contra las proteínas de la maquinaria autofágica, así como para marcador de daño al DNA, la histona γ H2AX, las TOP2 y el componente nucleolar Fibrilarina. Los anticuerpos primarios y secundarios se indican en la tabla 1 (sección **11.1** de anexos). Adicionalmente se emplearon tinciones fluorescentes específicas para la detección de autofagosomas (*Cyto-ID®*) y vesículas ácidas (*Lysotracker®*).

Adicionalmente, para evaluar las vesículas autofágicas, se utilizaron MEF obtenidos de ratón transgénico que expresan la proteína GFP-LC3 de manera ubicua.

Para las observaciones microscópicas se emplearon las técnicas de: microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal, microscopía de super-resolución, microscopía electrónica de transmisión.

5.3.1.- Inmunofluorescencia.

Soluciones y reactivos.

- Solución fijadora para inmunofluorescencia en células.
 - 4% paraformaldehído en PBS.

- Solución de permeabilización para inmunofluorescencia en células.
 - 0.5 % Tritón en PBS.

- Solución de bloqueo para inmunofluorescencia en células.
 - 4% albúmina sérica bovina en PBS.

- Solución para dilución de anticuerpos.
 - 2 % albúmina sérica bovina en PBS.

- Solución de tinción de núcleos para inmunofluorescencia en células.
 - DAPI 1 µg/mL en PBS.

- Los anticuerpos utilizados se presentan en la tabla 1 (sección **11.1** de anexos).

Procedimiento:

- Colocar cubreobjetos circulares limpios, estériles y libres de residuos grasos sobre cada pozo de una caja con 12 pozos (superficie de cada pozo es de 3.8 cm²).
- Sembrar 2.5x10⁴ células por pozo e incubar durante 24 horas.

- Una vez que se han aplicado los tratamientos correspondientes, proceder a retirar los cubreobjetos con las células tratadas y colocarlos en una superficie plana, con las células expuestas hacia arriba.
- Inmediatamente aplicar solución fijadora de paraformaldehído, cubriendo toda la superficie del cubreobjetos con las células.
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Retirar la solución fijadora y aplicar PBS para retirar los residuos de la solución fijadora.
- Aplicar solución de permeabilización sobre el cubreobjetos con las células, e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y cubierto de la luz.
- Retirar la solución de permeabilización, aplicando PBS para retirar los residuos de la solución anterior.
- Aplicar solución de bloqueo para inmunofluorescencia sobre el cubreobjetos con las células e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y cubierto de la luz.
- Retirar la solución de bloqueo y aplicar PBS para retirar residuos de la solución de bloqueo.
- Aplicar la suspensión de anticuerpos primarios sobre el cubreobjetos con las células e incubar a 4°C durante al menos 12 horas y protegidos de la luz.
- Retirar la suspensión de anticuerpos primarios y aplicar PBS para retirar los residuos de la suspensión.
- Aplicar la suspensión de anticuerpos secundarios sobre el cubreobjetos con las células e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora y protegidos de la luz.
- Aplicar solución de tinción de núcleos sobre el cubreobjetos con las células e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.

5.3.2.- Western Blot.

Soluciones y reactivos:

- Solución de lisis celular.
- 62.5 mM de Tris-HCl (con pH ajustado a 6.5).

- 2% de SDS.
- 2 mg/mL de inhibidor de proteasas (*Complete, ROCHE MOLECULAR DIAGNOSTICS, Pleasanton CA, USA*).
- Solución TBST.
 - 50 mM de Tris (con pH de 7.6)
 - 150 mM de NaCl
 - 0.1% de Tween.
- Solución de bloqueo para WB.
 - TBST
- Solución de bloqueo
 - 3 % de leche deshidratada y descremada (BioRad Cat # 170-6404)

Procedimiento:

- A partir de las células concentradas en un botón celular, proceder a adicionar solución de lisis celular. Para botones celulares con aproximadamente 1×10^6 células, adicionar 60 μ L de solución de lisis.
- Resuspender el botón celular con la solución de lisis.
- Someter a sonicación la suspensión celular.
- A partir de la suspensión obtenida, someter una cantidad entre 30 y 120 μ g de proteínas totales a separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE por sus siglas en inglés).
- Someter el gel de poliacrilamida con las proteínas separadas a proceso de transferencia a una membrana de PVDF previamente activada en metanol.
- Sumergir la membrana de PVDF con las proteínas transferidas, en solución de bloqueo.
- Agitar la membrana de PVDF sumergida en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Retirar la solución de bloqueo y aplicar 3 lavados de la membrana, sumergiéndola en solución de TBST y con agitación durante 5 minutos.
- Sumergir la membrana bloqueada en una solución con el anticuerpo primario. Para prepara la suspensión de anticuerpos, emplear solución de TBST adicionada con 2% de albúmina sérica bovina.
- Incubar en agitación la membrana con la suspensión de anticuerpo primario a 4°C y durante al menos 12 horas.
- Retirar la suspensión de anticuerpo primario (guardar a 4°C para su re-uso) y aplicar 3 lavados de la membrana empleando solución de TBST en agitación durante 5 minutos.
- Sumergir la membrana en una suspensión con el anticuerpo secundario acoplado a señal fluorescente. (Para prepara la suspensión de anticuerpos, emplear solución de TBST) e incubar en agitación a temperatura ambiente y durante 1 hora.
- Retirar la suspensión de anticuerpo secundario y aplicar 3 lavados de la membrana empleando solución de TBST en agitación durante 5 minutos.
- Revelar la señal fluorescente acoplada al anticuerpo secundario empleando el equipo ***Odyssey® IR scanner*** conjuntamente con software ***Odyssey® Image Studio software 5.2.5 (LI-COR, Lincoln, NE, USA)***.

5.3.3.- Inmunodetección con partículas de oro mediante microscopía electrónica de transmisión (inmunogold).

a) Preparación de células para microscopía electrónica de transmisión.

Soluciones y reactivos:

- Solución fijadora.
 - Glutaraldehído al 3% en agua destilada.
- Soluciones de etanol
 - Etanol a 40, 50, 60, 70, 80, 90 en agua destilada.

- Resina LR White.

Procedimiento:

- Concentrar las células en un botón, mediante centrifugación.
- Someter las células a fijación con glutaraldehído al 3%.
- Aplicar proceso de deshidratación sumergiendo el botón celular durante 1 hora en cada una de las soluciones con concentración creciente de alcohol etílico, pasando por 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%.
- Embeber a las células en resina LR White y permitir la polimerización incubando a 50°C durante 12 horas.
- Proceder al corte del botón celular embebido en la resina polimerizada, obteniendo secciones de entre 70 y 80 nm usando un *26 Ultracut-Recheirt-Jungy*.
- Colocar los cortes obtenidos en rejillas de níquel.

b) Inmunogold

Soluciones y reactivos:

- Solución de lavado.
 - 0.005% Tween 20 en PBS.
- Solución de bloqueo.
 - 50 mM glicina,
 - 0.005% Tween 20
 - 0.01% Triton X-100
 - 0.1% BSA
 - Diluyente: PBS
- Solución de fijación
 - Glutaraldehído al 2% en PBS.

- Solución de contraste.
 - Acetato de uranilo al 2% en agua destilada.

Para la observación de las muestras se empleó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 EXII.

Procedimiento:

- Proceder a sumergir momentáneamente la rejilla con el corte obtenido del botón celular, en agua desionizada. Repetir esta operación una vez más.
- Proceder a sumergir momentáneamente la rejilla con el corte obtenido del botón celular, en solución de lavado. Repetir esta operación una vez más.
- Aplicar solución de bloqueo sobre la rejilla, e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Aplicar la suspensión de anticuerpos primarios sobre la rejilla, e incubar durante 24 horas a 4°C en cámara húmeda (los anticuerpos y diluciones se indican en la tabla 1).
- Retirar la suspensión de anticuerpos primarios
- Sumergir momentáneamente la rejilla en solución de lavado. Repetir esta operación dos veces más.
- Aplicar la suspensión de anticuerpos secundarios sobre la rejilla, e incubar durante al menos 12 horas a 4°C en cámara húmeda. Los anticuerpos y diluciones se indican en la tabla 1.
- Retirar la suspensión de anticuerpos secundarios.
- Sumergir momentáneamente la rejilla en solución de lavado. Repetir esta operación dos veces más.
- Aplicar solución de fijación 2 sobre la rejilla, e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
- Retirar la solución de fijación 2.
- Aplicar agua destilada sobre la rejilla e incubar durante 5 minutos. Repetir esta operación una vez más.
- Aplicar solución de contraste.
- Sumergir momentáneamente las rejillas en agua destilada.
- Dejar secar las rejillas.
- Proceder a la observación en el microscopio electrónico de transmisión.

5.3.4.- Microscopía de superresolución.

Se trabaja con las muestras preparadas para inmunofluorescencia. El proceso general consiste en adquirir imágenes con un microscopio Nanoimager-S (*Oxford Nanoimaging Ltd*) y utilizando excitación de fluorescencia WF. Las muestras se excitan alternando el láser de iluminación con las líneas de láser de 405 (DAPI), 473 (*Alexa Fluor A488*, GFP) y 561 (*Alexa Fluor A594*). La detección de la señal se realiza con un objetivo de inmersión en aceite 100X con 1.4 de apertura numérica (Olympus) y con un sCMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 V3 empleando un splitter de imagen embebido para la adquisición de canales duales de fluorescencia. El tiempo de imagen es de 33 ms, con un tamaño efectivo de pixel en el plano objetivo de 117 nm. Las imágenes de sub-fracción se obtienen mediante SRRF, un abordaje de microscopía de superresolución de múltiples cuadros, el cual reúne la información nanoscópica del análisis estadístico de secuencias de imágenes colectadas en el mismo plano de imagen [<https://www.nature.com/articles/ncomms12471>]. Cada imagen de superresolución se deriva del análisis del apilamiento serial de 100 imágenes colectadas por cada canal de excitación de fluorescencia. Cada apilamiento serial se corrige y analiza utilizando las aplicaciones NanoJcore y Nano-SRRF de FIJI/Image J [<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6463/ab0261>]. Los parámetros para computar SRRF son: radio de anillo 0.5, magnificación radial 10, ejes en anillo 8 parámetros, análisis temporal: AVG. Los demás parámetros se ajustan de acuerdo con valores predeterminados recomendados [<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6463/ab0261>].

5.4. Bloqueo del flujo autofágico.

Para evaluar el efecto del bloqueo de la autofagia sobre la estabilidad genómica, se emplearon distintos sistemas.

- Spautin-1, el cual inhibe la desubiquitinación de la proteína BECN1, propiciando que sea degradada mediante proteasoma, evitando de este modo la formación de autofagosomas (Liu et al., 2011).

- siRNA contra *Atg7*, proteína requerida para la elongación de autofagosomas (Simon et al., 2017)). Para ello se realizó transfección empleando el reactivo Lipofectamina 2000®.
- Se emplearon MEF *Atg4b*^{-/-} carentes de la proteína ATG4B, la cual es necesaria para el procesamiento de LC3, que genera la forma LC3-I, la cual a su vez es lipidada con fosfatidiletanolamina para su incorporación en la membrana de los fagóforos, para la formación de autofagosomas.

5.4.1.- Transfección de siRNA.

Se empleó *SMARTpool siRNA ATG7-FITC* de Dharmacon (*Lafayette, CO, USA*). Las células fueron transfectadas empleando Lipofectamina 2000®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se siguieron los pasos que se describen a continuación.

Soluciones y reactivos:

- Medio de cultivo *DMEM+Glutamax*TM
- Medio de cultivo *Optimem*®
- *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*).
- *SMARTpool siRNA ATG7-FITC* de *Dharmacon (Lafayette, CO, USA)*.

Procedimiento:

- En una superficie de 3.8 cm² (superficie de cada pozo en cajas con 12 pozos), sembrar 5x10⁴ células con medio de cultivo libre de antibióticos.
- Ajustar el volumen de medio de cultivo a 500 µL.
- Preparar una mezcla con siRNA 20 pmol y con 3 µL de Lipofectamina, en un volumen de 100 µL con medio Optimem®.
- Adicionar la mezcla anterior a las células mezclando levemente con el medio de cultivo.
- Incubar durante 6 horas.
- Adicionar 400 µL medio de cultivo libre de antibióticos y continuar el cultivo por 48 horas más.

6.- Resultados.

Para estudiar si la nucleofagia contribuye a mantener la integridad nuclear y la estabilidad genómica en células normales, se estableció el modelo descrito en la figura 7, que permitió evaluar el daño en el DNA, su reparación, así como el involucramiento de la autofagia.

6.1 Establecimiento del modelo de daño y reparación del DNA en fibroblastos

Para reducir al mínimo la generación simultánea de distintos tipos de daño en el genoma, se optó por someter a las células a tratamiento con etopósido, que como se ha mencionado, afecta la estabilidad y funcionamiento de las TOP2, generando DSB. Se inició por establecer una curva de tratamientos con etopósido en cultivos primarios de MEF y se encontró que con un tratamiento de 120 μM durante 2 horas se mantienen vivas más del 85% de las células, y esa viabilidad se mantiene durante 5 horas después de retirar el Etopósido (Figura 8A).

Mediante ensayo cometa se evaluó la inducción del daño genómico, midiendo la longitud del DNA desenrollado (longitud de los cometas) que resulta de la ruptura del DNA (figuras 8B y 8C). De este modo, en células sin tratamiento se obtuvo una longitud promedio de $39.54 \pm 7.594 \mu\text{m}$, mientras que a las 2 horas de tratamiento con etopósido las longitudes se incrementan a $122.8 \pm 22.08 \mu\text{m}$. Una vez que se retira el etopósido se observa una reparación gradual de la integridad del DNA, de modo que luego de 3 horas la longitud promedio es de $107.9 \pm 8.894 \mu\text{m}$; y a las 5 horas esta longitud de $48.33 \pm 8.994 \mu\text{m}$.

En resumen, el DNA se rompe con dos horas de tratamiento con Etopósido 120 μM , y se repara después de 5 horas de retirar el etopósido, mostrando una integridad de DNA comparable a las células sin tratar.

Para observar la respuesta de las células al daño en el DNA se monitoreó la presencia de γH2AX mediante inmunofluorescencia (figura 8D y 8E). Se observó una cinética similar de aparición y desaparición de la histona γH2AX . A este respecto, a partir de las imágenes obtenidas, se determinó la intensidad de la señal fluorescente

observada para la histona γ H2AX obteniéndose en promedio una intensidad de 675.3 ± 569.3 unidades arbitrarias de fluorescencia para MEF control que no fueron sometidos a tratamiento con etopósido (figura 8E). Esta intensidad de fluorescencia se incrementó luego de 2 horas de daño con etopósido a un promedio de $15,002 \pm 6,223$ unidades arbitrarias de fluorescencia para finalmente disminuir nuevamente a $4,635 \pm 3,367$ unidades arbitrarias de fluorescencia en la etapa de reparación luego de 5 horas de que se retiró el etopósido (figura 8E).

Así, en este modelo se estableció una cinética con una etapa de daño a las 2 horas de tratamiento con etopósido, seguida de una etapa de reparación gradual hasta las 5 horas posteriores al retiro del agente de daño. Por lo anterior, se decidió aplicar este modelo experimental con MEF para las demás evaluaciones del presente trabajo.

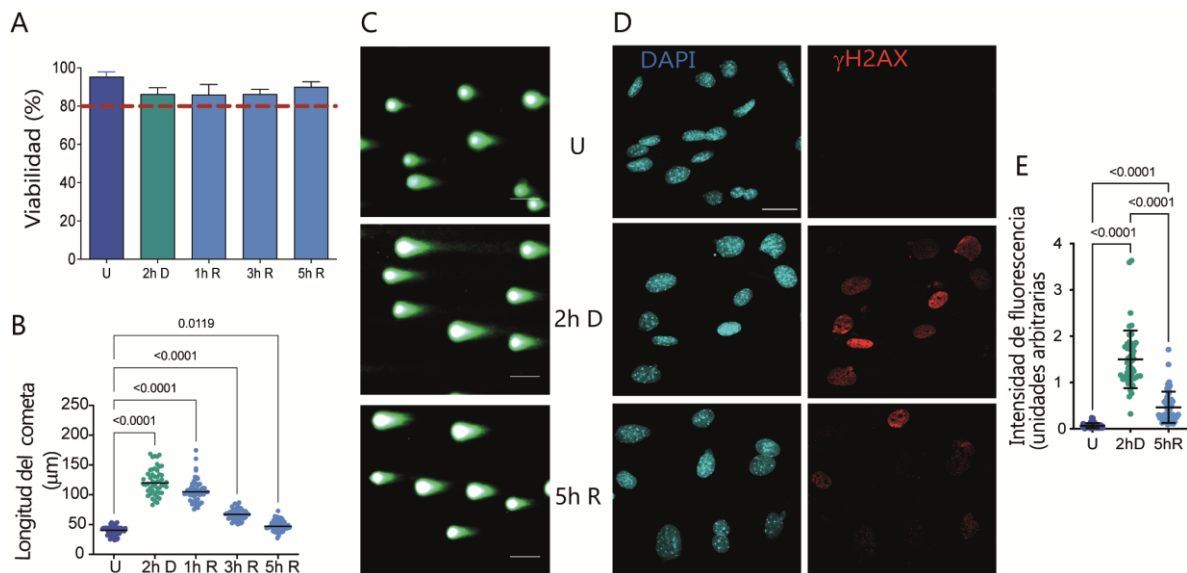


Figura 8. Modelo para estudiar daño y reparación al DNA en MEFs. Los MEFs fueron tratados con etopósido $120 \mu\text{M}$ durante 2 horas, se retiró el etopósido y se analizaron las células a los tiempos indicados. **A.** Gráfica del porcentaje de células vivas determinado en células no tratadas (U) o tratadas con etopósido (2h D) y en la fase de reparación a distintos tiempos. La muerte celular se determinó por exclusión de azul de tripano. La línea roja corresponde al 80 % de las células. **B.** Cuantificación del grado de daño al DNA mediante ensayo cometa. El daño se midió determinando la longitud de los cometas en imágenes de epifluorescencia. Se grafican las mediciones promedio de intensidad de fluorescencia en cada punto de tiempo. * $p < 0.01$ tras aplicación de prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de comparación múltiple de Dunn. Se midieron al menos 50 cometas en cada uno de tres experimentos independientes. **C.** Imágenes de ensayo cometa, con la señal fluorescente de Sybr Green® para el DNA obtenido de las células no tratadas (U), con 2 horas de exposición a Etopósido

(2h D) y 5 horas después de retirar el etopósido (5h R). Las barras de escala equivalen a 100 μm . **D.** Inmunodetección de la histona γH2AX (rojo) en células no tratadas (U), durante la etapa de daño (2h D) y en la etapa de reparación (5h R). Los núcleos aparecen marcados con la señal para DAPI. La barra de escala equivale a 30 μm . **E.** Gráfica correspondiente a la intensidad de fluorescencia (medida en unidades arbitrarias), determinada mediante imágenes obtenidas por microscopía confocal de los experimentos mostrados en B. Se determinó la fluorescencia en 48 células por cada uno de tres experimentos independientes.

6.2 El estrés genotóxico propicia la formación basal de alteraciones nucleares que se incrementan por el estrés genotóxico.

Dado que la presencia de múltiples rupturas de doble cadena en el DNA es un factor que conduce a la expulsión de material nuclear hacia el citoplasma, se procedió a evaluar la estructura nuclear de las células sometidas al tratamiento con Etopósido determinado anteriormente. Para identificar protuberancias en la envoltura nuclear y MiNu, mediante imágenes de microscopía confocal, se analizó la señal correspondiente a los núcleos de las células (teñidos con DAPI); para determinar si las células respondieron al daño al DNA se detectó la histona γH2AX . Se detectó la presencia de células con núcleos que desarrollaron protrusiones, así como células con señal de DAPI en cuerpos independientes en el citoplasma sugiriendo que se trataba de MiNu (Figura 9A). Colectivamente se denominó como "alteraciones nucleares" tanto a las protrusiones como a los MiNu. Además, es necesario resaltar que, estas alteraciones nucleares presentaron una señal enriquecida correspondiente a la histona γH2AX , sugiriendo una selectividad en el material genómico expulsado del núcleo. Se procedió a cuantificar la cantidad de células con protrusiones nucleares y con MiNu durante las fases de daño y reparación, así como en células control sin tratamiento. De manera sorprendente, las protrusiones nucleares fueron identificadas incluso en un 15.09 ± 3.194 % de células que no fueron tratadas con etopósido, sin embargo, la frecuencia de éstas se incrementó significativamente en la fase de daño a un 19.43 ± 7.517 % de células tratadas con etopósido y continuaron formándose protuberancias incluso durante la etapa de reparación del DNA, alcanzando 28.37 ± 9.057 % de células a las 5 horas en la etapa de reparación (figura 9B). También se encontraron células sin tratamiento que poseen MiNu, y nuevamente el porcentaje de células con MiNu incrementó en respuesta a la

formación de DSBs, pasando de $5.096 \pm 2.75 \%$ en el control a $9.207\% \pm 3.46 \%$ en las tratadas con etopósido. Pero después de la reparación del DNA se observó que la frecuencia vuelve a disminuir a $5.98\% \pm 4.63 \%$ (figura 9C). Esta reducción en la frecuencia de MiNu sugiere que este material anómalo es constantemente removido en la etapa de reparación del DNA.

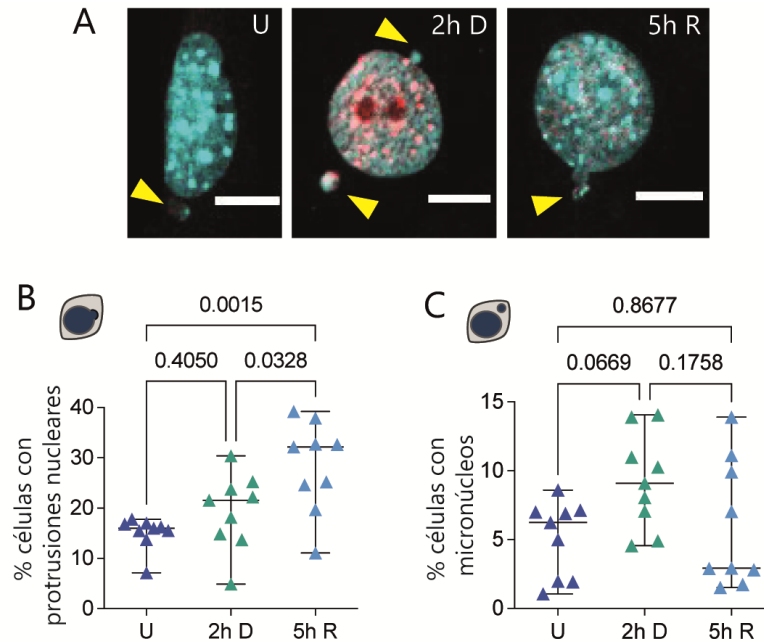


Figura 9. Hay una formación basal de alteraciones nucleares que se incrementan por el estrés genotóxico. A. Protrusiones nucleares y MiNu señalados por flechas amarillas, observados en MEF no tratados (U), o en la etapa de daño con etopósido $120 \mu\text{M}$ (2h D) y después de reparación del DNA (5h R). El DNA dañado marcado por la histona γH2AX (en rojo) fue detectado tanto en protrusiones como en MiNu de las células dañadas. El DNA fue teñido con DAPI. Las escalas de barra corresponden a $10 \mu\text{m}$. **B.** Gráfica de la cuantificación del porcentaje de células con protrusiones en células no tratadas (U) o en las etapas de daño (2h D) y reparación (5h R). **C.** Gráfica de la cuantificación del porcentaje de células con MiNu en células no tratadas (U) o en las etapas de daño (2h D) y reparación (5h R). Las gráficas representan el promedio de nueve experimentos. Para cada experimento (representado como triángulos) se contaron al menos 50 células. Las diferencias significativas se calcularon mediante ANOVA de una vía seguida por prueba de Mann Whitney. Los valores de P son indicados para la comparación con las células no tratadas con etopósido (U).

Dado que se ha establecido que los MiNu contienen material nuclear rodeado por su propia envoltura micronuclear, para definir su naturaleza se analizó la presencia de las láminas nucleares que forman parte la envoltura nuclear. Resultó interesante

observar que efectivamente encontramos DNA (teñido con DAPI) en el citoplasma rodeado de envoltura micronuclear, sin embargo, algunas fueron acompañadas de la lámina A/C, mientras que otras poseían Lámina B1 (figura 10). Esto implica que, en el caso de los MiNu, el material genómico se encuentra aislado del ambiente citoplasmático, lo que permite su persistencia en las células y por tanto no puede ser eliminado directamente por degradación de nucleasas presentes en el citoplasma.

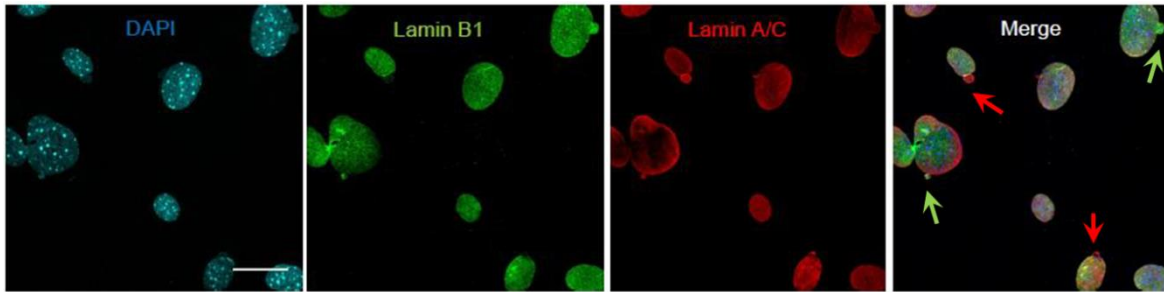


Figura 10. Las alteraciones nucleares contienen elementos de la lámina nuclear, indicando que son MiNu. Inmunodetección de la Lámina A/C (en rojo) y Lámina B1 (en verde), en MEF tratados durante 2 h con 120 μ M de etopósido (2h D). La flecha verde apunta a protrusiones que contienen Lámina B1, mientras que las flechas rojas señalan protrusiones que contienen la Lámina A/C. La barra de escala equivale a 30 μ m.

6.3 La autofagia es necesaria para la formación de protrusiones nucleares y para la remoción de MiNu en fibroblastos primarios.

Dado que las protrusiones nucleares y los MiNu son indicativos de inestabilidad genómica, las células cuentan con diversos mecanismos para eliminar estas alteraciones. Como se ha mencionado antes, la nucleofagia ha sido identificada como un mecanismo de eliminación de MiNu en células cancerosas (J. Erenpreisa et al., 2011; Rello-Varona et al., 2012). En consecuencia, en este trabajo se planteó la hipótesis de que en células no cancerosas la nucleofagia también contribuye con la eliminación de las alteraciones nucleares.

Entonces, se realizó un primer abordaje para determinar si habría autofagosomas y autolisosomas asociados con las alteraciones nucleares, para lo cual se aplicaron tinciones específicas: *Cyto-ID®* para autofagosomas y *Lysotracker®* para vesículas ácidas como los lisosomas. En la figura 11A, se observan múltiples autofagosomas

perinucleares, así como vesículas ácidas. En algunos casos, también se observaron vesículas con doble tinción, lo que indica que dichas vesículas son autolisosomas, indicando que el flujo de la autofagia funciona. Adicionalmente se pudo distinguir la presencia de vesículas ácidas asociada con una protrusión nuclear (positiva para Hoechst), lo cual sugiere que dicho material que es expulsado del núcleo se encuentra en proceso de degradación.

Además, también se analizó la distribución de la proteína LC3, que ante la inducción de la autofagia cambia de un patrón homogéneo a una distribución concentrada en puntos correspondientes a los autofagosomas (Klionsky, Abdel-Aziz, et al., 2021). Así, al utilizar MEF obtenidos de ratón transgénico que expresan la proteína GFP-LC3 de manera ubicua, es posible observar la aparición de autofagosomas como múltiples puntos brillantes. En la figura 11B, se resalta la aparición de una vesícula pequeña con DNA (teñida con DAPI) durante la fase de daño, junto con el marcador de daño al DNA (γ H2AX) y simultáneamente con señal de GFP-LC3, sugiriendo que se trata de un autofagosoma que contiene material nuclear dañado que fue expulsado al citoplasma.

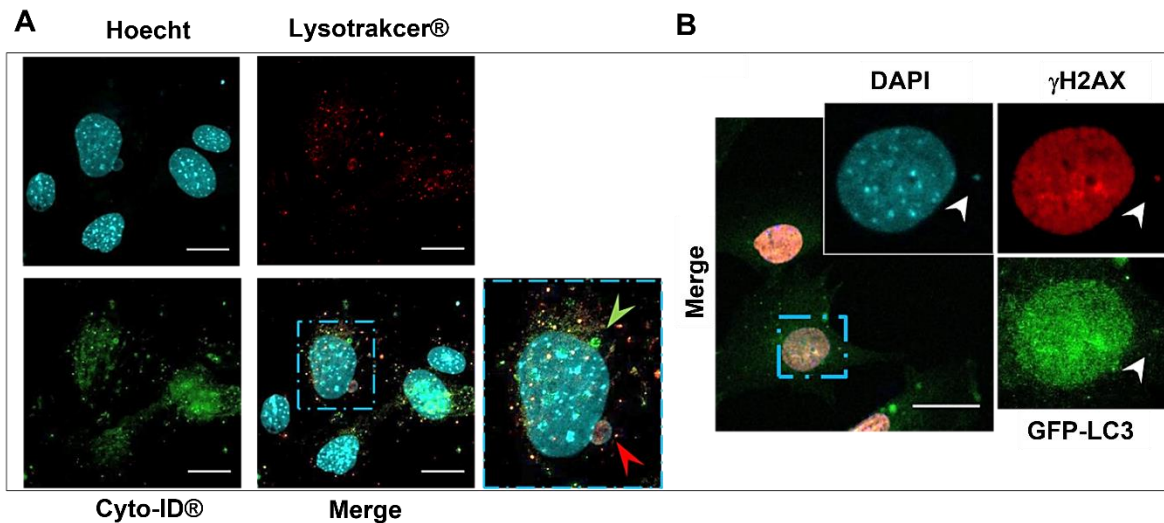


Figura 11. Inducción de la autofagia como consecuencia del daño al DNA. **A.** Imágenes representativas de MEF en etapa de daño (2h D) y con tinción simultánea para autofagosomas (*Cyto-ID®*), vesículas ácidas (*LysoTracker®*) y DNA (Hoechst). La barra de escala equivale a 30 μ m. La flecha verde indica a un autofagosoma con DNA en su contenido y la flecha roja indica una vesícula ácida (presuntamente un lisosoma) con DNA en su contenido. **B.** Imágenes representativas de MEFs transgénicos que expresan la proteína GFP-LC3 en etapa de daño (2h D), con detección de la histona

γ H2AX y con señal de DAPI para el núcleo. La cabeza de flecha blanca señala a un micronúcleo positivo para GFP-LC3, γ H2AX y con DNA. La barra de escala equivale a 50 μ m.

Basados en estas observaciones, se cuantificó la frecuencia con la que se encuentra a la proteína GFP-LC3 en las alteraciones nucleares (figura 12A y 12B). Así, en células no tratadas con etopósido se observó que el 52.3 ± 8.2 % de las alteraciones nucleares (tanto protrusiones como MiNu) contiene a la proteína GFP-LC3. Este porcentaje se incrementa en la etapa de daño a 60.3 ± 8.7 % y a $69.7\% \pm 17.5$ % a las 5 horas de reparación (figura 12B).

Para corroborar la participación de la maquinaria autofágica también se analizó la distribución de la proteína BECN1 (figura 12A Y 12C), ya que participa en la formación de autofagosomas. En células no tratadas con etopósido se detectó que un 34.5 ± 8.3 % de las alteraciones nucleares (protrusiones y MiNu) contienen BECN1 (figura 12C). En forma similar con LC3, en las etapas de daño y reparación este porcentaje se incrementa a 55.7 ± 1.9 % durante las 2 horas de daño con etopósido y alcanza un valor de $52.9\% \pm 10.2$ a las 5 horas en la etapa de reparación (figura 12C). Esto sugiere que la maquinaria autofágica acompaña la formación de protrusiones nucleares y de MiNu, tanto de forma basal como en respuesta al daño al DNA. Para determinar si también participa la degradación autofágica, se buscó la presencia de autolisosomas. Mediante tinción con *Lysotracker®*, se identificaron alteraciones nucleares (MiNu y protrusiones nucleares) asociadas a vesículas ácidas indicando el involucramiento del lisosoma (figuras 11A y 12A). Vale la pena hacer notar que la abundancia de lisosomas aumentó a las 2 h de daño al DNA, y disminuyó a las 5h de reparación, indicando un flujo de la autofagia funcional. También se puede notar un cambio en la distribución de BECN1 que se encuentra localizado en estructuras subnucleares de manera basal, en respuesta al daño al DNA se distribuye de manera más homogénea y sale del núcleo, y a las 5 h de reparación se le encuentra nuevamente reclutado en las estructuras subnucleares. Este dinamismo en su distribución intracelular sugiere una participación activa de la nucleofagia.

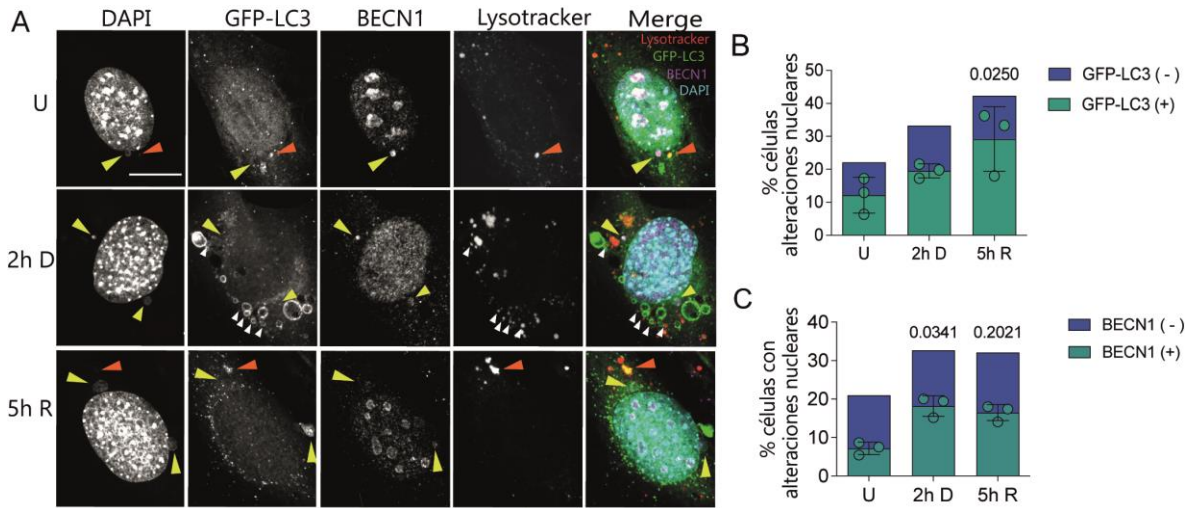


Figura 12. La nucleofagia es inducida durante la formación de alteraciones nucleares. A. Imágenes representativas para la detección de alteraciones nucleares que contienen BECN1 (flechas amarillas, GFP-LC3 o lisosomas identificados con *LysoTracker*[®] (flechas color naranja), en MEF transgénicos que expresan la proteína GFP-LC3 células no tratadas, en fases de daño (2h D) o de reparación (5h R). La barra de escala representa 10 μ m. **B.** Porcentaje de células con alteraciones nucleares que contienen (+) o no (-) a la proteína GFP-LC3 con los tratamientos indicados. **C.** Porcentaje de células con alteraciones nucleares que contienen (+) o no (-) a la proteína BECN1 en células no tratadas o en fases de daño (2h D) y de reparación (5h R). Los símbolos en verde representan los promedios de porcentaje de células con alteraciones nucleares positivas para GFP-LC3 en (B) o BECN1 en (C) para cada experimento. Las barras en la gráfica representan la desviación estándar. Cada punto representa un experimento independiente; en cada experimento se contaron al menos 50 células por tratamiento. Las diferencias significativas se calcularon mediante ANOVA de una vía seguida por prueba de Kruskal-Wallis. Los valores de P son indicados para la comparación con las células no tratadas con etopósido (U).

Ya que se encontró la presencia de proteínas autofágicas en las alteraciones nucleares, se procedió a evaluar el efecto de la inhibición de la autofagia sobre la frecuencia de formación de dichas alteraciones. Para esto se determinó tanto la eficiencia de reparación del DNA, así como la aparición de alteraciones nucleares en células sometidas a tratamiento con un inhibidor de la autofagia. Como inhibidor se empleó Spautin-1, el cual inhibe la desubiquitinación de la proteína BECN1, propiciando que sea degradada mediante proteasoma, evitando de este modo la formación de autofagosomas (Liu et al., 2011). En estas condiciones, se observó mediante ensayo cometa que el proceso de reparación del DNA se ve afectado negativamente, propiciando mayor daño en el DNA, así como un retraso en la recuperación de la integridad del DNA tras la exposición a Etopósido (figura 13A y

13B). En la etapa de daño, para las células previamente expuestas a Spautin1 y luego a Etopósido, se obtuvieron cometas de longitud $121.40 \pm 65.10 \mu\text{m}$. Estos valores son mayores a los observado para células únicamente expuestas a etopósido, que mostraron cometas de longitud $89.05 \pm 89.31 \mu\text{m}$.

En la etapa de reparación, a las 5h de reparación, las células no expuestas a Spautin-1, recuperan su integridad obteniéndose valores de $45.44 \pm 14.06 \mu\text{m}$ de longitud de cometas. Estos valores son similares a los $40.59 \pm 11.75 \mu\text{m}$ observados en células no tratadas ni con Spautin1 ni con etopósido, mientras que para células previamente tratadas con Saputin-1 y con etopósido, a las 5 horas de reparación, aún se obtienen cometas con longitudes de $59.77 \pm 27.53 \mu\text{m}$, valores estadísticamente diferentes a las células sin daño en el DNA.

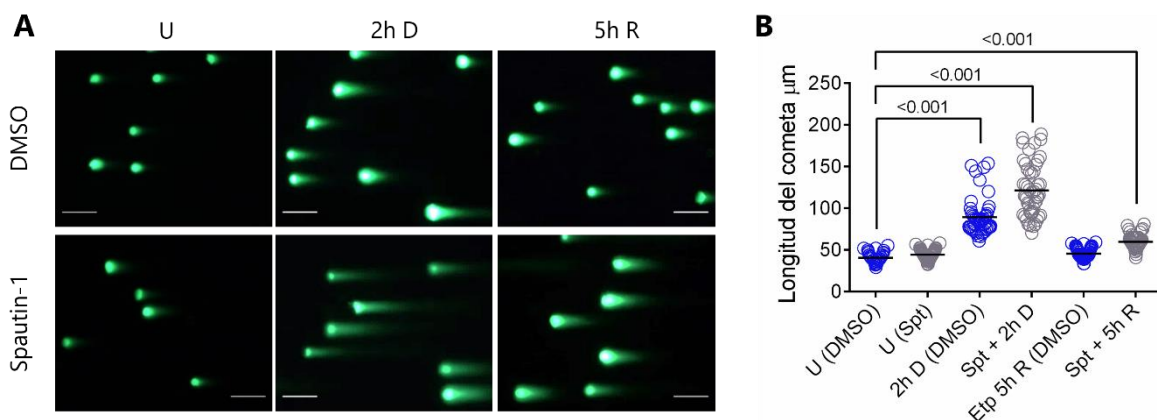


Figura 13. La inhibición de la autofagia aumenta el daño y retrasa el proceso de reparación del DNA. MEF pretratados con Spautin-1 ($10 \mu\text{M}$ por 12h) o con vehículo (DMSO 0.01% por 12 h), fueron posteriormente tratados con etopósido ($120 \mu\text{M}$ por 2h) y finalmente se permitió la reparación hasta las 5h en presencia de Spautin-1 o vehículo. El grado de daño se determinó mediante ensayo cometa neutro. **A.** Imágenes representativas de los cometas obtenidos con los tratamientos a distintos tiempos. El material nuclear fue teñido con *Sybr Green®*. Las barras de escala equivalen a $100 \mu\text{m}$. **B.** Cuantificación del grado de daño determinando la longitud de los cometas en imágenes de epifluorescencia como se muestra en A. Se grafican las mediciones con el promedio en cada punto de tiempo. * $p < 0.001$ tras aplicación de prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de comparación múltiple de Dunn. Se midieron al menos 50 cometas en cada uno de tres experimentos independientes para cada tratamiento y tiempo.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la inhibición de la autofagia, en la generación de alteraciones nucleares. Para ello, en MEF silvestres se silenció por interferencia de RNA la expresión del gen *Atg7* (cuya proteína es requerida para la elongación de autofagosomas (Simon et al., 2017) (figura 14A). La comparación de las células control con aquellas células en las que se silenció *Atg7* indica que este silenciamiento propició una reducción en el porcentaje de células con protuberancias en las distintas etapas (figura 14B), ya sea previo al daño de 19.8 ± 4.16 % a 8.543 ± 4.25 DE), durante la etapa de daño por tratamiento con etopósido de $26.68 \pm 2,559$ % a 15.56 ± 1.117 % y en la etapa de reparación a las 5 h, de 38.14 ± 8.216 % a 23.28 ± 5.832 %. Resultó interesante observar que el porcentaje de células con protuberancias nucleares continuó aumentando durante la fase de reparación del DNA, mientras que el porcentaje de células con MiNu disminuyó. Estos resultados sugieren que el proceso de eliminación de MiNu es diferente al proceso de resolución de protuberancias.

También se obtuvieron reducciones en los porcentajes de células con MiNu, aunque en menor grado que no alcanza a ser estadísticamente significativo. Para aquellas células en las que se silenció a *Atg7* (figura 14B), pasó de $3.8\% \pm 3.4$ a 1.823 ± 1.8 % en la etapa previa al daño en el DNA, de 6.0 ± 3.6 % a $3.5\% \pm 2.8$ % durante la etapa de daño por tratamiento con etopósido y de 4.9 a $2.4 \pm 1.3\%$ durante la etapa de reparación a las 5 horas.

En conjunto, estos resultados sugieren que la maquinaria autofágica participa activamente en la formación de las protuberancias nucleares. Sin embargo, no es clara su participación en la formación de MiNu. Estos resultados apoyan que el mecanismo de formación de protuberancias y MiNu puede ser diferente.

Para corroborar la participación de la autofagia en la formación y eliminación de alteraciones nucleares, se realizó la misma evaluación en MEF *Atg4b*^{-/-} carentes de la proteína ATG4B, en colaboración con la Dra. Sandra Cabrera de la Facultad de Ciencias de la UNAM. La proteína ATG4B es necesaria para el procesamiento de la proteína LC3, que genera la forma LC3-I, la cual a su vez es lipidada con fosfatidiletanolamina para su incorporación en la membrana de los fagóforos, para la formación de autofagosomas. Se corroboró que MEFs *Atg4b*^{-/-} tienen atrofiada la

autofagia (figura 14D) al observar una disminución en la cantidad de LC3-II (indicando una menor formación de autofagosomas), lo que coincide con la acumulación de la proteína p62/SQSTM1 (Rogov et al., 2014; Simon et al., 2017), que es una proteína adaptadora que debe ser degradada por autofagia. De este modo, en forma muy similar al efecto observado con el silenciamiento de *Atg7*, la afectación a la autofagia por la falta de ATG4B condujo a una reducción en la formación de protrusiones nucleares (figura 14E). Incluso en células no sometidas a daño (U), el porcentaje promedio de protrusiones de $18.0 \pm 7.0\%$ observado en los MEF silvestres (WT), se redujo en MEF *Atg4b*^{-/-} a un valor de $7.9 \pm 2.8\%$. En la etapa de daño, esta reducción se observa de $24.5 \pm 9.8\%$ en MEF WT a $5.2 \pm 1.0\%$ en MEF *Atg4b*^{-/-} y finalmente en la etapa de reparación la reducción pasa de $19.6 \pm 3.0\%$ en MEF WT a $7.8 \pm 3.7\%$ en MEF *Atg4b*^{-/-}. En el caso de la frecuencia de MiNu, nuevamente se obtuvo un efecto opuesto a lo encontrado con las protuberancias, observando un incremento de MiNu en células MEF *Atg4b*^{-/-} (figura 14F). Se observó para células no expuestas a etopósido, un $4.6 \pm 2.3\%$ para MEF WT, que pasa a $8.1 \pm 3.4\%$ en MEF *Atg4b*^{-/-}. En la etapa de daño se obtuvo un incremento de $5.2 \pm 1.3\%$ en MEF WT alcanzando $14.0 \pm 5.0\%$ en MEF *Atg4b*^{-/-}. Finalmente, en la etapa de reparación, para MEF WT, la frecuencia promedio de MiNu alcanzó un $13.0 \pm 0.9\%$, mientras que se observó un $11.6 \pm 5.2\%$ en MEF *Atg4b*^{-/-}.

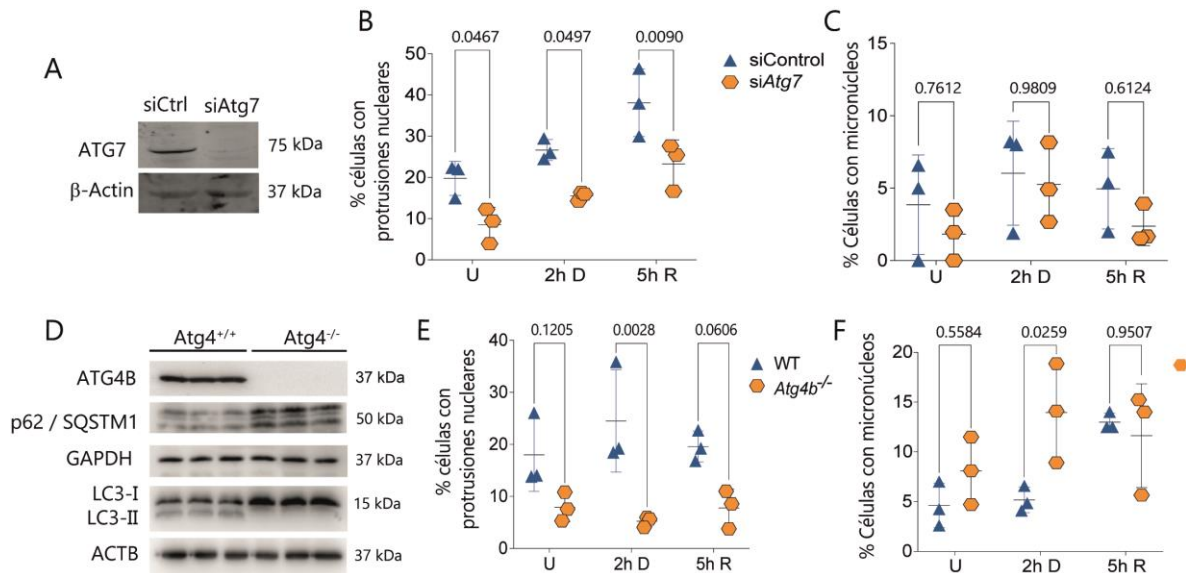


Figura 14. La maquinaria autofágica es necesaria para la formación de protrusiones nucleares, pero no para la formación de MiNu. Los MEF fueron transfectados con siRNA control o con siRNA contra *Atg7* y 48 horas después fueron tratados o no con etopósido $120 \mu\text{m}$ durante 2 h, tras lo cual

se permitió la reparación del DNA por 5 h. **A.** Análisis de WB para verificar el silenciamiento de *Atg7*. La β -actina fue utilizada como control de carga. **B** y **C.** Las gráficas muestran la distribución del porcentaje de células con protrusiones nucleares (**B**) o bien con MiNu (**C**). Para cada experimento se contaron al menos 50 células y se analizó la señal de DAPI en las alteraciones, a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal. Cada punto presenta el porcentaje promedio \pm una desviación estándar. Las diferencias significativas se obtuvieron mediante análisis de ANOVA de dos vías, seguida de prueba de comparación múltiple de Sidak. Los valores ajustados de P están indicados para cada comparación. **D.** Se analizaron MEF WT y MEF *Atg4b*^{-/-} para evaluar la abundancia de alteraciones nucleares. El WB muestra la falta de expresión de ATG4B en los MEF *Atg4b*^{-/-}, lo cual además propicia una acumulación de la proteína p62/SQSTM1 y una falta de lipidación de la proteína LC3-B confirmando la deficiencia en la formación de autofagosomas. **E** y **F** muestran las gráficas del porcentaje de células con protrusiones nucleares (**E**) y con MiNu (**F**). Para cada experimento se contaron al menos 140 células, mediante la detección de la señal de DAPI en imágenes de microscopía confocal. La distribución de los datos de tres experimentos independientes se presenta en las gráficas como promedio \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se obtuvieron mediante análisis de ANOVA de dos vías, seguida de prueba de comparación múltiple de Sidak. Los valores ajustados de P están indicados para cada comparación.

En resumen, la detección de alteraciones nucleares con marcadores de distintas etapas de la vía autofágica, es indicativa del posible involucramiento de la nucleofagia en la eliminación de material nuclear alterado. Además, la tendencia a la reducción en la frecuencia de protrusiones nucleares en células deficientes en autofagia (por silenciamiento de *Atg7* o por la carencia de ATG4B), podría deberse a que la maquinaria autofágica contribuye al proceso de expulsión del material nuclear hacia el citoplasma, mediante la formación de protrusiones nucleares. Sin embargo, la formación de MiNu, en el contexto de deficiencia en la autofagia, no se ve afectada, lo cual puede implicar mecanismos distintos a la formación de protrusiones nucleares para la expulsión del material al citoplasma. Sin embargo, parece que la eliminación de MiNu sí depende de la maquinaria de la autofagia, ya que aumentan de manera estadísticamente significativa en ausencia de ATG4B. Así, la deficiencia de la autofagia también conduce a la acumulación de material nuclear en el citoplasma en forma de MiNu.

6.4 La nucleofagia elimina complejos de corte de topoisomerasa II y componentes nucleolares.

Considerando el involucramiento de la nucleofagia en la degradación de material nuclear durante el estrés genotóxico, procedimos a identificar posibles blancos de esta vía de degradación. Dado que el etopósido propicia la estabilidad y persistencia de los complejos de corte formados por la TOP2 y el DNA (Top2cc por sus siglas en inglés) (Vann et al., 2021), se contempló a estos complejos como blancos de degradación de la nucleofagia. En trabajos previos se ha establecido que los complejos Top2cc son removidos principalmente mediante dos mecanismos. En uno de los mecanismos se requiere una digestión proteolítica mediada por el proteosoma o bien mediante metaloproteasas, tras lo cual actúa la fosfodiesterasa TDP2 para hidrolizar el enlace entre el DNA y la TOP2 (Atkin et al., 2019). El otro mecanismo involucra la actividad nucleasa de MRE11, para generar cortes en el DNA adyacente que libera los segmentos en los que se encuentra el aducto de DNA con la topoisomerasa (Atkin et al., 2019; Riccio et al., 2020). Sin embargo, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de que la nucleofagia también contribuya a la eliminación de estos complejos TOP2cc para hacer más robusta la protección del genoma y evitar una inestabilidad nuclear. Nuevamente, mediante el análisis de imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencias, se detectaron MiNu y protuberancias nucleares con Topoisomerasas 2β y 2α (TOP2B y TOP2A, figuras 15A y 15B) tanto en células tratadas como no tratadas con etopósido, con una tendencia a incrementar en las fases de daño y reparación. Un promedio de $53.0 \pm 3.1\%$ de las alteraciones nucleares obtenidas en células no tratadas, presentan marca positiva para la TOP2A. Este porcentaje alcanza $56.0 \pm 2.1\%$ a las dos horas de daño y $59.0 \pm 4.6\%$ a las 5 h de reparación (figura 15C). Se obtuvieron porcentajes muy similares para las alteraciones nucleares con marca positiva para la TOP2B (figura 15D), de modo que en células no tratadas con etopósido se obtuvo $41.0 \pm 1.0\%$ de alteraciones nucleares con TOP2B. Este porcentaje alcanza el $50.0 \pm 5.5\%$ en células a las 2h de daño y $58.0 \pm 7.2\%$ a las 5h de reparación. Además, como se muestra en las figuras 15A y 15B, se observan alteraciones nucleares con TOP2 y con las proteínas LC3 y BECN1. Incluso, una proporción importante de las alteraciones que contienen TOP2B, también contienen a la proteína BECN1 (figura 15E). Así, el $78.0 \pm 2.9\%$ de las alteraciones nucleares observadas en células no tratadas con etopósido, mostraron contener simultáneamente a la TOP2B y a BECN1. Este porcentaje de

alteraciones con ambas proteínas es de $70.0 \pm 3.4\%$ a las 2 h de daño y $63.0 \pm 4.3\%$ a las 5 h de reparación. Vale la pena resaltar que observamos un puente de unión entre el núcleo y un micronúcleo, donde pudimos observar tanto a BENC1 como a TOP2B, sugiriendo que la interacción entre ambas proteínas podría guiar la salida de TOP2cc del núcleo (Figura 15B).

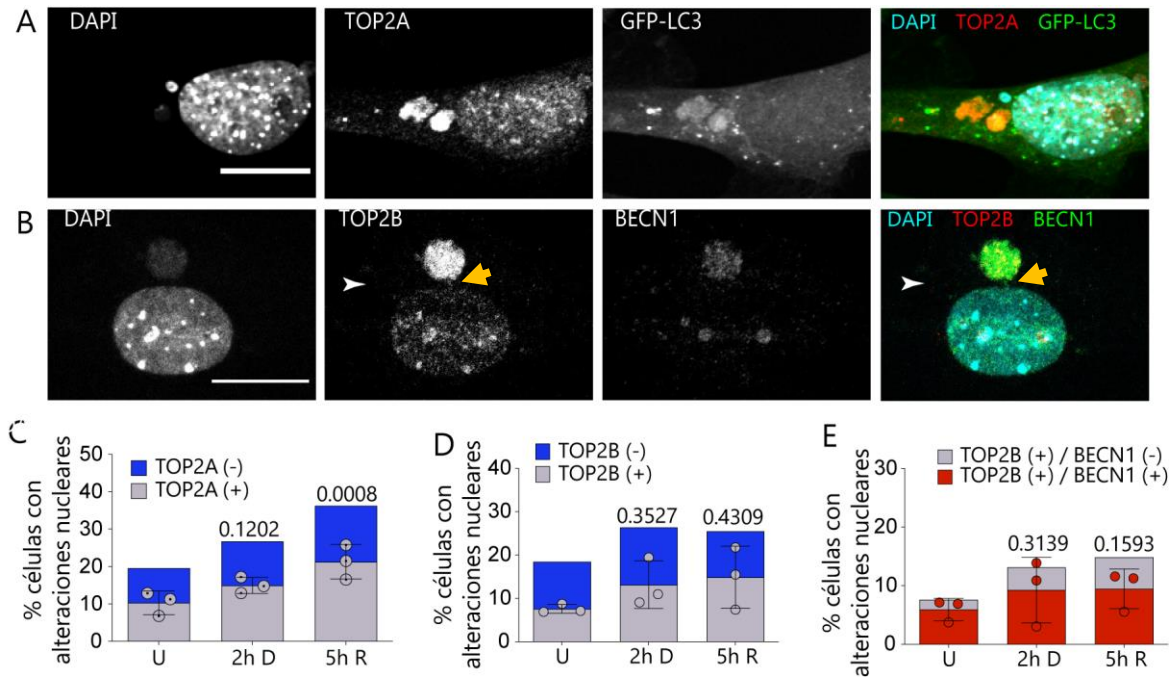


Figura 15. Los complejos TOP2cc son blanco de eliminación por nucleofagia. A. La presencia de la TOP2A fue detectada en MiNu que también colocalizan con la proteína GFP-LC3. Imágenes representativas de MEF transgénicos que expresan GFP-LC3 y tratados con $120 \mu\text{M}$ de etopósido durante 2 horas. La barra de escala representa $20 \mu\text{m}$. **B.** La presencia de la TOP2B fue detectada en MiNu, en los que también colocaliza la proteína BECN1. Imágenes representativas de MEF silvestres tratados con $120 \mu\text{M}$ de etopósido durante 2 horas. La barra de escala representa $20 \mu\text{m}$. La flecha amarilla señala a un puente nuclear formado entre el núcleo principal de la célula y una protrusión nuclear. **C.** Porcentaje de células no tratadas, en fase de daño (2h D) o reparación (5h R) con alteraciones nucleares que contienen DNA y TOP2A. Se presentan barras con el promedio \pm SD para tres experimentos independientes en los que se contaron al menos 50 células por experimento. Se calculó la significancia estadística mediante ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparación múltiple de Dunnet. Se muestran los valores ajustados de P para cada comparación. **D y E.** Gráfica para el porcentaje de células con alteraciones nucleares que contienen DNA y TOP2B (en **D**) o bien DNA, TOP2B y BECN1 (en **E**). Las cuantificaciones de cada experimento se realizaron contando al menos 50 células en las que se analizó la señal de DAPI en las alteraciones nucleares colocalizando con las proteínas correspondientes. Se presentan barras con el promedio \pm desviación estándar para

tres experimentos independientes. Se calculó la significancia estadística mediante ANOVA de dos vías seguida de prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se muestran los valores ajustados de P para cada comparación.

Para mayor solidez de estos hallazgos, con asesoría del Dr. Adán Guerrero del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, corroboramos la presencia de las proteínas mediante microscopía de superresolución como se observa en la figura 16A.

Para corroborar la degradación autofágica de TOP2B, se analizó su presencia en autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión, identificando simultáneamente a LC3 y a TOP2B con anticuerpos secundarios acoplados a partículas de oro. Como se muestra en la figura 16B, encontramos a TOP2B rodeado por LC3, e incluso las observamos en tránsito saliendo del núcleo. Este análisis se hizo con apoyo del Dr. Horacio Merchant del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

En conjunto, estas observaciones apuntan a que las lesiones nucleares que contienen complejos TOP2cc (DNA y TOP2B) son eliminados mediante nucleofagia.

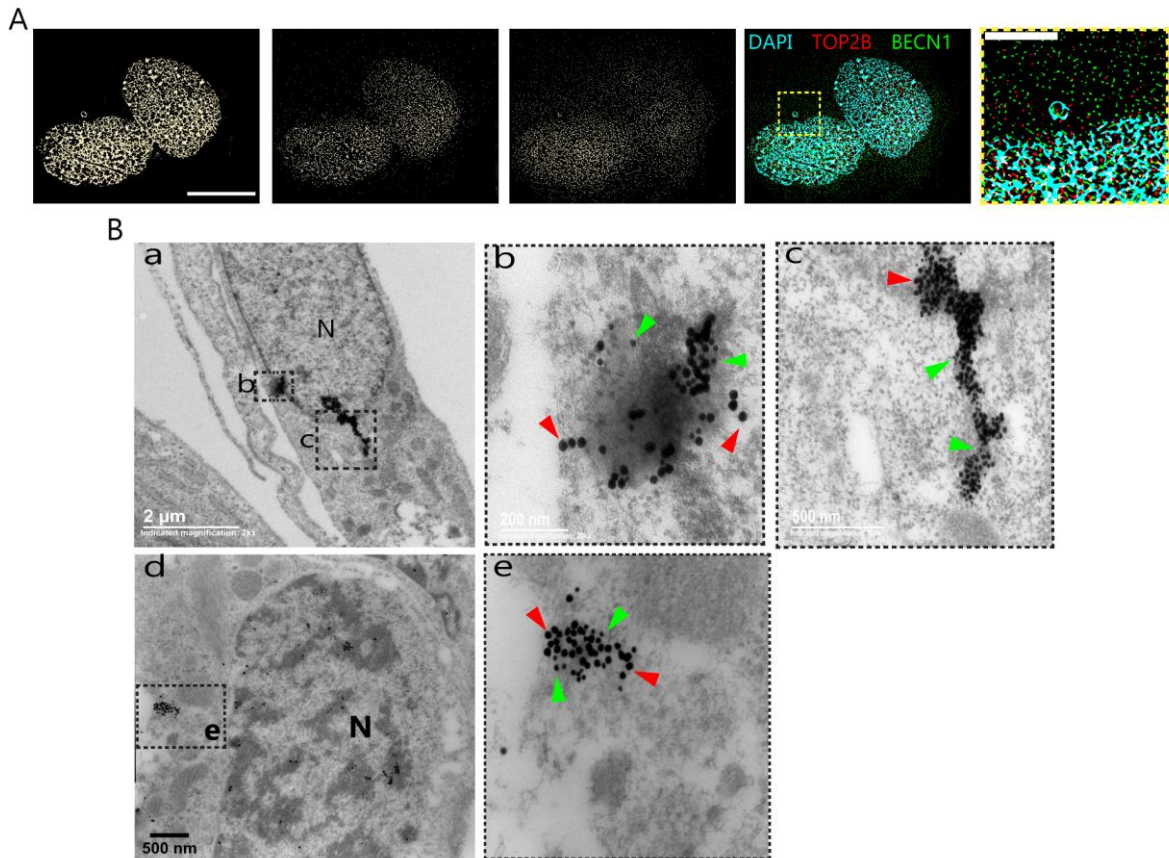


Figura 16. Las alteraciones nucleares que portan TOP2B se asocian con la maquinaria autofágica durante su formación y expulsión. **A.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de superresolución para MEF silvestres en fase de reparación (5h R). Se observa un micronúcleo con DNA y TOP2B (complejo TOP2cc) en asociación con la proteína autofágica BECN1. La sección ampliada en el recuadro amarillo es para el empalme de canales. La barra de escala representa 15 μm en la imagen para DAPI y 5 μm en el recuadro amplificado. **B.** Micrografía electrónica para la detección de LC3 y TOP2B mediante *immunogold*. Los recuadros b, c y e corresponden a las ampliaciones de las secciones indicadas en a y d. Las flechas verdes corresponden a las partículas de oro de 15 nm para TOP2B y las flechas rojas apuntan a partículas de oro de 25 nm para LC3.

El nucleolo es considerado un organelo sin membranas, ya que tiene una densidad muy alta de proteínas y ácidos nucleicos. Esto limita el acceso de la maquinaria de reparación (Korsholm et al., 2020). Dado que ahí se encuentra el DNA ribosomal, mantener su integridad podría requerir procesos alternativos de reparación. En este trabajo planteamos que los componentes nucleolares también pueden ser blancos de degradación por nucleofagia en condiciones de estrés genotóxico agudo. Este planteamiento lo consideramos también, tomando como referencia que el nucléolo es una estructura susceptible a distintos tipos de estrés, que propician la

acumulación de proteínas en esta subestructura nuclear (Latonen, 2011). Además, se ha reportado que las células de teratocarcinoma que sobreviven a una exposición prolongada a etopósido, experimentan una fase crónica en la que se forman agregados proteicos en el nucléolo, denominados agresomas, los cuales son expulsados al citoplasma donde son rodeados por proteínas de la maquinaria autofágica (Salmina et al., 2017).

Se identificó la presencia de la proteína Fibrilarina (FBL), que es componente del nucléolo, en alteraciones nucleares (figuras 17A). Como se observa en la figura 17B, se encontró que solo el $5.9 \pm 5.0\%$ de las alteraciones nucleares observadas en células no tratadas con etopósido poseen FBL. En la etapa de daño a las 2h, este porcentaje de alteraciones nucleares con FBL apenas incrementó a $6.8 \pm 4.0\%$ y alcanzó $7.7 \pm 6.1\%$ a las 5h de reparación.

Por otro lado, de las alteraciones que contienen el componente nucleolar FBL, hasta el $72.0 \pm 3.6\%$ de éstas, también contiene a la proteína de la maquinaria autofágica LC3 (figuras 17B y 17C) en células no tratadas con etopósido. Igualmente, en la etapa de daño (2hD), el $65.7 \pm 2.0\%$ y hasta $90.3\% \pm 6.4\%$ de las alteraciones con FBL, también contienen la proteína LC3.

Estos hallazgos también se confirmaron analizando imágenes obtenidas por microscopía de superresolución, las cuales además nos permitieron identificar la presencia de componentes de la lámina nuclear rodeando al componente nucleolar en expulsión (figura 17D).

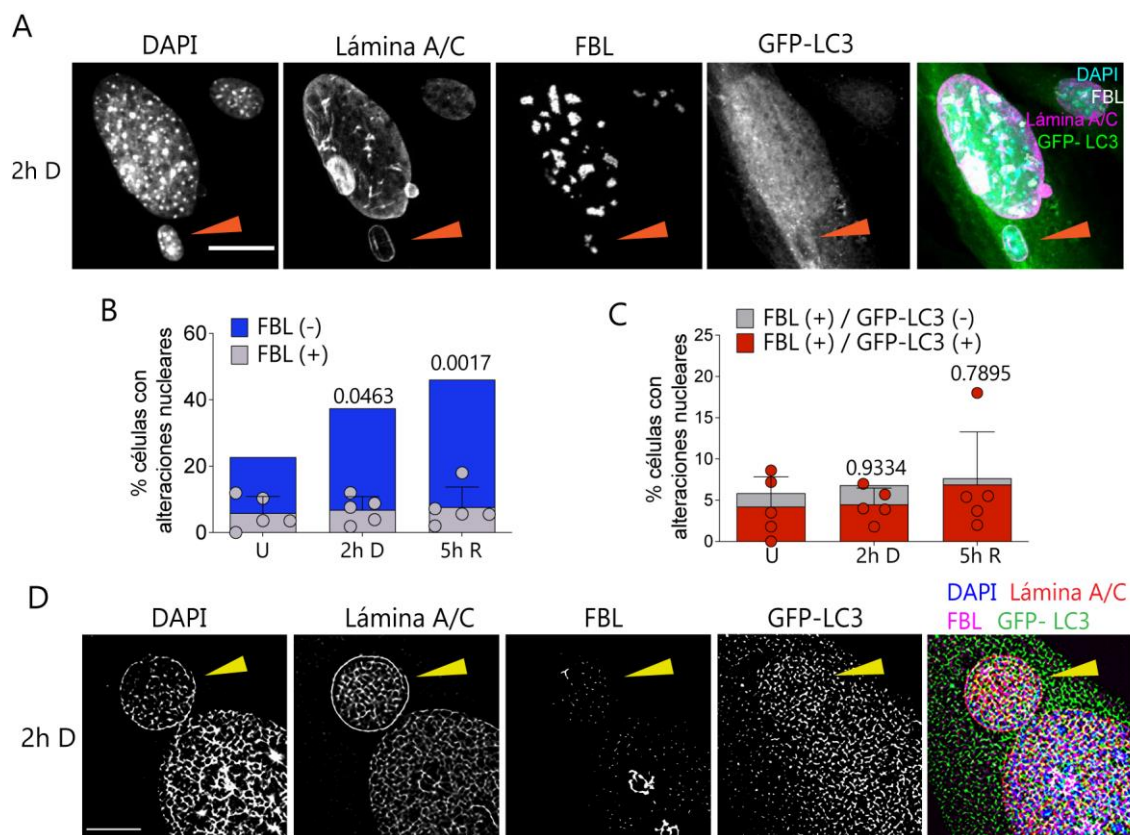


Figura 17. El nucléolo es blanco de degradación nucleofágica. **A** Imágenes obtenidas por microscopía confocal para MEF transgénicos que expresan GFP-LC3 y tratados con etopósido durante 2 h. La flecha naranja señala un micronúcleo positivo para FBL (componente nucleolar), para la Lámina A/C y para GFP-LC3. La barra de escala representa 20 μm **B** y **C**. Cuantificación de alteraciones nucleares que contienen a la proteína nucleolar FBL (en **B**) y FBL colocalizando con GFP-LC3 (en **C**). Se presentan el promedio de alteraciones nucleares con las proteínas indicadas \pm desviación estándar para células no tratadas, o en fase de daño (2h D) y de reparación (5h R). Por cada uno de los cinco experimentos evaluados, se contaron al menos 50 células en las que se analizó la señal de DAPI en alteraciones nucleares en imágenes obtenidas por microscopía confocal. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos vías, seguida por prueba de comparación múltiple de Dunnet. Se indican los valores ajustados de P para cada comparación con las células control. **D**. Imágenes obtenidas mediante microscopía de superresolución para MEF transgénicos que expresan GFP-LC3 en fase de daño (2h D). Se observa la presencia de la FBL en un micronúcleo rodeado por GFP-LC3 y Lámina A/C. La barra de escala representa 5 μm .

Nuevamente, se identificó que además de alteraciones nucleares con FBL y LC3, también se generan alteraciones nucleares que contienen a la proteína BECN1 (Figura 18A). Además, se evaluó la posible interacción del componente nucleolar FBL con la proteína BECN1 por inmunoprecipitación. Como se muestra en las figuras 18B encontramos que BECN1 sí interactúa con FBL.

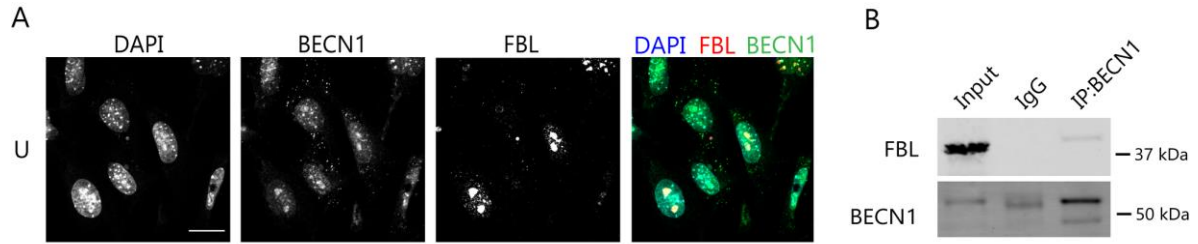


Figura 18. Interacción de la maquinaria autofágica con los componentes nucleolares en alteraciones nucleares. **A.** Imágenes representativas de células en las que se observa la distribución de las proteínas FBL y BECN1 en MEF WT no tratadas con etopósido, que muestran que de manera basal también se eliminan componentes nucleolares. **B.** WB para la detección de la proteína BECN1 y FBL a partir de extractos de células obtenidos por inmunoprecipitación contra la proteína BECN1. Se utilizó IgG como control de la interacción específica entre FBL y BECN1.

En conjunto, estos resultados sugieren que la maquinaria autofágica también contribuye a promover la salida de componentes nucleolares hacia el citoplasma para su posterior degradación en el lisosoma. Sin embargo, dado que no observamos un aumento en el porcentaje de células con alteraciones nucleares con FBL en respuesta al tratamiento con etopósido, es posible que el mecanismo de respuesta a DSBs sea diferente en el nucleolo que en el resto del genoma.

7.- Discusión.

En este trabajo se corroboró que en células de mamífero la inducción de la autofagia es parte de la respuesta de daño ante las rupturas de doble cadena en el DNA. Además, se observó que la inhibición de la autofagia empleando el compuesto químico Spautin-1, afecta la eficiencia del proceso de reparación del DNA. En este caso el genoma es reparado, sin embargo, se observó una persistencia transitoria de las rupturas inducidas con el etopósido, lo que coincide con lo reportado por otros grupos que también detectaron persistencia de daño en el DNA inducido en células deficientes en autofagia (Bae & Guan, 2011).

Dado que distintos tipos de estrés propician la activación de la autofagia (Ambrosio & Majello, 2020a; Klionsky, Petroni, et al., 2021; Papandreou & Tavernarakis, 2021; Rogov et al., 2014), los resultados descritos aquí sugieren que, en el contexto del daño al DNA, la autofagia también contribuye a contender con el estrés genotóxico. Son distintas las formas en las que se ha observado contribución de la autofagia a la resolución del estrés genotóxico. Por un lado, la inducción de autofagia propicia la elevación de los niveles de algunas proteínas necesarias para los procesos de reparación, ya sea mediante recombinación homóloga (HR) o bien reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ). Particularmente para el presente trabajo se consideran las observaciones experimentales relacionadas a la participación de la vía autofágica en el proceso de degradación de material nuclear que es expulsado al citoplasma en forma de MiNu, proceso que se ha denominado como NUCLEOFAGIA.

Como ya se ha mencionado, la nucleofagia ha sido estudiada principalmente en células cancerosas, por lo cual, lo reportado en el presente trabajo resalta que la nucleofagia también ocurre en células no tumorales, poniendo de manifiesto que la nucleofagia es un mecanismo general de respuesta ante el estrés genotóxico. Ahora bien, aún falta seguir explorando el mecanismo por el cual, el material nuclear es expulsado al citoplasma. Son relevantes las observaciones en células tumorales de que algunas proteínas de la maquinaria autofágica como ULK1, ATG5, ATG7, BECN1, LC3, así como la proteína adaptadora p62/SQSTM1, tienen la capacidad de translocarse al interior del núcleo, bajo distintas circunstancias (R. Huang et al., 2015;

Joshi et al., 2016; Lee et al., 2012; Liang et al., 2001; Maskey et al., 2013). Dentro del núcleo, LC3 interactúa con las proteínas de la envoltura nuclear, la lámina A/C y lámina B1, así como con la cromatina asociada a la lámina nuclear. En condiciones de daño al DNA, esta interacción con LC3 promueve la translocación de estos componentes nucleares al citoplasma para su degradación por vía autofágica, lo cual se propone como un mecanismo supresor de tumores (Dou et al., 2015; Lenain et al., 2015; Park et al., 2009). Estos hechos coinciden con lo observado en nuestro modelo experimental, ya que logramos identificar a LC3 dentro del núcleo tanto en células no tratadas, como en las etapas de daño y reparación de células tratadas con etopósido (figura 12A). Además, la presencia de protrusiones nucleares y MiNu con proteínas de la lámina nuclear, así como con LC3 y BECN1 nos sugiere que dichas proteínas de la maquinaria autofágica pueden promover la expulsión de material nuclear hacia el citoplasma para su posterior degradación. Esta aseveración se fortalece con nuestras observaciones experimentales sobre la disminución en la frecuencia de protrusiones nucleares obtenida en MEF en los que se bloquea la expresión de *Atg7* o bien en MEF carentes de ATG4B en comparación con lo observado en MEF WT.

Por otro lado, también es necesario seguir explorando el mecanismo de formación de MiNu y determinar cómo influye la maquinaria autofágica en dicha formación. Lo anterior considerando que nuestros resultados indican que, a diferencia de las protrusiones nucleares, la falta de expresión de *Atg4b* o de *Atg7*, propician un incremento en la formación de MiNu. Esto puede implicar que la maquinaria autofágica contribuye a la expulsión controlada de material nuclear dañado al citoplasma. Al afectar la expresión de proteínas autofágicas se favorecen otros mecanismos de expulsión de material nuclear en forma de MiNu.

Respecto a la caracterización del material nuclear expulsado al citoplasma y asociado con los marcadores autofágicos, se ha detectado DNA, así como marcadores de daño como la histona γ H2AX, y otros componentes diversos que pueden variar dependiendo del mecanismo por el cual propicia su expulsión. Al respecto de la degradación de MiNu por nucleofagia, la lámina B1, lámina A/C, y la proteína nucleolar FBL, destacan como blancos de degradación por esta vía en condiciones de estrés genotóxico (Lenain et al., 2015; Rello-Varona et al., 2012; Salmina et al.,

2017). Algunos otros componentes sugeridos como blancos de nucleofagia, son las histonas H2B y H3 (Ivanov et al., 2013; Rello-Varona et al., 2012), así como las proteínas RAD51 y RAD52 que participan en la reparación del DNA (J. Erenpreisa et al., 2011). De manera relevante, lo reportado en el presente trabajo, por un lado, ratifica la degradación de material nucleolar con FBL mediante nucleofagia, no solo en etapas crónicas de estrés genotóxico, sino también en etapas tempranas de estas condiciones. Además, aquí se reporta por primera vez la degradación de TOP2 mediante nucleofagia.

Particularmente en el modelo de daño con etopósido presentado aquí, se propició una cantidad masiva de rupturas de doble cadena en el DNA, como lo sugiere la intensa señal observada para la histona H2AX. Considerando que el etopósido afecta directamente a las TOP2, lo anterior se traduce en la generación de una gran cantidad de posibles complejos TOP2cc. A su vez, esto podría implicar que los sistemas descritos para la remoción de estos complejos TOP2cc, se vean superados en capacidad. De este modo, la nucleofagia podría funcionar como sistema de soporte para eliminar los complejos TOP2cc. En apoyo de este planteamiento, destaca la asociación entre la proteína BECN1 y las TOP2 durante el estrés genotóxico. Dicha interacción es necesaria para una reparación eficiente del DNA (F. Xu et al., 2017). Al respecto no se ha reportado más información sobre la función de BECN1 ni del complejo TOP2-BECN1 en la regulación del proceso de reparación. Sin embargo, esta interacción podría implicar que BECN1 facilite la translocación de los complejos TOP2cc hacia el citoplasma para su degradación, como lo sugieren las observaciones experimentales aquí presentadas (figuras 15 y 16). También destaca que en el mecanismo de remoción de los complejos TOP2cc que involucra la actividad nucleasa de MRE11, se corta el DNA liberando el aducto completo de topoisomerasa-DNA. De este modo la remoción simultánea de múltiples aductos de este tipo puede propiciar su acumulación, lo que podría requerir de la nucleofagia para su eliminación, como sugieren las observaciones presentadas aquí ante la inducción masiva de rupturas de doble cadena en el DNA por efecto del etopósido. En este mismo sentido, la reducción de los niveles de la TOP2A se ha observado en células sometidas a condiciones de falta de glucosa (Alchanati et al., 2009), que es una condición inductora de autofagia (Karabiyik et al., 2021). Esto sustenta la posibilidad de que la maquinaria autofágica puede interactuar con las TOP2 para

dirigirlas a los autofagosomas para degradación, implicando que incluso podrían ir en forma de aductos con el DNA, lo cual concuerda con las observaciones representadas en las figuras 15 y 16 donde se detectó la presencia de DNA y TOP2 en las alteraciones nucleares que además también poseen proteínas de la maquinaria autofágica como BECN1 y LC3.

Además, tanto la generación de complejos TOP2cc, su resolución y la reparación del DNA involucran la acumulación de una gran cantidad de moléculas reclutadas al núcleo en forma simultánea. Estas condiciones son favorables para la formación de agregados proteicos, que incluso puede agravarse por la insuficiencia en la capacidad de los proteosomas nucleares para la eliminación de algunas proteínas que ya no son necesarias (Johnston & Samant, 2021; Latonen, 2011). Las condiciones de estrés, entre ellas el estrés genotóxico, son promotoras de la agregación de proteínas dentro del núcleo (Salmina et al., 2017). A estos agregados se les denomina agresomas y aunque son considerados como un mecanismo para regular la actividad de proteínas mediante inmovilización temporal, también representan un obstáculo para la función de las estructuras nucleares afectadas (Latonen, 2019). Diversos reportes experimentales describen al nucléolo, como el sitio donde se forman agresomas (Latonen, 2011). Al respecto, se ha reportado que en células de teratocarcinoma de ovario que sobreviven a un estrés genotóxico prolongado por exposición a etopósido, desarrollan agresomas nucleolares. Al bloquear la actividad del proteasoma, la frecuencia de formación de agresomas se incrementa. Posteriormente, los agresomas son expulsados del núcleo hacia el citoplasma donde son rodeados por la maquinaria autofágica para su posterior degradación (Salmina et al., 2017). En el citoplasma, la autofagia es un mecanismo que elimina los agregados proteicos anómalos (W. Chen et al., 2021; Johnston & Samant, 2021). Por lo anterior, estos hechos son indicativos del papel de la nucleofagia como sistema de soporte ante situaciones que afectan o sobrepasan la capacidad del proteasoma, así como para eliminar agregados proteicos anómalos. Por ello, los resultados aquí presentados apoyan a que esta función de la nucleofagia, también opera en las fases agudas del estrés genotóxico.

Es importante destacar las observaciones de nucleofagia en células que no fueron sometidas al estrés genotóxico por efecto del etopósido. Esto implica que la

nucleofagia puede operar continuamente como mecanismo de contención de otros tipos de daño genómico distintos a las DSB. De igual modo nuestros resultados apuntan a la posibilidad de que la nucleofagia ocurra en diferentes contextos en los que el genoma de las células sea alterado ya sea por factores exógenos o endógenos. Incluso la nucleofagia podría participar degradando material nuclear anómalo durante la inducción programada de daño al DNA, como en los casos descritos para la recombinación del genoma de las células del sistema inmune o durante la recombinación de genes necesaria para la activación neuronal o incluso como parte del control de la expresión de genes durante la neurogénesis (Aleksandrov et al., 2020; Alt et al., 2017; Madabhushi et al., 2015).

8.- Conclusiones.

Como se plantea en la figura 19, como consecuencia del estrés genotóxico inducido por el etopósido, se genera la acumulación de una gran cantidad de macromoléculas dentro del núcleo. En primer lugar, las múltiples rupturas de doble cadena en el DNA implican la presencia de múltiples complejos de corte TOP2cc acumulados. Asimismo, los distintos procesos dentro del núcleo, incluidos el de reparación del DNA y el de remoción de los complejos TOP2cc también implica el reclutamiento de otro número considerable de complejos moleculares. Aunado a esto, la capacidad limitada de las proteasomas nucleares para degradar macromoléculas de gran tamaño, así como de agregados proteicos, implican que al menos temporalmente, se genera un estrés dentro del núcleo por la presencia de numerosas moléculas que propician la generación de agresomas en el nucleolo. Esta acumulación masiva de macromoléculas y las múltiples lesiones en el DNA afectan a la estructura nuclear, propiciando la expulsión de material nuclear hacia el citoplasma, incluyendo a los complejos TOP2cc y a los agresomas. En este proceso, las proteínas de la maquinaria autofágica que residen en el núcleo, contribuyen a la extrusión del material nuclear conduciéndolo posteriormente para su degradación en el lisosoma. Esto implica una función adicional de la autofagia inducida por la respuesta de daño al DNA. Nuestros resultados muestran que no solo ocurre en células tumorales, lo cual representa un mecanismo general de supervivencia, mediante la eliminación de factores que atentan contra la estabilidad del genoma. Finalmente, la nucleofagia resulta ser un proceso activo de forma basal que contribuye a la eliminación de diferentes alteraciones genómicas, cuya acción se incrementa ante situaciones de estrés genotóxico intenso. Estos hallazgos resaltan la importancia de caracterizar con mayor detalle los procesos de inducción de la nucleofagia y sus consecuencias en la fisiología celular bajo distintos contextos.

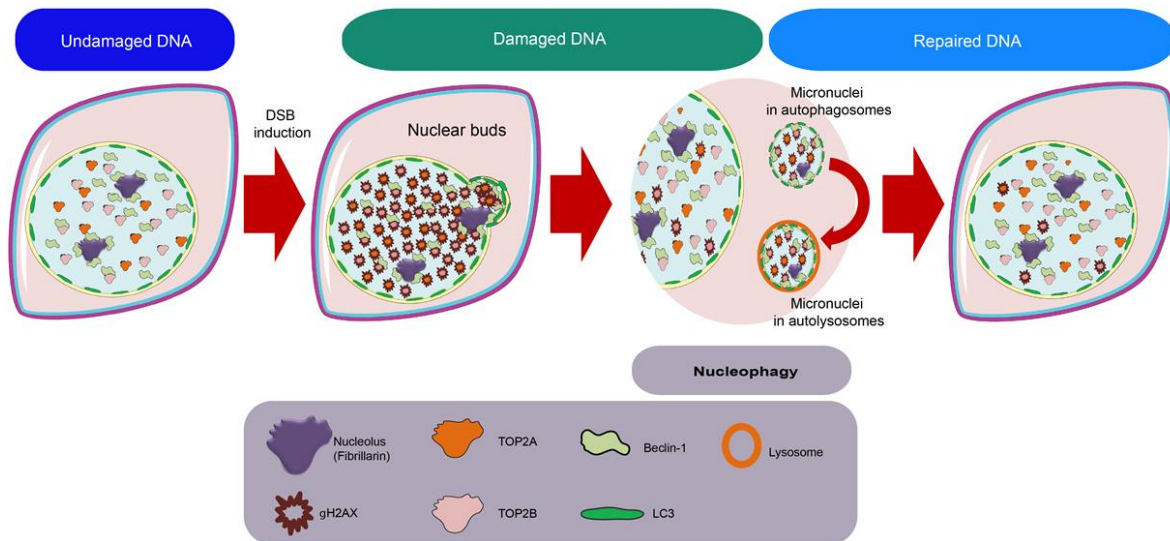


Figura 19. La nucleofagia como mecanismo de soporte para la eliminación de material nuclear dañado. Un intenso daño en el DNA altera la fisiología celular, principalmente dentro del núcleo. Esto puede saturar la capacidad de otros sistemas que participan en el mantenimiento de la proteostasis, lo que puede a su vez conducir a la acumulación de macromoléculas que formen agregados. Estos agregados afectan la estructura nuclear propiciando la expulsión de material nuclear hacia el citoplasma. Este proceso de expulsión es facilitado por la maquinaria autofágica que permite regular la disposición final de estos componentes, dirigiéndolos al lisosoma para su eliminación.

9.- Perspectivas.

Continuar la caracterización de los complejos TOP2cc como blanco de degradación de nucleofagia, incluyendo su búsqueda en otros modelos celulares, principalmente en células tumorales y sobre todo en células humanas. De confirmarse lo anterior, se contribuye a obtener mayor detalle sobre posibles mecanismos de resistencia a tratamientos contra el cáncer e incluso podrían mejorarse los esquemas actuales de tratamiento.

Al respecto, adicional a los resultados obtenidos en MEF, ya se han establecido los esquemas de tratamiento con etopósido para la línea celular de melanoma murino (línea celular B16F10) y para la línea celular humana derivada de carcinoma pulmonar (línea celular A549). En ambos casos, se han establecido las condiciones para la detección por inmunofluorescencia de proteínas nucleares, marcador de daño al DNA y proteínas de la maquinaria autofágica (Figura 20A y 20B). Incluso en células B16F10 fue posible detectar la presencia de protrusiones nucleares con DNA dañado y con la proteína LC3 (figura 20A), lo cual indica que al igual que en los MEF, la maquinaria autofágica puede acompañar la salida de material nuclear dañado hacia el citoplasma, para posteriormente dirigirlo a degradación al lisosoma.

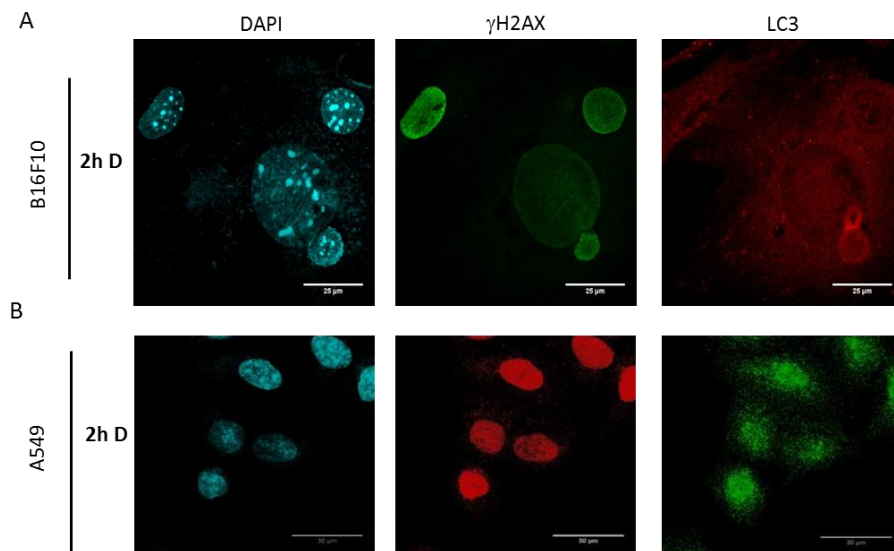


Figura 20. Daño al DNA y activación de autofagia en células tumorales. Imágenes obtenidas por microscopía confocal representativas de células B16F10 (en A) y A549 (en B) sometidas a tratamiento con etopósido durante 2h (2hD) y donde se detecta la presencia de la histona γ H2AX (indicativa de la presencia de rupturas de doble

cande en el DNA), así como de LC3 (que se incorpora a la membrana de los autofagosomas). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las barras de escala equivalen a 25 μm y 30 μm .

Dado que en el nucleolo no solo ocurre la biogénesis de ribosomas, sino que también suceden reacciones de edición de algunos RNA mensajeros y es además un reservorio de proteínas que participan en diferentes procesos nucleares incluyendo la respuesta de daño al DNA, resulta relevante el seguir caracterizando los componentes nucleolares que son degradados mediante nucleofagia, tanto en el contexto del daño al DNA, como en otros esquemas de estrés celular.

Evaluar el efecto de la inhibición simultánea de la actividad de proteasoma, así como de la autofagia, permitirá entender mejor la función individual y conjunta de estas vías de degradación en el contexto del estrés genotóxico.

Finalmente, la observación de la ocurrencia directa de la nucleofagia en tejidos, así como el seguimiento de este proceso en tiempo real fortalecerá la evidencia de que la nucleofagia contribuye a contender con el estrés genotóxico

10.- Referencias bibliográficas.

- Alchanati, I., Teicher, C., Cohen, G., Shemesh, V., Barr, H. M., Nakache, P., Ben-, D., Idelevich, A., Angel, I., Livnah, N., Tuvia, S., Reiss, Y., & Taglicht, D. (2009). *The E3 Ubiquitin-Ligase Bmi1 / Ring1A Controls the Proteasomal Degradation of Top2 a Cleavage Complex – A Potentially New Drug Target*. *4*(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008104>
- Aleksandrov, R., Hristova, R., Stoyanov, S., & Gospodinov, A. (2020). The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair. *Cells*, *9*(8).
<https://doi.org/10.3390/cells9081853>
- Alt, F. W., Wei, P. C., & Schwer, B. (2017). Recurrently Breaking Genes in Neural Progenitors: Potential Roles of DNA Breaks in Neuronal Function, Degeneration and Cancer. *Research and Perspectives in Neurosciences*, *9783319601915*, 63–72.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-60192-2_6
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R. I., Simon, A. K., Bjedov, I., Palikaras, K., Simonsen, A., Johansen, T., Tavernarakis, N., Rubinsztein, D. C., Partridge, L., Kroemer, G., Labbadia, J., & Fang, E. F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nature Aging*, *1*(8), 634–650. <https://doi.org/10.1038/S43587-021-00098-4>
- Ambrosio, S., & Majello, B. (2020a). Autophagy roles in genome maintenance. *Cancers*, *12*(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers12071793>
- Ambrosio, S., & Majello, B. (2020b). Autophagy roles in genome maintenance. *Cancers*, *12*(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers12071793>
- Atkin, N. D., Raimer, H. M., & Wang, Y. H. (2019). Broken by the cut: A journey into the role of topoisomerase ii in DNA fragility. *Genes*, *10*(10).
<https://doi.org/10.3390/genes10100791>
- Bae, H., & Guan, J. L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents. *Molecular Cancer Research*, *9*(9), 1232–1241. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0098>
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, *66*(6), 801–817.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>

- Blackford, A. N., & Stucki, M. (2020). How Cells Respond to DNA Breaks in Mitosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.12.010>
- Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S., & Pommier, Y. (2008). γ H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 957–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2523>
- Buzun, K., Bielawska, A., Bielawski, K., & Gornowicz, A. (2020). DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1781–1799. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1821676>
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Chen, J. H., Zhang, P., Chen, W. D., Li, D. D., Wu, X. Q., Deng, R., Jiao, L., Li, X., Ji, J., Feng, G. K., Zeng, Y. X., Jiang, J. W., & Zhu, X. F. (2015). ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells. *Autophagy*, 11(2), 239–252. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009767>
- Chen, W., Shen, T., Wang, L., & Lu, K. (2021). Oligomerization of selective autophagy receptors for the targeting and degradation of protein aggregates. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10081989>
- Denais, C., & Lammerding, J. (2014). *Nuclear Mechanics in Cancer* (pp. 435–470). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_20
- Desantis, A., Bruno, T., Catena, V., De Nicola, F., Goeman, F., Iezzi, S., Sorino, C., Ponzoni, M., Bossi, G., Federico, V., La Rosa, F., Ricciardi, M. R., Lesma, E., De Meo, P. D., Castrignanò, T., Petrucci, M. T., Pisani, F., Chesi, M., Bergsagel, P. L., ... Fanciulli, M. (2015). Che-1-induced inhibition of mTOR pathway enables stress-induced autophagy. *The EMBO Journal*, 34(9), 1214–1230. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201489920>
- Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangensteen, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., Capell, B. C., Xu, C., Xu, M., Kieckhafer, J. E., Jiang, T., Shoshkes-Carmel, M., Al Tanim, K. M. A., Barber, G. N., Seykora, J. T., ... Berger, S. L. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, 550(7676). <https://doi.org/10.1038/NATURE24050>

- Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J. A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Ricketts, M. D., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W. X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D., & Berger, S. L. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, *527*(7576), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature15548>
- Eliopoulos, A. G., Havaki, S., & Gorgoulis, V. G. (2016). DNA damage response and autophagy: A meaningful partnership. *Frontiers in Genetics*, *7*(NOV), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00204>
- Erenpreisa, J. A., Cragg, M. S., Fringes, B., Sharakhov, I., & Illidge, T. M. (2000). Release of mitotic descendants by giant cells from irradiated Burkitt's lymphoma cell lines. *Cell Biology International*, *24*(9), 635–648. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0558>
- Erenpreisa, J., Salmina, K., Huna, A., Kosmacek, E. A., Cragg, M. S., Ianzini, F., & Anisimov, A. P. (2011). Polyploid tumour cells elicit paradiplod progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell Biology International*, *35*(7), 687–695. <https://doi.org/10.1042/CBI20100762>
- Evans, C. J., & Aguilera, R. J. (2003). DNase II: Genes, enzymes and function. *Gene*, *322*(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.08.022>
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, *26*(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fracchiolla, D., Chang, C., Hurley, J. H., & Martens, S. (2020). A PI3K-WIP1 positive feedback loop allosterically activates LC3 lipidation in autophagy. *Journal of Cell Biology*, *219*(7). <https://doi.org/10.1083/JCB.201912098>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., ... Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, *22*(1), 58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Galluzzi, L., Yamazaki, T., & Kroemer, G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(11), 731–745. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0>

- Gauthier, B. R., & Comaills, V. (2021). Nuclear envelope integrity in health and disease: Consequences on genome instability and inflammation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147281>
- Gay, S., & Foiani, M. (2015). Nuclear Envelope and Chromatin, Lock and Key of Genome Integrity. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 317, 267–330. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.03.001>
- Gill Super, H. J. (2015). A role for epigenetics in the formation of chromosome translocations in acute leukemia. *Cancer Genetics*, 208(5), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.03.006>
- Gómez-Sánchez, R., Tooze, S. A., & Reggiori, F. (2021). Membrane supply and remodeling during autophagosome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 71, 112–119. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2021.02.001>
- Goodarzi, A. A., & Jeggo, P. A. (2013). The Repair and Signaling Responses to DNA Double-Strand Breaks. In *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 82). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407676-1.00001-9>
- Hewitt, G., Carroll, B., Sarallah, R., Correia-Melo, C., Ogrodnik, M., Nelson, G., Otten, E. G., Manni, D., Antrobus, R., Morgan, B. A., von Zglinicki, T., Jurk, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Johansen, T., Passos, J. F., & Korolchuk, V. I. (2016). SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy*, 12(10), 1917–1930. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1210368>
- Hewitt, G., & Korolchuk, V. I. (2017). Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. *Trends in Cell Biology*, 27(5), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.011>
- Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J., & Stopper, H. (2017). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 771, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.02.002>
- Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., Liu, B., Chang, C., Zhou, T., Lippincott-Schwartz, J., & Liu, W. (2015). Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Molecular Cell*, 57(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.013>

- Huang, Y., Hou, H., Yi, Q., Zhang, Y., Chen, D., Jiang, E., Xia, Y., Fenech, M., & Shi, Q. (2011). The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging. *DNA Repair*, *10*(6), 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.010>
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., Tuyn, J. Van, Nelson, D. M., Singh Rai, T., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., & Berger, Shelley L, Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *Journal of Cell Biology*, *202*(1), 129–143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *2009* *461*:7267, *461*(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Johnston, H. E., & Samant, R. S. (2021). Alternative systems for misfolded protein clearance: life beyond the proteasome. *FEBS Journal*, *288*(15), 4464–4487. <https://doi.org/10.1111/febs.15617>
- Joshi, A., Iyengar, R., Joo, J. H., Li-Harms, X. J., Wright, C., Marino, R., Winborn, B. J., Phillips, A., Temirov, J., Sciarretta, S., Kriwacki, R., Peng, J., Shelat, A., & Kundu, M. (2016). Nuclear ULK1 promotes cell death in response to oxidative stress through PARP1. *Cell Death and Differentiation*, *23*(2), 216–230. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.88>
- Kalsbeek, D., & Golsteyn, R. M. (2017). G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS18112344>
- Karabiyik, C., Vicinanza, M., Son, S. M., & Rubinsztein, D. C. (2021). Glucose starvation induces autophagy via ULK1-mediated activation of PIKfyve in an AMPK-dependent manner. *Developmental Cell*, *56*(13), 1961–1975.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.05.010>
- Kenzelmann Broz, D., Mello, S. S., Biegging, K. T., Jiang, D., Dusek, R. L., Brady, C. A., Sidow, A., & Attardi, L. D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes and Development*, *27*(9), 1016–1031. <https://doi.org/10.1101/gad.212282.112>
- Kisurina-Evgenieva, O. P., Sutiagina, O. I., & Onishchenko, G. E. (2016). Biogenesis of micronuclei. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(5), 453–464. <https://doi.org/10.1134/s0006297916050035>

- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). In *Autophagy*. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E., ... Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, *40*(19). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108863>
- Korsholm, L. M., Gál, Z., Nieto, B., Quevedo, O., Boukoura, S., Lund, C. C., & Larsen, D. H. (2020). Recent advances in the nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *48*(17), 9449–9461. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa713>
- Kwon, M., Leibowitz, M. L., & Lee, J. H. (2020). Small but mighty: the causes and consequences of micronucleus rupture. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(11), 1777–1786. <https://doi.org/10.1038/S12276-020-00529-Z>
- Latonen, L. (2011). Nucleolar aggresomes as counterparts of cytoplasmic aggresomes in proteotoxic stress. *BioEssays*, *33*(5), 386–395. <https://doi.org/10.1002/bies.201100008>
- Latonen, L. (2019). Phase-to-phase with nucleoli - Stress responses, protein aggregation and novel roles of RNA. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00151>
- Lee, I. H., Kawai, Y., Fergusson, M. M., Rovira, I. I., Bishop, A. J. R., Motoyama, N., Cao, L., & Finkel, T. (2012). Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science*, *336*(6078), 225–228. <https://doi.org/10.1126/science.1218395>
- Lenain, C., Gussyatiner, O., Douma, S., van den Broek, B., & Peeper, D. S. (2015). Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis*, *36*(11), 1263–1274. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv124>
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, *396*(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>

- Liang, X. H., Yu, J., Brown, K., & Function, T. S. (2001). *Beclin 1 Contains a Leucine-rich Nuclear Export Signal That Is Required for Its Autophagy and Tumor Suppressor Function*. *Beclin 1 Contains a Leucine-rich Nuclear Export Signal That Is Required for Its*. *26*, 3443–3449.
- Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., Cai, Y., Norberg, H. V., Zhang, T., Furuya, T., Jin, M., Zhu, Z., Wang, H., Yu, J., Li, Y., Hao, Y., Choi, A., Ke, H., Ma, D., & Yuan, J. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*, *147*(1), 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.037>
- Luhtala, N., & Parker, R. (2010). T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(5), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.02.002>
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C., Stott, R. T., Gjonneska, E., Nott, A., Cho, S., Kellis, M., & Tsai, L. H. (2015). Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. In *Cell* (Vol. 161, Issue 7, pp. 1592–1605). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.032>
- Marcomini, I., & Gasser, S. M. (2015). Nuclear organization in DNA end processing: Telomeres vs double-strand breaks. *DNA Repair*, *32*, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.024>
- Maskey, D., Yousefi, S., Schmid, I., Zlobec, I., Perren, A., Friis, R., & Simon, H. U. (2013). ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. *Nature Communications*, *4*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms3130>
- Medvedeva, N. G., Panyutin, I. V., Panyutin, I. G., & Neumann, R. D. (2007). Phosphorylation of histone H2AX in radiation-induced micronuclei. *Radiation Research*, *168*(4), 493–498. <https://doi.org/10.1667/RR0788.1>
- Melia, T. J., Lystad, A. H., & Simonsen, A. (2020). Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *The Journal of Cell Biology*, *219*(6). <https://doi.org/10.1083/JCB.202002085>
- Miller, K. N., Dasgupta, N., Liu, T., Adams, P. D., & Vizioli, M. G. (2021). Cytoplasmic chromatin fragments—from mechanisms to therapeutic potential. *eLife*, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63728>

- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-09-0704>
- Mu, H., Liu, Q., Niu, H., Wang, D., Tang, J., & Duan, J. (2016). Autophagy promotes DNA-protein crosslink clearance. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 797, 21–25. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2015.12.001>
- Nunes, V. S., & Moretti, N. S. (2017). Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biology International*, 41(1), 2–7. <https://doi.org/10.1002/cbin.10703>
- Ohkouchi, S., Shibata, M., Sasaki, M., Koike, M., Safig, P., Peters, C., Nagata, S., & Uchiyama, Y. (2013). Biogenesis and Proteolytic Processing of Lysosomal DNase II. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059148>
- Ou, H., & Schumacher, B. (2019). *Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts DNA damage responses and p53 in the aging process*. 131(5), 488–495. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-746396.DNA>
- Papandreou, M. E., & Tavernarakis, N. (2021). Selective autophagy as a potential therapeutic target in age-associated pathologies. In *Metabolites* (Vol. 11, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/metabo11090588>
- Park, Y. E., Hayashi, Y. K., Bonne, G., Arimura, T., Noguchi, S., Nonaka, I., & Nishino, I. (2009). Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*, 5(6), 795–804. <https://doi.org/10.4161/auto.8901>
- Prokhorova, E. A., Egorshina, A. Y., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020). The DNA-damage response and nuclear events as regulators of nonapoptotic forms of cell death. *Oncogene*, 39(1). <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0980-6>
- Rello-Varona, S., Lissa, D., Shen, S., Niso-Santano, M., Senovilla, L., Mariño, G., Vitale, I., Jemaà, M., Harper, F., Pierron, G., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle*, 11(1), 170–176. <https://doi.org/10.4161/cc.11.1.18564>
- Riccio, A. A., Schellenberg, M. J., & Williams, R. S. (2020). Molecular mechanisms of topoisomerase 2 DNA-protein crosslink resolution. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1), 81–91. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03367-z>

- Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., & Kirkin, V. (2014). Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Molecular Cell*, *53*(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.014>
- Rohrback, S., Siddoway, B., Liu, C. S., & Chun, J. (2018). Genomic mosaicism in the developing and adult brain. *Developmental Neurobiology*, *78*(11), 1026–1048. <https://doi.org/10.1002/DNEU.22626>
- Salmina, K., Huna, A., Inashkina, I., Belyayev, A., Krigerts, J., Pastova, L., Vazquez-Martin, A., & Erenpreisa, J. (2017). Nucleolar aggresomes mediate release of pericentric heterochromatin and nuclear destruction of genotoxically treated cancer cells. *Nucleus*, *8*(2), 205–221. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1279775>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(4), 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>
- Simon, H. U., Friis, R., Tait, S. W. G., & Ryan, K. M. (2017). Retrograde signaling from autophagy modulates stress responses. *Science Signaling*, *10*(468), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag2791>
- Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. V, Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A. C., Mucke, L., Francisco, S., Francisco, S., Francisco, S., & Francisco, S. (2013). *HHS Public Access*. *16*(5), 613–621. <https://doi.org/10.1038/nn.3356.Physiological>
- Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(15), 5414–5424. <https://doi.org/10.1074/JBC.R117.818237>
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, *705*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.03.004>

- Utani, K. I., Kohno, Y., Okamoto, A., & Shimizu, N. (2010). Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS ONE*, *5*(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010089>
- Vann, K. R., Oviatt, A. A., & Osheroff, N. (2021). Topoisomerase II Poisons: Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors. *Biochemistry*, *60*(21), 1630.
<https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.1C00240>
- Vimal, D. (2018). Nucleus. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1–4). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_178-1
- Wang, Y., Zhang, N., Zhang, L., Li, R., Fu, W., Ma, K., Li, X., Wang, L., Wang, J., Zhang, H., Gu, W., Zhu, W. G., & Zhao, Y. (2016). Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Molecular Cell*, *63*(1), 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.027>
- Xu, F., Fang, Y., Yan, L., Xu, L., Zhang, S., Cao, Y., Xu, L., Zhang, X., Xie, J., Jiang, G., Ge, C., An, N., Zhou, D., & Yuan, N. (2017). Nuclear localization of Beclin 1 promotes radiation-induced DNA damage repair independent of autophagy. *March*, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep45385>
- Xu, J. (2005). Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1–8.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2801s70>
- Ye, C. J., Sharpe, Z., Alemara, S., Mackenzie, S., Liu, G., Abdallah, B., Horne, S., Regan, S., & Heng, H. H. (2019). Micronuclei and genome chaos: Changing the system inheritance. *Genes*, *10*(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/genes10050366>

11.- Anexos.

11.1. Tabla 1. Lista de anticuerpos empleados.				
Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Número de catálogo	Marca	Dilución empleada	Solución para dilución
<i>mouse anti-gamma-H2AX</i>	ab26350	ABCAM Cambridge, MA, USA	IF: 1:1000	1
			WB: 1:1000	3
<i>mouse anti-Lamin A/C</i>	sc-376248	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	IF: 1:1000	1
			WB: 1:1000	3
<i>rabbit anti-Lamin B1</i>	ab16048	ABCAM Cambridge, MA, USA	IF: 1:1000	1
			WB: 1:1000	2
<i>rabbit anti-LC3</i>	2775S	Cell Signalling, Beverly, MA, USA	WB: 1:1000	3
<i>rabbit anti-LC3</i>	PD014	MBL, Nagoya, Japan	IF: 1:500	1
			IG: 1:500	3
<i>rabbit anti-Beclin1</i>	sc-11427	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	IF: 1:100	1
			WB: 1:100	3
<i>mouse anti-TOP2A</i>	sc-365916	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	IF: 1:100	1
			WB 1:100	3
<i>mouse anti-TOP2B</i>	sc-25330	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	IF: 1:100	1
			WB: 1:100	3
<i>rabbit anti-Fibrillarin</i>	ab5821	ABCAM Cambridge, MA, USA	IF: 1:1000	1
			WB: 1:1000	3
<i>rabbit anti-βActin</i>	sc-8432	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	WB: 1:10,000	3
<i>mouse anti-α-Tubulin</i>	3873	Cell Signalling, Beverly, MA, USA	WB: 1:10,000	3
Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia				
<i>Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor A594</i>	A11032	LIFE TECHNOLOGIES, Oregon, USA.	1:500	1
<i>Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor A594</i>	A11037		1:500	1
<i>Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor A488</i>	A11029		1:500	1
<i>Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor A488</i>	A11029		1:500	1
Anticuerpos secundarios para WB				
<i>IRDye® 680RD goat anti-rabbit</i>	925-68071	LI-COR, Lincoln, NE, USA	WB: 1:5000	3
<i>IRDye® 800CW goat anti-mouse</i>	925-32210		WB: 1:5000	3
Anticuerpos secundarios para inmunogold				

<i>donkey anti-rabbit IgG (H&L) conjugated to 25-nm gold particles</i>	25708	<i>Aurion, Electron Microscopy Science, PA, USA</i>	1:20	4
<i>donkey anti-mouse IgG (H&L) conjugated to 15-nm gold particles</i>	25817		1:20	4
<p>Soluciones para dilución de anticuerpos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- BSA al 2% en PBS 2.- Leche al 3% en TBST 3.- BSA 5% en TBST 4.- Glicina 25 mM, Tween 20 al 0.005% y tritón X-100 al 0.01%. Diluyente: PBS. 				

11.2.- Lista de publicaciones generadas durante el programa de doctorado.

1. Muciño-Hernández G, Acevo-Rodríguez PS, Cabrera-Benitez S, Guerrero AO, Merchant-Larios H, Castro-Obregón S. **Nucleophagy contributes to genome stability through degradation of type II topoisomerase A and B and nucleolar components.** J Cell Sci. 2023 Jan 1;136(1):jcs260563. doi: 10.1242/jcs.260563. Epub 2023 Jan 12. PMID: 36633090.
2. Muciño-Hernández G, Castro-Obregón S, Hernández-Pardo, R. and Del Rio, G. (2016) **"Autophagy as a target for therapeutic uses of multifunctional peptides"**. IUBMB Life 68(4):259-67. DOI 10.1002/iub.1483. ISSN 1521-6551.
3. Muciño-Hernández G, Moreno-Blas D, Castro-Obregón S, **"Molecular mechanism of mammalian nucleophagy and its potential role to determine cell fate"**. (En revision).

11.3.- Lista de publicaciones en colaboración.

1. Erika A. Peláez Coyotl, Jacqueline Barrios Palacios, **Gabriel Muciño**, Daniel Moreno Blas, Miguel Costas, Teresa Montiel Montes, Christian Diener, Salvador Uribe-Carvajal, Lourdes Massieu, Susana Castro-Obregón, Octavio Ramos-Espinoza, Dulce Mata Espinosa, Jorge Barrios Payan, Juan Carlos Leon-

- Contreras, Gerardo Corzo, Rogelio Hernandez-Pando, Gabriel Del Rio. (2020). **“Antimicrobial peptide against Mycobacterium tuberculosis that activates autophagy is an effective treatment for tuberculosis.”** *Pharmaceutics* 12(11), 1071; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111071>. ISSN 1999-4923. Factor de impacto 4.4
2. Enrique Chávez, Gabriela Velasco-Loyden¹ María Guadalupe Lozano-Rosas, Beatriz Aguilar, **Gabriel Muciño-Hernández**, Susana Castro-Obregón, Victoria Chagoya de Sánchez. (2020). **“Role of autophagy in the chemopreventive effect of the IFC-305 compound in the sequential model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma in the rat and in vitro”**. *American Journal of Cancer Research* 10(6):1844-1856. www.ajcr.us /ISSN:2156-6976. /ajcr0114242. Factor de impacto JCR 2019: 5.177
 3. Gabriela Zárraga-Granados, **Gabriel Muciño-Hernández**, María R. Sánchez-Carbente, Wendy Villamizar-Gálvez, Ana Peñas-Rincón, Cristian Arredondo, María E. Andrés, Christopher Wood, Luis Covarrubias, and Susana Castro-Obregón*. (2020). **“The nuclear receptor Nr4A1 is modified by SUMO modification to induce autophagic cell death”**. *PLoS ONE* 15(3): e0222072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222072>. Factor de impacto 4.11.
 4. Daniel Moreno-Blas, Elisa Gorostieta-Salas, Alexander Pommer-Alba, **Gabriel Muciño-Hernandez**, Cristian Gerónimo-Olvera, Luis Ángel Maciel-Barón, Mina Konigsberg, Lourdes Massieu-Trigo and Susana Castro-Obregon*. (2019). **“Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy”**. *Aging (Albany, NY)* 11(16):6175-6178. <https://doi.org/10.18632/aging.102181>. JCR 5 años Factor de impacto 5.5, Q1. ONLINE ISSN: 1945-4589.

RESEARCH ARTICLE

Nucleophagy contributes to genome stability through degradation of type II topoisomerases A and B and nucleolar components

Gabriel Muciño-Hernández¹, Pilar Sarah Acevo-Rodríguez¹, Sandra Cabrera-Benitez², Adán Oswaldo Guerrero³, Horacio Merchant-Larios⁴ and Susana Castro-Obregón^{1,*}

ABSTRACT

The nuclear architecture of mammalian cells can be altered as a consequence of anomalous accumulation of nuclear proteins or genomic alterations. Most of the knowledge about nuclear dynamics comes from studies on cancerous cells. How normal healthy cells maintain genome stability, avoiding accumulation of nuclear damaged material, is less understood. Here, we describe that primary mouse embryonic fibroblasts develop a basal level of nuclear buds and micronuclei, which increase after etoposide-induced DNA double-stranded breaks. Both basal and induced nuclear buds and micronuclei colocalize with the autophagic proteins BECN1 and LC3B (also known as MAP1LC3B) and with acidic vesicles, suggesting their clearance by nucleophagy. Some of the nuclear alterations also contain autophagic proteins and type II DNA topoisomerases (TOP2A and TOP2B), or the nucleolar protein fibrillarin, implying they are also targets of nucleophagy. We propose that basal nucleophagy contributes to genome and nuclear stability, as well as in response to DNA damage.

KEY WORDS: Mammalian nucleophagy, Autophagy, DNA damage, Nucleolus, Micronuclei

INTRODUCTION

Genome stability is essential for the proper function of the cells, Genome instability is also a common feature of several pathologies primary affecting the nervous, immune and reproductive systems, and it also contributes to neurodevelopmental disorders, neurodegeneration, cancer development and premature aging (Ciccía and Elledge, 2010). From early in the developmental process of organisms, DNA is under constant endogenous challenges, for example when local abundant cell proliferation leads to DNA replication stress. It has been uncovered recently

that cells produce DNA breaks as a physiological mechanism. For example, in response to TGFβ1-induced epithelial-to-mesenchymal transition (Dobersch et al., 2021; Singh et al., 2015), as well as in active neurons (Madabhushi et al., 2015), DNA double-strand breaks (DSBs) facilitate chromatin opening to initiate transcription of early-response genes. Another source of physiological DSBs is the active recombination that occurs during differentiation of B and T immune cells to produce multiple antibodies and receptors, respectively (Schatz and Ji, 2011). Interestingly, in primary neural stem and progenitor cells, a set of genes related to neuronal function are targets of active DSBs, suggesting that a recombination event similar to that seen in immune system development also occurs in the nervous system (Alt et al., 2017). These active DSBs and their repair could provide a mechanistic explanation for the mosaic nature of the mammalian brain recently described, pointing out that such genome dynamics processes also exist in post-mitotic cells (Rohrbach et al., 2018). Additionally, there are exogenous challenges to DNA integrity, such as DNA chemical modifications and DNA breaks caused by reactive oxygen species derived from normal cell metabolism. Exogenous sources of reactive oxygen species come from radiation and chemicals, giving rise to multiple types of DNA modifications. Therefore, DNA integrity needs to be constantly monitored and repaired. Eukaryotic cells have developed a network of intracellular pathways that sense DNA damage, signal to coordinate a cellular response and repair damaged DNA, collectively known as the DNA damage response (DDR). An example of a DNA lesion sensor is ATM kinase, which phosphorylates mediator proteins, such as histone variant H2AX (with the phosphorylated form known as γH2AX) (Ciccía and Elledge, 2010). γH2AX is phosphorylated at serine 139 (Rogakou et al., 1998) at sites nearby to DSBs, which in turn initiates a cascade of DNA repair factor assembly (Ciccía and Elledge, 2010).

The DDR regulates the recruitment of DNA repair molecules suitable to repair particular types of DNA damage. A defective DDR leads to genomic instability manifested either as minor chromosomal alterations or as pronounced chromosomal rearrangements (Langie et al., 2015). Owing to the repetitive nature of ribosomal DNA present in the nucleolus, and its active transcription, this genomic region is especially susceptible to instability. Hence, chromosomal rearrangements of ribosomal DNA is frequently observed in tumor cells (Korsholm et al., 2020). Accumulation of genomic alterations can affect the nuclear structure, eliciting the extrusion of nuclear content into the cytoplasm, forming nuclear buds and micronuclei. The latter are fragments of chromosomes or whole chromosomes surrounded by nuclear envelope (Fenech et al., 2011; Kisurina-Evgenieva et al., 2016; Rao et al., 2008). The presence of micronuclei contributes to malignant cell transformation (Hintzsche et al., 2017). It is essential to remove micronuclei before their nuclear envelope is damaged,

¹Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, México. ²Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, México. ³Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. ⁴Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico.

*Author for correspondence (scastro@ifc.unam.mx)

© S.C.-B., 0000-0003-3700-3371; A.O.G., 0000-0002-4389-5516; H.M.-L., 0000-0001-5330-6634; S.C.-O., 0000-0003-0549-5690

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Handling Editor: Maria Carmo-Fonseca
Received 21 August 2022; Accepted 24 November 2022

since micronuclear envelope rupture causes gain or loss of genetic material and chromothripsis (extensive chromosome rearrangements confined to one or few chromosomes). Micronuclear envelope rupture also leads to DNA exposure to the cytoplasm, activating the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-STING pathway, which triggers the innate immune response inducing inflammation (Kwon et al., 2020). In senescent cells, fragments of chromatin containing damaged DNA are expelled from nuclei into the cytoplasm free of nuclear envelope, and are called cytoplasmic chromatin fragments (Ivanov et al., 2013). Cytoplasmic chromatin fragments also trigger inflammation by the activation of the cGAS-STING pathway (Dou et al., 2017).

Gene transcription, replication, recombination etc. generate DNA entanglements (coiling and winding of the DNA double helix), which are resolved by DNA topoisomerases. Among them, type II topoisomerases (TOP2; TOP2A and TOP2B in mammals) catalyze the resolution of DNA entanglements by creating transient DNA DSBs that allow topological changes. During this process, TOP2 binds covalently to the 5' end in the broken DNA forming a transitory intermediate cleavage complex (TOP2cc). Etoposide is a topoisomerase poison that stabilizes TOP2cc by misaligning DNA ends. This action prevents re-ligation, which results in trapping of TOP2 on DNA termini, generating cytotoxic protein-linked DNA breaks that cells need to eliminate to avoid genome instability (Ashour et al., 2015; Austin et al., 2018).

In mammals, specifically in cancer cell lines, macroautophagy (hereafter autophagy) is activated by genotoxic stress (Chen et al., 2015) and contributes to the removal of extruded nuclear material (Erenpreisa et al., 2011; Rello-Varona et al., 2012; Zhao et al., 2021). Cytoplasmic chromatin fragments in senescent cells are also removed by autophagy (Ivanov et al., 2013). In autophagy-deficient cells, chromosomal abnormalities and deficiencies in DNA damage repair occur (Bae and Guan, 2011; Chicote et al., 2020). Hence, autophagy seems to be protective of the genome, as the activation of different DNA repair pathways triggers autophagy, contributing to resolution of genomic instability (Eliopoulos et al., 2016). The degradation of nuclear components by the autophagic machinery is coined nucleophagy. Recently, the cGAS protein has been proposed to function as a nucleophagy receptor (Zhao et al., 2021).

In this work, we hypothesized that nucleophagy could be a mechanism to maintain nuclear and genome integrity in normal (noncancerous) cells, in response to DNA-damaging agents. We found that primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) developed nuclear buds and micronuclei in response to DSB caused by etoposide. Nuclear alterations contained damaged DNA and TOP2cc (Austin et al., 2018), as well as nucleolar components such as the rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin. These nuclear alterations were surrounded by the autophagic proteins LC3B (also known as MAP1LC3B) and BECN1, in proximity with lysosomal markers, indicative of their potential elimination by nucleophagy. Inhibition of autophagy reduced the frequency of nuclear buds, suggesting an active role of the autophagic machinery in their formation. Surprisingly, we observed that the number of micronuclei increased in the absence of the autophagic protein ATG4, supporting the notion that buds and micronuclei have different mechanisms of formation. Interestingly, we also observed basal development of nuclear buds and micronuclei in control cells, which were also surrounded by autophagy machinery. Collectively, our data show that nucleophagy contributes to preserve nuclear cell physiology by constantly clearing damaged DNA through nuclear buds and micronuclei elimination, both at basal levels and in response to genotoxic stress.

RESULTS

Nuclear buds and micronuclei form in primary fibroblasts and increase with etoposide-induced DSBs

Given that most of our knowledge about micronuclei formation and elimination comes from studies with cancerous cells, we aimed to study micronuclei formation induced by DSBs, which are the most toxic DNA lesions for cells, in primary cells (Ciccia and Elledge, 2010). Primary MEFs were treated with 120 μ M etoposide for 2 h to cause DSBs that were detectable by a neutral comet assay. Mean comet tail length increased from a mean of 39.54 \pm 7.594 μ m (s.d.) in untreated cells to 122.8 \pm 22.08 μ m (mean \pm s.d.; P <0.0001) after 2 h of etoposide treatment. To analyze DNA repair, etoposide was removed (see Fig. 1A for experimental design). DSBs were gradually repaired, having shorter comet tails (107.9 \pm 8.894 μ m, P <0.0001) at 3 h after etoposide removal, and becoming almost undetectable after 5 h of recovery (comet tail length 48.33 \pm 8.994 μ m; P =0.0119). 50 comets were measured in each of three independent experiments (Fig. 1B; Fig. S1A; raw data are presented in Table S1). We evaluated the contribution of autophagy to DNA repair in our model. Spautin1 is an autophagy inhibitor that acts by promoting BECN1 and PI3K-III degradation (Liu et al., 2011). We treated cells with Spautin1 for 12 h before etoposide treatment. As can be observed in Fig. 1C, autophagy inhibition increased the level of DSBs produced after 2 h of etoposide treatment from a mean comet tail length of 89.05 \pm 22.28 μ m in etoposide only cells, to 121.4 μ m (\pm 31.91; P <0.0001) in Spautin1 plus etoposide cells. In cells pre-treated with Spautin1, DNA repair occurred with a reduction of mean comet tail to 59.77 \pm 8.2 μ m, although to a lesser extent than when cells were exposed to etoposide only (45.44 \pm 6.23 μ m), remaining statistically different after 5 h of recovery (P =0.005). This observation suggests that autophagy contributes to DNA stability. We then evaluated DDR activation by analyzing the recruitment of the DNA damage marker γ H2AX. We observed at 2 h of etoposide exposure abundant γ H2AX (a mean \pm s.d. of 15,002 \pm 6223 arbitrary fluorescent units) compared to untreated control cells (675.3 \pm 569.3 arbitrary fluorescent units; P <0.0001). The level of γ H2AX was reduced after 5 h of recovery to 4635 \pm 3367 arbitrary fluorescent units (P <0.0001) (Fig. 1D; Fig. S1B). Cell viability remained \geq 80% during both DNA damage and repair (Fig. S1C). High levels of DNA damage leads to deformations of nuclear architecture and micronuclei formation (Kisurina-Evgenieva et al., 2016; Medvedeva et al., 2007), and the induction of multiple DSBs results in the budding of nuclear envelope and micronuclei formation (Okamoto et al., 2012; Utani et al., 2011). Hence, we analyzed the nuclear structure of MEFs treated with a sublethal dose of etoposide. As expected, we found that etoposide-treated cells bear nuclear protrusions or buds containing damaged DNA, identified by γ H2AX. Interestingly, we also found nuclear buds and micronuclei in a subpopulation of control untreated cells (Fig. 1E). This observation implies that cells normally have a basal dynamic formation of nuclear buds and micronuclei, which to our knowledge has not been reported before. Interestingly, although the frequency of nuclear buds gradually increased after DNA damage from 15.09 \pm 3.19% (mean \pm s.d.) in untreated cells to 19.43 \pm 7.52% (P =0.3362) after 2 h of damage, and then to 28.37 \pm 9.06% (P =0.001) after 5 h of DNA repair, the frequency of micronuclei also increased after DNA damage from 5.096 \pm 2.75% to 9.207 \pm 3.46% (P =0.0492), but diminished upon DNA repair to 5.98 \pm 4.63% (P =0.8309) (Fig. 1F). We observed that the cytoplasmic damaged DNA was contained within micronuclei, as they were found surrounded by lamin A/C and lamin B1. In some micronuclei,

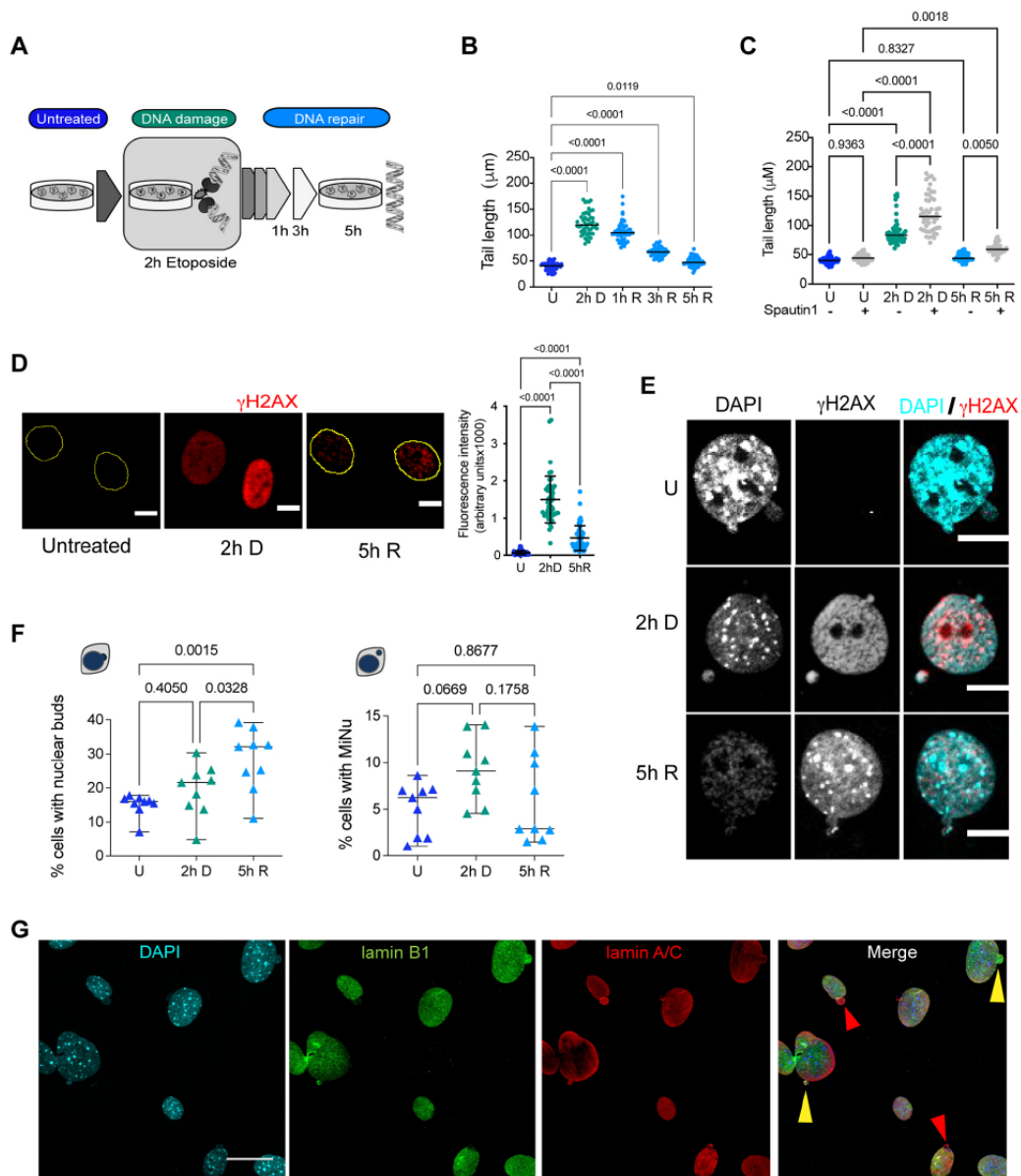


Fig. 1. See next page for legend.

we observed only lamin A/C (Fig. 1G). The reduction in the frequency of micronuclei once DNA has been repaired suggests that the onset of buds and micronuclei formation upon DNA damage has a similar dynamic, but micronuclei are being actively removed during DNA repair.

Autophagy is necessary for basal and DSB-induced nuclear bud formation and micronuclei removal in primary fibroblasts
In cancerous cell lines, micronuclei removal is carried out by nucleophagy (Erenpreisa et al., 2011; Rello-Varona et al., 2012).

We asked whether basal or DNA damage-induced nuclear buds and micronuclei could also be eliminated by nucleophagy in primary MEFs.

We followed the distribution of GFP-tagged LC3B (GFP-LC3) in nuclear alterations and found that $52.3 \pm 8.2\%$ (mean \pm s.d.) of the nuclear buds and micronuclei contained GFP-LC3 in control cells, $60.3 \pm 8.7\%$ after 2 h of DNA damage, and $69.7 \pm 17.5\%$ after 5 h of DNA repair (Fig. 2A,B). We also monitored the intracellular distribution of BECN1, another protein required for autophagosome formation (Zeng et al., 2006). Just as with LC3B, we found that 34.5

Fig. 1. There is a basal formation of nuclear buds and micronuclei in primary fibroblasts, which increases with etoposide-mediated induction of DSBs. (A) Workflow for the DNA damage and repair assay. MEFs were exposed to 120 μ M etoposide for 2 h to damage DNA (2 h D), then etoposide was removed to allow DNA repair, which was monitored after 1, 3 or 5 h. (B) Quantification of comet tail length (which is proportional to the number of DSBs) in untreated cells (U), after 2 h of etoposide exposure (2 h D), and after 1 h, 3 h or 5 h of etoposide removal (1 h R, 3 h R, 5 h R, respectively). Bars represent median at each time point, statistical significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test; adjusted *P*-value is indicated for each comparison. 50 comets were measured in each of three independent experiments. Detailed data are shown in Table S1. (C) Quantification of comet tail length in untreated cells (U), after 2 h of etoposide exposure (2 h D), and 5 h of etoposide removal (5 h R), previously treated for 12 h with vehicle (–) or 10 μ M Spautin1 (+). Bars represent median at each time point, statistical significant differences were determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test; adjusted *P*-value is indicated for each comparison. 50 comets were measured in each of three independent experiments. Detailed data are shown in Table S1. (D) DDR followed by the recruitment of γ H2AX in untreated (U), damaged (2 h D) or repaired (5 h R) DNA. Yellow contours indicate the nuclei of cells. Scale bars: 10 μ m. The fluorescence signal was quantified in 48 cells per experiment in three independent experiments and the mean \pm s.d. is graphed to the right. Statistical significant difference was determined by One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test; adjusted *P*-value is indicated for each comparison. Detailed data are shown in Table S1. (E) Nuclear buds or independent micronuclei were observed by confocal microscopy in untreated (U), damaged (2 h D) or repaired (5 h R) DNA. DNA damaged marked with γ H2AX (red) was found in both buds and micronuclei, mainly when cells were treated with etoposide. DNA was stained with DAPI. Scale bars: 10 μ m. (F) Quantification of the percentage of cells with nuclear buds or micronuclei (MiNu) in untreated (U), damaged (2 h D) or repaired (5 h R) DNA. The mean \pm s.d. of nine independent experiments is graphed. Statistical significant difference was determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test; adjusted *P*-value is indicated for each comparison. For every experiment (represented as triangles) at least 50 cells were counted; detailed data are shown in Table S1. (G) Representative immunofluorescence images from five independent experiments to detect lamin A/C (red) and lamin B1 (green) in MEFs treated with etoposide for 2 h (2 h D). Yellow arrowheads show examples of buds containing both lamin A/C and lamin B1. Red arrowheads show examples of buds containing only lamin A/C. Scale bar: 30 μ m.

$\pm 8.3\%$ (mean \pm s.d.) of the nuclear buds and micronuclei contained BECN1 in untreated cells, which increased to $55.7\pm 1.9\%$ after DNA damage and slightly decreased to $52.9\pm 10.2\%$ after 5 h of DNA repair (Fig. 2A,C). We also noticed a nuclear enrichment of both GFP-LC3 and BECN1 (a representative wider field is shown in Fig. S2), which agrees with previous observations indicating that autophagy mediates degradation of the nuclear lamina through a direct interaction between LC3B and lamin B1 in proliferating cells, and this interaction helps to translocate lamin B1 into the cytoplasm for its lysosomal degradation during oncogene-induced senescence (Dou et al., 2015). We speculated that LC3B could also contribute to the translocation of nuclear damaged material into the cytoplasm for autolysosomal degradation in primary cells. We analyzed whether nuclear buds and micronuclei were associated with autolysosomes. We found micronuclei containing DNA and LC3B, stained with LysoTracker[®] (Fig. 2A) and for BECN1 (Fig. S2). Interestingly, we noticed that 22.48% of untreated cells also had nuclear buds and micronuclei containing LC3B and 20.99% had these containing BECN1. This observation suggests that there is a basal level of nuclear dynamics, constantly forming nuclear protrusions and micronuclei, perhaps to eliminate genomic alterations that are frequently produced. We confirmed the micronuclei nature of the cytoplasmic vesicles with DNA and LC3B by detecting lamin A/C

(Fig. 2D). To determine a causal role of the autophagic machinery in nuclear bud and micronuclei removal, the expression of *Atg7*, a member of the ubiquitin-like system required for autophagosome elongation (Simon et al., 2017), was silenced by specific siRNA before DNA damage induction. Surprisingly, the percentage of cells with nuclear buds decreased from them being present in $19.8\pm 4.16\%$ (mean \pm s.d.) of control cells to $8.54\pm 4.25\%$ in *siAtg7* cells. In response to etoposide-induced DSBs, the percentage of cells containing buds dropped from $26.68\pm 2.56\%$ of control cells to $15.56\pm 1.12\%$ of *siAtg7* cells; after 5 h of DNA repair a similar response was observed – the percentage of cells having nuclear buds were reduced from $38.14\pm 8.22\%$ of control cells to $23.28\pm 5.83\%$ of *siAtg7* cells, as shown in Fig. 2F. Interestingly, we also observed a small reduction in the percentage of cells with micronuclei when *Atg7* was silenced, although no statistical significant difference was found. We observed $3.86\pm 3.46\%$ of cells with micronuclei in control cells, and $1.82\pm 1.76\%$ in *siAtg7* cells. When DNA was damaged, we found $6.03\pm 3.59\%$ of cells with micronuclei and $5.25\pm 2.76\%$ of *siAtg7* cells. After 5 h of DNA repair $4.95\pm 2.77\%$ of cells had micronuclei, and $2.38\pm 1.34\%$ in *siAtg7* cells (Fig. 2F). These results suggest that components of the autophagy machinery actively induce the formation of nuclear buds but perhaps does not participate in micronuclei formation to the same extent. To confirm the contribution of the autophagic machinery in formation of nuclear alterations and their elimination, we used *Atg4b*^{–/–} MEFs, which have deficient autophagy demonstrated by a lack of LC3B-I conversion to LC3B-II, and an accumulation of the autophagic receptor p62/SQSTM1 (which is degraded by autophagy) (Fig. 2G). Whereas the percentage of control wild-type (WT) MEFs with buds was $17.98\pm 7.02\%$, in *Atg4b*^{–/–} MEFs it was only $7.89\pm 2.77\%$. After 2 h of DNA damage, $24.51\pm 9.83\%$ of control WT MEFs had buds, whereas just $5.21\pm 1.03\%$ of *Atg4b*^{–/–} MEFs had buds. And once DNA was repaired $19.59\pm 2.97\%$ of WT MEFs had buds, whereas only $7.78\pm 3.68\%$ of *Atg4b*^{–/–} MEFs had buds. However, when we compared the percentage of cells with micronuclei, we found the opposite, an increase instead of a reduction of micronuclei in the absence of ATG4. We observed $4.63\pm 2.28\%$ of control WT MEFs with micronuclei and $8.11\pm 3.39\%$ in control *Atg4b*^{–/–} MEFs. After 2 h of DNA damage $5.18\pm 1.28\%$ of WT MEFs had micronuclei and $13.96\pm 4.98\%$ of *Atg4b*^{–/–} MEFs had them. And after 5 h of DNA repair, the percentage of cells with micronuclei was $13\pm 0.88\%$ of WT MEFs and $11.63\pm 5.21\%$ of *Atg4b*^{–/–} MEFs (Fig. 2G). A multiple comparison analysis among time points and treatments is shown in Fig. S2.

In summary, we found nuclear buds and micronuclei with markers of different stages of the autophagic pathway, suggesting an active role of autophagy proteins in buds formation, and basal micronuclei removal and during DNA damage.

Nucleophagy clears topoisomerase cleavage complex and nucleolar fibrillar

Several mechanisms to remove TOP2cc have been observed. For example, TDP2 hydrolyzes the phosphodiester bond between TOP2 and DNA after partial TOP2 degradation. In an alternative mechanism, nucleases remove TOP2 and a fragment of DNA (Ashour et al., 2015; Pommier et al., 2016). We propose that nucleophagy might also contribute to the elimination of these complexes. To analyze this, we studied whether TOP2 were found in nuclear alterations (both nuclear buds and micronuclei) and within autophagosomes. By immunolocalization, we found both TOP2A and TOP2B were present in nuclear alterations containing

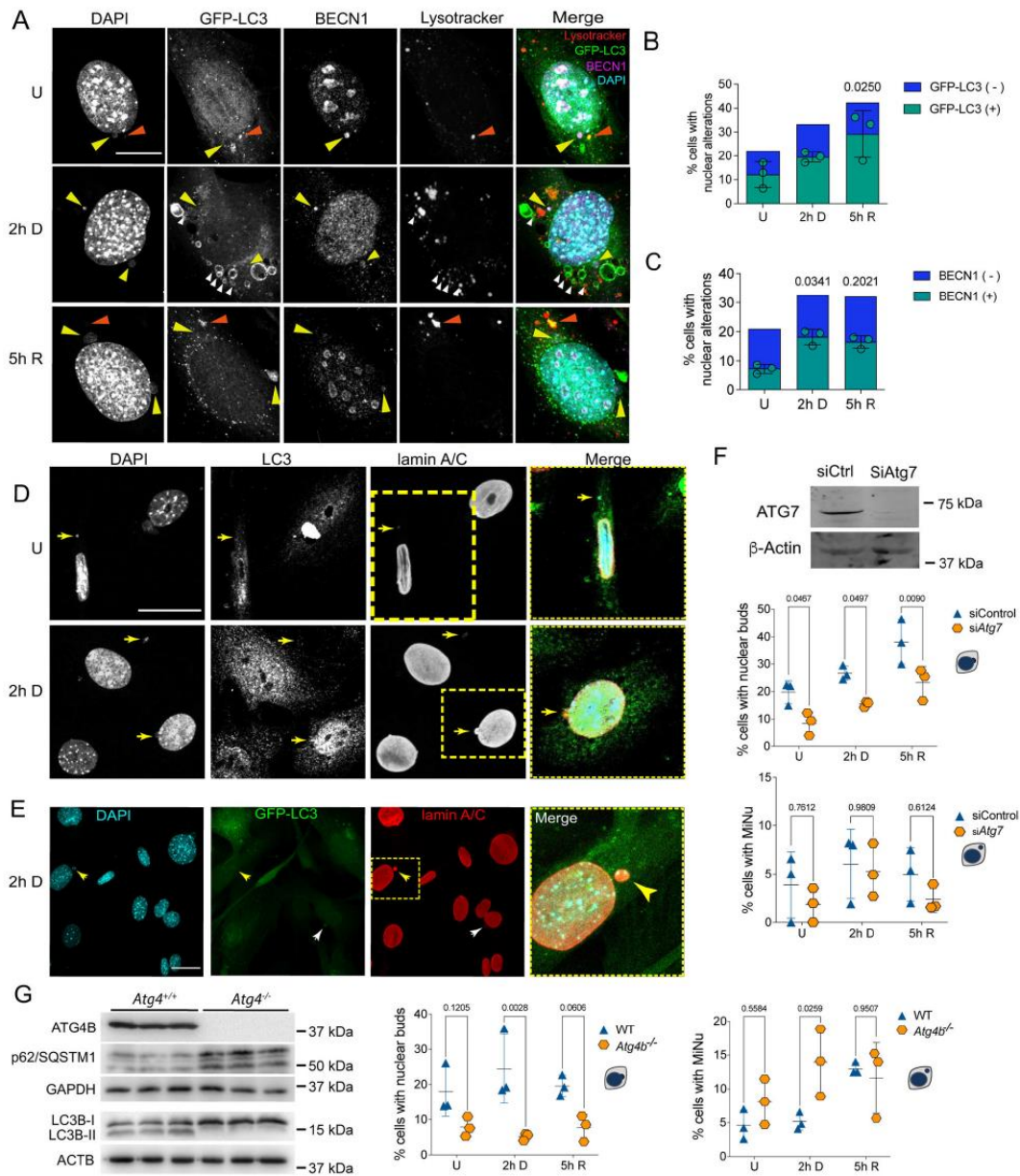


Fig. 2. See next page for legend.

DNA at a basal level in control cells, which was increased upon etoposide induction of DSBs. We quantified the percentage of cells with nuclear alterations and found that $53 \pm 3.14\%$ (mean \pm s.d.) of them contained TOP2A in untreated cells, compared to $56 \pm 2.14\%$ in cells with 2 h of DNA damage and $59 \pm 4.61\%$ after 5 h of DNA repair. Similar results were obtained for TOP2B, where $41 \pm 1.0\%$ of the cells with nuclear alterations in untreated cells contained TOP2B, $50 \pm 5.51\%$ in cells with 2 h of DNA damage and $58 \pm 7.18\%$ in cells with 5 h of DNA repair (Fig. 3A–E). We found TOP2A

within GFP–LC3-positive micronuclei (Fig. 3A), and TOP2B localization was within nuclear alterations containing both DNA and BECN1 (Fig. 3B). We confirmed by super-resolution microscopy that TOP2B localization was within nuclear alterations containing both DNA and BECN1 (Fig. 3C) in $78 \pm 2.9\%$ of the nuclear alterations in untreated cells (Fig. 3F). After etoposide-induced DSBs, we observed that $70 \pm 3.4\%$ of nuclear alterations contained BECN1 and TOP2B, which then were reduced to $63 \pm 4.3\%$ after DNA repair. We noticed in some cells a bridge joining the main nucleus with

Fig. 2. Nuclear buds and micronuclei are associated with components of different stages of the autophagic pathway. (A) Representative images of autophagic proteins GFP–LC3 and BECN1 found in nuclear buds (yellow arrowhead) in MEFs that were untreated (U), treated for 2 h with etoposide (2 h D) or after 5 h of DNA repair (5 h R), as used for quantifications shown in B and C. Some micronuclei were contained in autolysosomes, identified by having DNA (DAPI), GFP–LC3 and Lysotracker® staining (orange arrowheads). GFP–LC3-labeled vesicles next to Lysotracker® staining, or with Lysotracker® staining inside, are shown with white arrowheads. Scale bar: 10 μ m. (B,C) Percentage of cells with nuclear alterations (nuclear buds and micronuclei). Among nuclear alterations, those containing GFP–LC3 (B) or BECN1 (C) are shown in green, whereas those without GFP–LC3 or BECN1 are shown in blue. Color bars represent the mean of three independent experiments. Green symbols represent the percentage of cells with nuclear alterations containing GFP–LC3 or BECN1; bars represent means \pm s.d. The percentage of cells with nuclear buds or micronuclei are shown independently in Fig. S3. At least 50 cells were counted per treatment and experiment, and significant differences were determined by one-way ANOVA followed by a Kruskal–Wallis test; *P*-value is indicated in comparison with untreated samples. (D) Representative images of endogenous LC3B localized in micronuclei surrounded by lamin A/C, and containing DNA detected by DAPI staining (yellow arrows) in MEFs untreated (U) or treated for 2 h with etoposide (2 h D). Yellow squares indicate the magnified areas shown to the right. Scale bar: 30 μ m. (E) Representative micronuclei surrounded by lamin A/C containing GFP–LC3 (yellow arrows) in MEFs treated for 2 h with etoposide. Yellow dotted square indicates the magnified area shown to the right. Scale bar: 30 μ m. Images in D and E are representative of five repeats. (F) Functional autophagy seems to be necessary to form nuclear buds. MEFs were transfected with siRNA control (siCtrl) or *siAtg7* for 48 h and then treated or not with etoposide for 2 h and left to repair DNA for 5 h [untreated (U), damaged (2 h D) or repaired (5 h R) DNA]. The western blot shows representative level of *Atg7* silencing; β -actin was used as loading control. Whole blots are shown in Fig. S4A. Graphs show the percentage of cells with nuclear buds (top) or micronuclei (MiNu; bottom). For every experiment at least 50 cells were counted by detecting DAPI signal in nuclear alterations in confocal images. The distribution of the data from three independent experiments is graphed (means \pm s.d.). Significant differences were obtained by two-way ANOVA analysis, followed by a Sidak's multiple comparison test. Adjusted *P*-values are indicated for each comparison. (G) Functional autophagy seems to be necessary for micronuclei elimination. WT and *Atg4b*^{-/-} MEFs were analyzed to evaluate the abundance of nuclear alterations. Western blot demonstrates lack of ATG4B in *Atg4b*^{-/-} MEFs, accompanied by an accumulation of p62/SQSTM1 protein and absence of LC3B lipidation (lack of LC3B-II), confirming deficient autophagosome formation. The indicated sizes correspond to the molecular mass markers used for each blot. Whole blots are shown in Fig. S4B. Graphs show the percentage of cells with nuclear buds (left) or micronuclei (right). For every experiment at least 140 cells were counted by detecting the DAPI signal in nuclear alterations in confocal images. The distribution of the data from three independent experiments is graphed (means \pm s.d.). Significant differences were analyzed by two-way ANOVA following a Sidak's multiple comparison test; *P*-value is shown for each comparison. Detailed data of every graph are shown in Table S1.

micronuclei that contained both TOP2B and BECN1 (Fig. 3B,F). We further demonstrated TOP2B nucleophagic degradation by immunogold colocalization of LC3B and TOP2B observed by transmission electron microscopy. TOP2B was found surrounded by LC3B in transit towards the cytoplasm, confirming the frequent nucleophagic degradation of nuclear alterations (Fig. 3G). To verify an autophagic degradation of TOP2B, we compared by western blotting, the abundance of TOP2B in WT MEFs with *Atg4b*^{-/-} MEFs. In spite of it being only a subpopulation of cells that presented micronuclei at the times analyzed, we observed a subtle accumulation of TOP2B in *Atg4b*^{-/-} MEFs (Fig. 3H).

To maintain genome stability in the ribosomal DNA domain is particularly challenging given that it is located in the nucleolus. The

nucleolus is a subnuclear compartment with a high density of nucleic acids and proteins that creates a distinct environment that limits the accessibility of DNA repair factors (Korsholm et al., 2020). We considered that nucleosomal damage could also be removed by expelling nucleolar damaged material into the cytoplasm to be a nucleophagy target. In teratocarcinoma cells, nucleolar aggresomes increase in response to etoposide exposure, and are transported to the cytoplasm where they are surrounded by the autophagic machinery (Salmina et al., 2017). We looked for the presence of fibrillar (FBL), a nucleolar marker, in micronuclei and nuclear buds in primary MEFs, treated or not treated with etoposide. As shown in Fig. 4A, fibrillar was found in micronuclei and nuclear buds in 5.86 \pm 5.03% (mean \pm s.d.) of untreated cells, indicating a basal level of nucleolar material exclusion from the nucleus. In this set of experiments, 16.9 \pm 9.97% of control cells had nuclear alterations (nuclear buds and micronuclei) without fibrillar. Interestingly, in cells treated with etoposide for 2 h we observed only a slight increase to 6.8 \pm 4.03% of cells having nuclear buds and micronuclei with fibrillar, whereas the number of cells with other nuclear lesions increased to 30.6 \pm 4.2%. Similarly, the proportion of cells having fibrillar in nuclear lesions after 5 h of DNA repair only increased to 7.66 \pm 6.08%, whereas the percentage number of cells having nuclear buds and micronuclei without fibrillar increased to 38.42 \pm 9.3%. These results suggest that nucleolar components are constantly sent out of the nucleus as a homeostatic process, and not significantly in response to etoposide-induced DSBs. We confirmed, by both confocal and super-resolution microscopy, the micronuclear compartment of the cytoplasmic fibrillar, finding it with DNA surrounded by lamin A/C (Fig. 4C,D). We then analyzed whether nuclear buds and micronuclei containing fibrillar were also a target of autophagic proteins. As shown in Fig. 4B–D, we detected GFP–LC3 in 72 \pm 3.61% of the nuclear alterations containing fibrillar in untreated cells, and in 65.7 \pm 1.97% of cells with 2 h of DNA damage. Noticeably, after 5 h of DNA repair 90.33 \pm 6.36% of the fibrillar-containing nuclear perturbation had GFP–LC3 (Fig. 4B). Given that in the above experiments, we had observed a subnuclear localization of BECN1 resembling nucleolar structures (see Figs 2A and 3B), and considering the basal extrusion of fibrillar found here, we speculated that BECN1 could be located at the nucleolus in control cells. We observed by immunolocalization a similar distribution of fibrillar and BECN1 (Fig. 4E) and confirmed by co-immunoprecipitation that BECN1 and fibrillar are in the same complex (Fig. 4F). Taken together, these observations suggest that nucleolar components are potential targets of autophagic degradation.

DISCUSSION

Several studies have shown that autophagy contributes to genome stability by different mechanisms; for example, it elevates the level of DNA repair proteins of both the homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways, and enhances DNA damage recognition to be repaired by nucleotide excision repair (Lin et al., 2015; Liu et al., 2015). Additionally, BECN1 interacts directly with TOP2B, which leads to the activation of DNA repair proteins, and the formation of NR and DNA-PK repair complexes (Xu et al., 2017). Cytoplasmic elimination of nuclear lamina components has been observed in cells with oncogenic insults, with LC3B interacting directly with both lamin-associated domains on chromatin and lamin B1 and lamin A/C to be targeted for lysosomal degradation (Dou et al., 2015; Lenain et al., 2015; Li et al., 2019). These observations

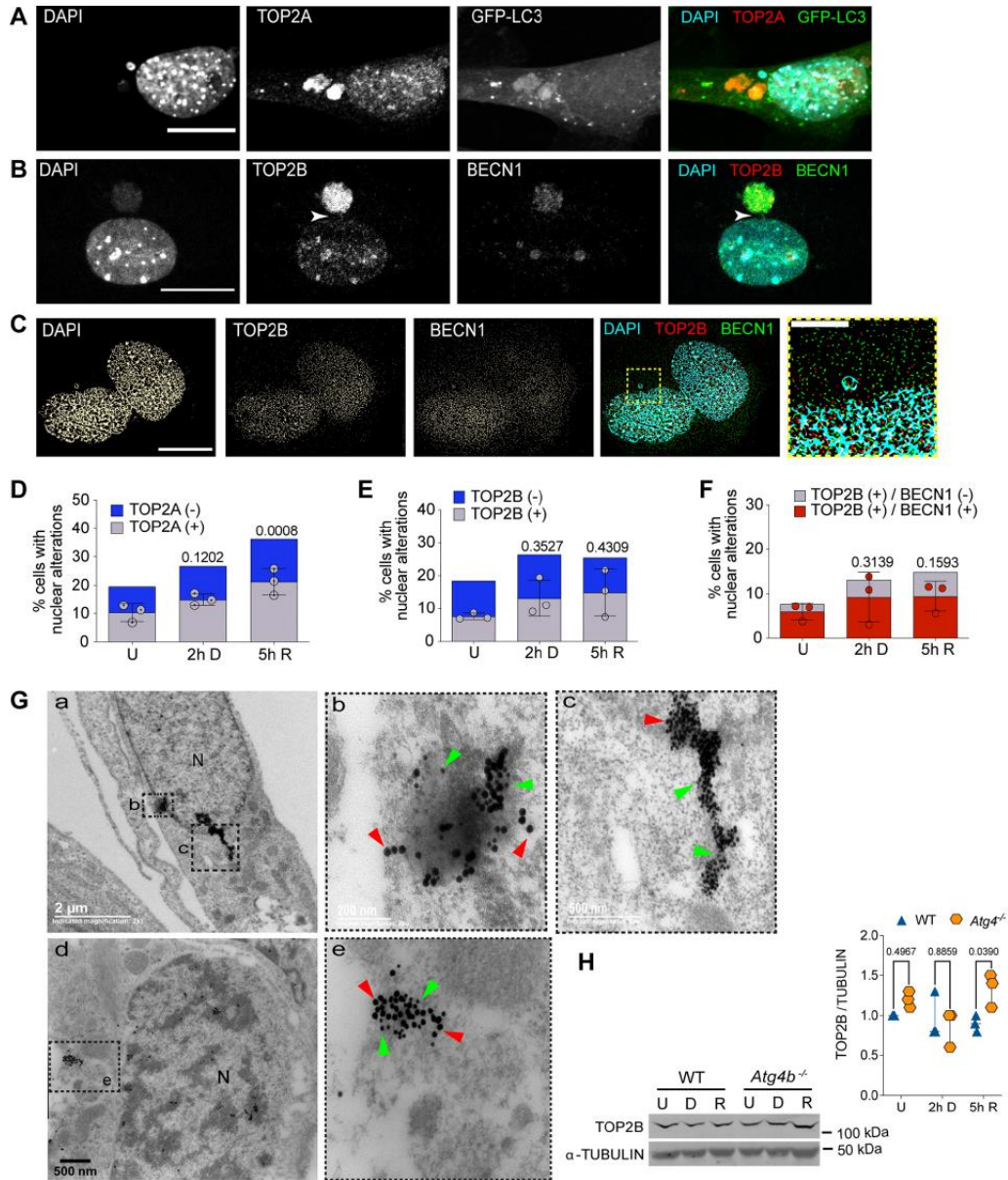


Fig. 3. See next page for legend.

lead to the conclusion that nucleophagy contributes to tumor suppression. Here, we describe that BECN1, together with LC3B, could have a pivotal role in control (untreated) cells and in cells with etoposide-induced DSBs, integrating the DNA repair machinery with the autophagy machinery. Autophagic proteins seem to promote the formation of nuclear buds, given that the percentage of cells with this type of nuclear alterations diminished in cells with *Atg7* silenced and in cells lacking ATG4B. Interestingly, the formation of micronuclei seems to be mechanically

different to that of buds, as the inhibition of autophagy did not reduce the percentage of cells with micronuclei. By contrast, cells with micronuclei accumulated in *Atg4b*^{-/-} MEFs in comparison with WT MEFs, both at the basal level and after DNA damage (Fig. 2F,G). A difference in the biogenesis of buds and micronuclei has been previously suggested, studying cells cultured under strong stress conditions that induce DNA amplification, as well as in cells under folic acid deficiency. While interstitial DNA without telomere was more prevalent in buds than in micronuclei, telomeric

Fig. 3. TOP2cc are targeted for nucleophagic clearance.

(A) Representative confocal image after immunofluorescence staining to detect TOP2A in MEFs expressing GFP-LC3, treated with 120 μ M etoposide for 2 h. Scale bar: 20 μ m. (B) Representative confocal image after immunofluorescence staining to detect TOP2B and BECN1 in MEFs treated with 120 μ M etoposide for 2 h. Scale bar: 20 μ m. Arrowheads show a bridge contacting both the main nucleus and a micronucleus containing both TOP2B and BECN1 signals. (C) Representative images obtained by super-resolution microscopy to detect colocalization of DNA and TOP2B (TOP2Bcc) with BECN1 in MEFs after 5 h of DNA repair. Yellow square represents the magnified section presented to the right. Scale bar: 15 μ m; magnified section, 5 μ m. Images in A–C are representative of three repeats. (D) Percentage of untreated (U), DNA damaged (2 h D) or DNA repaired (5 h R) cells with nuclear alterations (nuclear buds and micronuclei) containing DNA and TOP2A (gray bars). Nuclear alterations without TOP2A are shown as blue bars. The mean \pm s.d. for three independent experiments (counting at least 50 cells per experiment) are graphed. (E, F) Percentage of cells with nuclear alterations (nuclear buds and micronuclei) containing TOP2B (in E) or TOP2B colocalizing with BECN1 (in F) in untreated MEFs or after DNA damage (2 h D, cells treated with 120 μ M etoposide for 2 h) or DNA repair phase (5 h R, cells after 5 h of etoposide removal). At least 50 cells were counted for each experiment. The mean \pm s.d. of three independent experiments is graphed. In D–F, statistical significance was calculated by two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test; adjusted *P*-values are shown for each comparison. (G) Electron micrographs showing simultaneous detection of LC3B and TOP2B by immunogold labeling. Figures b and c show higher magnification views of the area indicated in a; e shows a higher magnification views of the area indicated in d. Green arrowheads show examples of 15 nm gold particles coupled to secondary antibody to detect TOP2B and red arrowheads point to 25 nm gold particles coupled to secondary antibody to detect LC3B. Images in G are representative of three repeats. (H) Western blot of total extracts from WT or *Atg4b*^{-/-} MEFs that were untreated (U), treated for 2 h with etoposide (D) or after 5 h of DNA repair (R) to compare the abundance of TOP2B in the presence (WT) or absence of ATG4 (*Atg4b*^{-/-}). α -Tubulin was detected as a loading control. Whole blots are presented in Fig. S4. Graph shows a densitometric analysis of three independent experiments. Statistical significance was determined by two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test. Adjusted *P*-values are shown for each comparison.

DNA was more frequently observed in micronuclei (Fenech et al., 2011).

There is also variability in the composition of the micronuclear envelope. By a careful analysis of the protrusions and micronuclei formed, we observed in some cases only one type of nuclear lamin, either lamin A/C or lamin B1, was present, whereas in other cases, both nuclear lamins were present (Fig. 1F). The different micronuclear envelope composition is probably related to different DNA damage or different DNA structures affected that lead to their formation. Others have also identified structural differences in micronuclei envelope with a variable presence of lamin B1, which has been linked to different abilities to replicate (Okamoto et al., 2012) or repair (Terradas et al., 2012) the genome, by affecting the recruitment of proteins required in those processes. These differences in the envelope composition could affect their nucleophagic removal.

The identification of TOP2 and fibrillarlin in micronuclei containing autophagic proteins led us to propose their elimination by nucleophagy. In support of this notion are the following findings: (1) both BECN1 and LC3B were detected in micronuclei in acidic vesicles (labeled with LysoTracker), which is indicative of the autolysosomal nature of the cytoplasmic compartment (Fig. 2A); (2) TOP2B was found by electron microscopy exiting the nucleus surrounded by LC3B in some cells (Fig. 3G); and (3) TOP2B accumulated in cells lacking ATG4, as expected if it is degraded by autophagy (Fig. 3H).

Along with the results presented here, the damage inflicted by etoposide was detected with a wide γ H2AX signal, which implies a huge amount of TOP2cc that has to be removed. We propose that nucleophagy contributes, with other mechanisms previously described to eliminate peptides or the whole TOP2 protein, free and complexed with DNA, such as the proteasome, phosphodiesterases and nucleases. To our knowledge, this is the first report of TOP2 degradation by autophagy. In support of our finding, it has been described that there is a decrease in TOP2A when cancerous cells are grown under glucose deprivation (Alchanati et al., 2009), an autophagy-inducing condition (Klionsky et al., 2021).

We noticed that in control cells some micronuclei did not have γ H2AX or were not stained with DAPI, suggesting that the nuclear material to be extruded did not always contain DSB. Perhaps other types of damaged DNA are extruded, or it is conceivable that nuclear buds and micronuclei could be formed for a proteostatic function, not necessarily involving DNA damage elimination. The recruitment of multiple molecules for DNA repair into the nucleus could trigger an imbalance in nuclear proteostasis, and the proteasome could become overloaded. Even though it has been shown that the proteasome degrades TOP2 (Mao et al., 2001) and fibrillarlin (Chen et al., 2002), our findings suggest that nucleophagy could have a collaborative role with the proteasome, contributing to protect both genome integrity and nuclear morphology.

An outcome of the overloaded activity of ubiquitin-proteasome system (UPS) is the accumulation and aggregation of polyubiquitylated proteins as aggresomes (Latonen et al., 2011). This occurs in the cytoplasm but also in the nucleoplasm, specifically at nucleoli, where under different stress conditions (heat shock, acidosis or genotoxic insults) proteins, RNA and conjugated ubiquitin accumulate (Jacob et al., 2013; Latonen, 2011, 2019). For example, under DNA damage, an early and transient nucleolar accumulation of paraspeckle proteins (Moore et al., 2011) (paraspeckles are nuclear subcompartments which function as a reservoir for splicing factors; Nunes and Moretti, 2017) and E2F1 occurs, affecting the structure and function of the nucleolus (Jin et al., 2014). The final destiny for aggresomes is not totally understood, but it has been suggested they persist until UPS degradative capacity is recovered (Latonen et al., 2011). Another possibility is that the aggresome is cleared by autophagy to promote genome stability and cell viability (Salmina et al., 2017). In this work, we observed nuclear alterations containing fibrillarlin in control cells, the levels of which slightly increased during DNA damage and repair, although without a statistical significant difference (Fig. 4C,D). A proportion of such nuclear alterations, mainly nuclear buds, had nuclear lamin A/C and GFP-LC3. It suggests that nucleolar components are targeted for autolysosomal degradation. Consequently, nucleophagy could be a mechanism to alleviate basal nucleolar stress.

In summary, the data presented support the contribution of autophagic proteins to extrude damaged DNA, TOP2cc and Fibrillarlin from the nucleus, preventing nuclear distortions and genotoxic stress. Insufficiencies on autophagy imply a risk of genomic instability, which in turn could drive the cell into a senescent or malignant state.

MATERIALS AND METHODS

Animals and cell culture

CD1 and GFP-LC3 (C57BL/6J) (Mizushima et al., 2004) animals were obtained from the animal house of the Institute of Cellular Physiology (IFC) at the National Autonomous University of Mexico (UNAM). Mutant mice

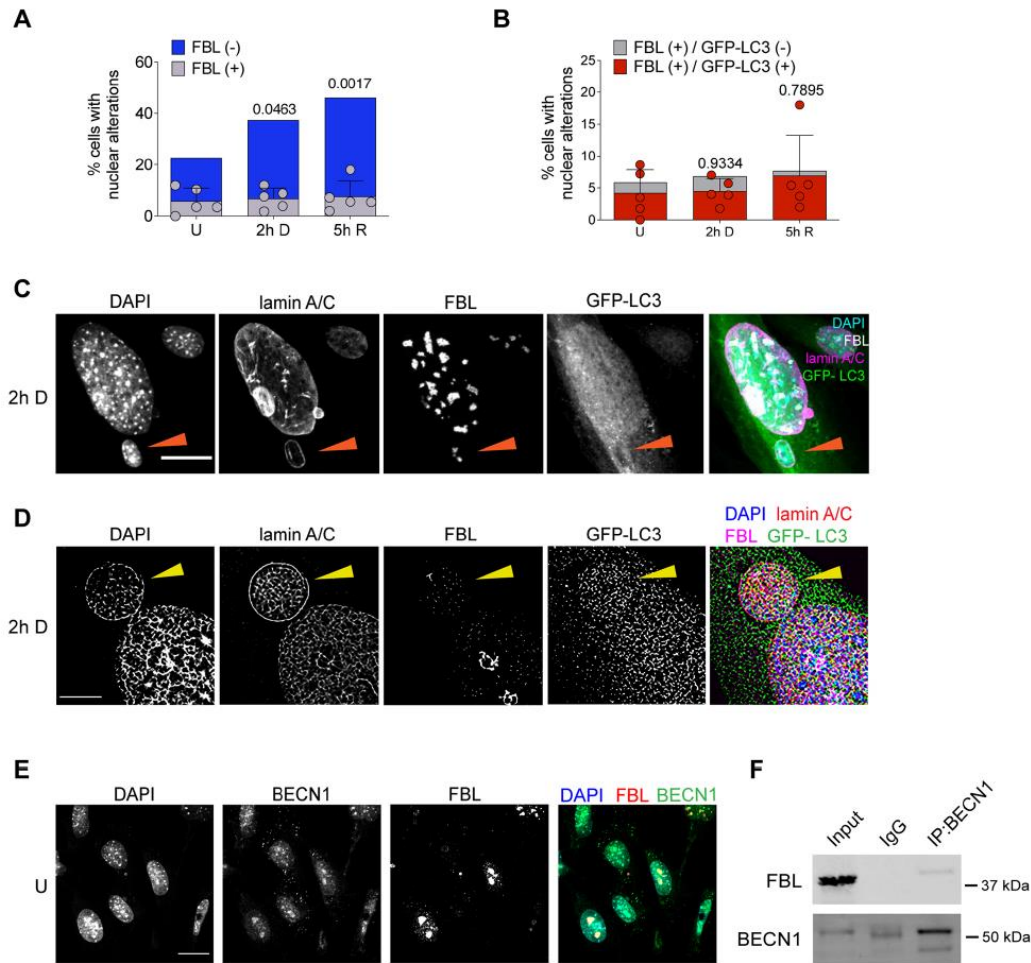


Fig. 4. The nucleolar protein fibrillar protein is found in nuclear buds and micronuclei containing autophagic proteins. (A) Percentage of cells containing nuclear alterations (buds and micronuclei), with (gray bars) or without (blue bars) fibrillar protein (FBL) in untreated cells (U), or after etoposide treatment (2 h D) or after 5 h of DNA repair (5 h R). (B) Percentage of cells containing nuclear alterations (buds and micronuclei), with (gray bars) or without (red bars) FBL and GFP-LC3 in untreated cells (U), or after etoposide treatment (2 h D) or after 5 h of DNA repair (5 h R). For A and B, dots represent the mean of each experiment ($n=5$); at least 50 cells were counted per experiment by analyzing DAPI distribution in confocal images. Bars correspond to s.d. A two-way-ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test of the total number of nuclear alterations. Adjusted P -values are indicated for each comparison with control cells. Even though there is a trend to increase nuclear alterations containing fibrillar protein upon DNA damage, no statistical significant differences were obtained. Detailed data are presented in Table S1. (C) Representative confocal microscopy images showing fibrillar protein (FBL) in a micronucleus containing DNA stained with DAPI and surrounded by lamin A/C (arrowhead) and GFP-LC3. (D) Representative super-resolution microscopy images of the same experiment described in C. Scale bar: 5 μ m. (E) Representative confocal microscopy images showing the concurrent distribution of FBL and BECN1 in control cells. Scale bar: 20 μ m. (F) Immunoprecipitation (IP) of BECN1, and western blot to detect FBL or BECN1 as indicated, from total protein extract of untreated cells. IgG was used as control of FBL-specific interaction with BECN1. Whole blots are shown in Fig. S4C. Images in C–E are representative of three repeats. Blots in F are representative of two repeats.

deficient in autophagy-related 4B (*Atg4b*^{-/-} mice) (Marino et al., 2010) were obtained from the animal house of the National Institute of Respiratory Diseases of Mexico (INER). Animals were housed at 22°C in 12 h light–12 h dark cycle with *ad libitum* access to water and food. Mice used in the present study were handled and cared according to the animal care and ethics legislation. All procedures were approved by the Internal Committee of Care and Use of Laboratory Animals of the IFC (IFC-SCO174-21).

All the experiments were done with mouse embryonic fibroblasts (MEFs) at cell passage 4 or 5. MEFs from WT CD1, GFP-LC3 transgenic mice or

Atg4b^{-/-} mice were obtained at embryonic day (E)13.5 according to the standard protocol (Xu, 2005). Lack of contamination with mycoplasma was tested in every batch using the VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (Sigma-Aldrich MP-0025, St Louis MO, USA), following the procedure indicated by the provider. MEFs were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium plus GlutaMAX™, 10% FBS and 100 U/ml penicillin-streptomycin. Media and supplements were from GIBCO® Life Technologies, Grand Island, NY, USA. Culture conditions consisted of a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. DNA damage was induced by incubating cells with etoposide (Etopos® injectable solution, Lemery,

Mexico City, Mexico) at 120 μ M for 0.5, 1 or 2 h. Then etoposide was removed and cells were washed twice with 1 \times PBS and incubated for 1, 3, 5 or 24 h in fresh medium.

siRNA transfection

WT MEFs were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 5 \times 10⁴ cells/well were seeded into 12-well plates 24 h before transfection and using antibiotic-free medium. For each well, 20 pmol siRNA and 3 μ l Lipofectamine were mixed and added for 6 h. After that fresh antibiotic-free medium was added and cells were incubated for 48 h. SMARTpool siRNA ATG7-FITC was from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Control siRNA targeted a region of a Luciferase-coding gene.

Neutral comet assay

The DSBs were detected with a neutral comet assay. Briefly, ~100 cells/ μ l were resuspended in PBS and mixed at a 1:5 ratio with 0.75% low-melting point agarose (Bio-Rad Certified™ Low Melt Agarose #1613112, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 37°C. Then with the help of a coverslip, ~50 μ l of the previous mix was spread on glass slides pre-coated with 1% normal-melting point agarose (Bio-Rad Certified™ PCR Agarose #1613104, Bio-Rad). The slides were incubated first at 4°C for 2 min and then for an extra 10 min at room temperature. After the removal of coverslip, each slide was sequentially covered and incubated for 60 min with pre-chilled lysis solution and then with unwinding buffer at 4°C. Next electrophoresis was performed with slides by applying 25 V for 20 min. After that, slides were incubated in neutralization buffer for 10 min, repeating this steps three times. Next, SYBR green (solution 1:10,000 in 1 \times PBS, SYBR™ green I Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used to stain DNA. Lysis solution was 0.03 M EDTA, 1% SDS; unwinding and electrophoresis buffer: 60 mM Tris-HCl pH 9.0, 90 mM acetic acid, 2.5 mM EDTA; neutralization buffer was 500 mM Tris-HCl pH 7.5.

To visualize the comets (DNA), a Nikon Eclipse Ti-U microscope with 20 \times objective and the NIS Elements BR software (Nikon Instruments Inc®, NY, USA) was used to acquire and analyze images. For analysis, the length and area of broken DNA were determined by processing 50 comet images for each treatment.

Immunofluorescence

The day before treatments, cells were grown on coverslips at a density of 2.5 \times 10⁴ cells/cm² on 12-well plates. After treatments, cells at room temperature were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, then washed with PBS, permeabilized for 5 min with PBS with 0.5% Triton X-100 and blocked for 1 h with 4% BSA in PBS. Coverslips were incubated overnight at 4°C with primary antibody (diluted in 2% BSA in PBS). The next day, after then removing the primary antibody and a wash with PBS, Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (diluted 1:500 in 2% BSA in PBS) (Life Technologies, OR, USA) were added and incubated for 1 h at room temperature. Finally, nuclei were stained with DAPI (1 μ g/ml) for 10 min.

Primary antibodies used for immunofluorescence were: mouse anti- γ H2AX (1:1000, ab26350, abcam, Cambridge, MA, USA), mouse anti-Lamin A/C (1:1000, sc-376248, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit anti-Lamin B1 (1:1000, ab16048, abcam), rabbit anti-LC3B (1:1000, 2775S, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), rabbit anti-Beclin1 (1:100, sc-11427, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-TOP2A (1:100, sc-365916, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-TOP2B (1:100, sc-25330, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Fibrillarin (1:1000, ab5821, abcam).

Secondary antibodies used were: goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor A594 (1:500) (A11032), goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor A594 (1:500) (A11037) Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor A488 (1:500) (A11029), Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor A488 (1:500) (A11029) All secondary antibodies were from Life Technologies, OR, USA except donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 647, which was from Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA.

Immunoblotting analysis

Cells were lysed using a buffer with 62.5 mM Tris-HCl pH 6.5, 2% SDS and 2 mg/ml protease inhibitor 18 (Complete, Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Between 30 to 120 μ g of protein lysates were separated by SDS-PAGE and then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Following a 1 h blocking step, membranes were incubated overnight with primary antibodies. Secondary antibody IRDye® 680RD goat anti-rabbit (925-68071, LI-COR, Lincoln, NE, USA) or IRDye® 800CW goat anti-mouse (925-32210, LI-COR) were added at 1:5000 dilution in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TTBS). Scanning was performed using the Odyssey® IR scanner, and image acquisition and analysis were performed using Odyssey® Image Studio software 5.2.5 (LI-COR). Blocking solution consisted of 3% nonfat dry milk (Blotting-Grade Blocker, cat. #170-6404, Bio-Rad) in TTBS.

Primary antibodies used were: mouse anti- γ H2AX (1:1000, 26350, abcam), rabbit anti-LC3B (1:1000, L7543, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), rabbit anti-ATG7 (1:1000, 2631, Cell Signaling Technology), rabbit anti- β -actin (1:10,000, C4, sc-47778; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti- α -tubulin (1:10,000, 3873, Cell Signaling Technology), rabbit anti-ATG4B (1:1000, A2981, Sigma-Aldrich), rabbit anti-p62/SQSTM1 (1:1000, P0068, Sigma-Aldrich) and mouse anti-GAPDH (1:1000, sc-47724, Santa Cruz Biotechnology).

Whole images of blots are presented in this work are shown in Fig. S4.

Confocal imaging

All images were collected as Z-stacks with an LSM800 (Zeiss, Oberkochen, Germany) confocal microscope using 40 \times /1.3 or 63 \times oil immersion objectives with 1 Airy unit aperture of pinhole. Samples were excited with 405 nm, 488 nm, 561 nm and 640 nm laser lines. CZI files obtained with ZEISS ZEN software and images of Z-projection were processed in Fiji (imageJ) software.

Immuno-electron microscopy

Cells were fixed with 3% glutaraldehyde. Following fixation, dehydration was performed in an ethanol gradient (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% and 100% ethanol) at 4°C. Then, the cells were embedded in a LR White resin and polymerization was carried out at 50°C. Ultrathin sections of 70–80 nm were cut from the polymer using an Ultracut-Reichert-Jung microtome and placed on nickel grids for immunogold assay.

The thin sections were washed twice for 2 min with deionized water and two times with PBS with 0.005% Tween 20. Sections were then incubated for 30 min with the blocking solution (50 mM glycine, 0.005% Tween 20, 0.01% Triton X-100 and 0.1% BSA in PBS) (Rosas-Arellano et al., 2016). After blocking, sections were incubated with the rabbit anti-LC3B primary antibody (1:500, MBL PD014, Nagoya, Japan). After rinsing three times in PBS with 0.005% Tween 20, the sections were incubated overnight at 4°C with the secondary antibody (1:20). Samples were washed three times with PBS with 0.005% Tween 20 and post-fixed in 2% glutaraldehyde in PBS for 10 min. The sections were then rinsed with distilled water twice for 5 min and contrasted with 2% uranyl acetate, rinsed with water, dried and observed under a JEOL JEM 1200 EXII electron microscope.

Secondary antibodies used were: donkey anti-rabbit IgG (H&L) conjugated to 25-nm gold particles (#25708 Aurion, Electron Microscopy Science, PA, USA) and donkey anti-mouse IgG (H&L) conjugated to 15-nm gold particles (#25817 Aurion, Electron Microscopy Science).

Super resolution microscopy

Super resolution microscopy imaging was performed at the National Laboratory for Advanced Microscopy (LNMA) of UNAM. Immunofluorescence samples were imaged on a Nanoimager-S (Oxford Nanoimaging Ltd) using widefield fluorescence excitation. Samples were excited by alternating laser illumination with a 405 (DAPI), 473 (Alexa Fluor A488, GFP) and 561 (Alexa Fluor A594) laser lines. Detection of the signal was achieved via an 100 \times , 1.4 NA, oil-immersion objective (Olympus) and an sCMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 V3 using an embedded image splitter for dual-channel fluorescence acquisition. Imaging time was 33 ms, effective pixel size at object plane was 117 nm.

Subdiffraction images were obtained via SRRF, a multi-frame super-resolution microscopy approach which gathers nanoscopic information from the statistical analysis of sequences of images collected at the same imaging plane (Gustafsson et al., 2016). Each super resolution image was derived by the analysis of serial stacks of 100 images collected per fluorescence excitation channel. Each serial stack was drift corrected and analyzed using the NanoJ-core and NanoJ-SRRF plugins of FIJI/Image J (Laine et al., 2019). Parameters used for SRRF computation were ring radius 0.5, radiality magnification 10, axes in ring 8 parameters, Temporal Analysis: AVG. The rest of the parameters were left as the recommended default values (Laine et al., 2019).

Immunoprecipitation

The immunoprecipitations were carried out using μ MACSTM, Protein A/G MicroBeads MultiMACSTM Protein A/G kit (MACS molecular; Miltenyi Biotec, Auburn, CA), following the manufacturer's instructions. Briefly, cell lysates were mixed with 1 μ g of monoclonal antibody and 50 μ l of Protein G MicroBeads and incubated for 30 min on ice. Proteins complexed with antibodies and magnetic beads were passed over a separation column coupled with a magnetic field and then eluted from the column. Finally, immunoprecipitated proteins were analyzed by western blotting.

Statistical analysis

Graphs and data analysis were performed with GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). Different tests to determine statistically significant differences were applied as indicated in every figure. Raw data for each figure are detailed in Table S1. Multiple comparison analysis among all treatments are shown in supplementary figures indicated for each experiment.

Acknowledgements

We are thankful to Dr Beatriz Aguilar for her technical assistance performing western blots. We are thankful to Dr Ruth Rincón for confocal analysis assistance, to Rodolfo Paredes M.Sc. for electron microscopy imaging and to Dr Abraham Rosas for both confocal analysis and electron microscopy imaging, all at the Imagenología Unit at the 'Instituto de Fisiología Celular'. We also acknowledge José Alejandro Marmolejo Valencia M.Sc. at the 'Instituto de Investigaciones Biomédicas' for his support on electron microscopy imaging, and José P. Oviedo for his assistance on super resolution imaging at 'Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada'. We are thankful to Claudia Rivero at the Animal Facility, M.C. Ana Maria Escalante and Francisco Pérez at the IT Unit, Aurey Galvan and Manuel Ortez at the Equipment Maintenance Workshop, all at 'Instituto de Fisiología Celular'. Data in this work are part of the doctoral dissertation in the 'Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas' at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) of G.M.-H. and P.S.A.-R.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: G.M.-H., S.C.-O.; Methodology: G.M.-H., A.O.G., H.M.-L., S.C.-O.; Validation: S.C.-B.; Formal analysis: G.M.-H., A.O.G., H.M.-L., S.C.-O.; Investigation: G.M.-H., P.S.A.-R., S.C.-B., A.O.G., H.M.-L., S.C.-O.; Resources: S.C.-B., S.C.-O.; Writing - original draft: G.M.-H.; Writing - review & editing: G.M.-H., P.S.A.-R., S.C.-B., A.O.G., H.M.-L., S.C.-O.; Visualization: A.O.G., H.M.-L.; Supervision: A.O.G., H.M.-L., S.C.-O.; Funding acquisition: A.O.G., S.C.-O.

Funding

This project was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) FC-921, and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM-DGAPA)-PAPIIT grants IN206518 and IN209221 to S.C.-O. CONACYT Doctoral fellowships were awarded to G.M.-H. (417724) and P.S.A.-R. (446145). Super resolution imaging in Mexico was supported by the Chan Zuckerberg Initiative (CZI) Expanding Global Access to Bioimaging (to A.O.G.). Open Access funding provided by Universidad Nacional Autónoma de México. Deposited in PMC for immediate release.

Data availability

All relevant data can be found within the article and its supplementary information.

Peer review history

The peer review history is available online at <https://journals.biologists.com/jcs/lookup/doi/10.1242/jcs.260563.reviewer-comments.pdf>

References

- Alchanati, I., Teicher, C., Cohen, G., Shemesh, V., Barr, H. M., Nakache, P., Ben-Avraham, D., Idelevich, A., Angel, I., Livnah, N. et al. (2009). The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2alpha cleavage complex - a potentially new drug target. *PLoS One* 4, e8104. doi:10.1371/journal.pone.0008104
- Alt, F. W., Wei, P. C. and Schwer, B. (2017). Recurrently breaking genes in neural progenitors: potential roles of DNA breaks in neuronal function, degeneration and cancer. In *Genome Editing in Neurosciences* (ed. R. Jaenisch, F. Zhang and F. Gage), pp. 63-72. Springer.
- Ashour, M. E., Atteya, R. and El-Khamisy, S. F. (2015). Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nat. Rev. Cancer* 15, 137-151. doi:10.1038/nrc3892
- Austin, C. A., Lee, K. C., Swan, R. L., Khazeem, M. M., Manville, C. M., Cridland, P., Treumann, A., Porter, A., Morris, N. J. and Cowell, I. G. (2018). TOP2B: the first thirty years. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2765. doi:10.3390/ijms19092765
- Bae, H. and Guan, J. L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents. *Mol. Cancer Res.* 9, 1232-1241. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0098
- Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch, J. and von Mikecz, A. (2002). Subcellular recruitment of fibrillar to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Mol. Biol. Cell* 13, 3576-3587. doi:10.1091/mbc.02-05-0083
- Chen, J. H., Zhang, P., Chen, W. D., Li, D. D., Wu, X. Q., Deng, R., Jiao, L., Li, X., Ji, J., Feng, G. K. et al. (2015). ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells. *Autophagy* 11, 239-252. doi:10.1080/1548627.2015.1009767
- Chicote, J., Yuste, V. J., Boix, J. and Ribas, J. (2020). Cell death triggered by the autophagy inhibitory drug 3-methyladenine in growing conditions proceeds with DNA damage. *Front. Pharmacol.* 11, 580343. doi:10.3389/fphar.2020.580343
- Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179-204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019
- Dobersch, S., Rubio, K., Singh, I., Gunther, S., Graumann, J., Cordero, J., Castillo-Negrete, R., Huynh, M. B., Mehta, A., Braubach, P. et al. (2021). Positioning of nucleosomes containing gamma-H2AX precedes active DNA demethylation and transcription initiation. *Nat. Commun.* 12, 1072. doi:10.1038/s41467-021-21227-y
- Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J. A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P. et al. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527, 105-109. doi:10.1038/nature15548
- Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z. et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402-406. doi:10.1038/nature24050
- Eliopoulos, A. G., Havaki, S. and Gorgoulis, V. G. (2016). DNA damage response and autophagy: a meaningful partnership. *Front. Genet.* 7, 204. doi:10.3389/fgene.2016.00204
- Erenpreisa, J., Salmina, K., Huna, A., Kosmacek, E. A., Cragg, M. S., Ianzini, F. and Anisimov, A. P. (2011). Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell Biol. Int.* 35, 687-695. doi:10.1042/CBI20100762
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surrallés, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D. and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125-132. doi:10.1093/mutage/geq052
- Gustafsson, N., Culey, S., Ashdown, G., Owen, D. M., Pereira, P. M. and Henriques, R. (2016). Fast live-cell conventional fluorescence microscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat. Commun.* 7, 12471. doi:10.1038/ncomms12471
- Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J., Stopper, H. and Working Group "In vitro micronucleus test", Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM, German-speaking section of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society EEMGS). (2017). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat. Res.* 771, 85-98. doi:10.1016/j.mrrev.2017.02.002
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F. et al. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J. Cell Biol.* 202, 129-143. doi:10.1083/jcb.201212110
- Jacob, M. D., Audas, T. E., Uniacke, J., Trinkle-Mulcahy, L. and Lee, S. (2013). Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 24, 2943-2953. doi:10.1091/mbc.e13-04-0223
- Jin, Y. Q., An, G. S., Ni, J. H., Li, S. Y. and Jia, H. T. (2014). ATM-dependent E2F1 accumulation in the nucleolus is an indicator of ribosomal stress in early response to DNA damage. *Cell Cycle* 13, 1627-1638. doi:10.4161/cc.28605
- Kisurina-Evgenieva, O. P., Sutiagina, O. I. and Onishchenko, G. E. (2016). Biogenesis of micronuclei. *Biochemistry (Mosc.)* 81, 453-464. doi:10.1134/S0006297916050035

- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfattah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A. et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy* 17, 1-382. doi:10.1080/15548627.2020.1797280
- Korsholm, L. M., Gal, Z., Nieto, B., Quevedo, O., Boukoura, S., Lund, C. C. and Larsen, D. H. (2020). Recent advances in the nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 48, 9449-9461. doi:10.1093/nar/gkaa713
- Kwon, M., Leibowitz, M. L. and Lee, J. H. (2020). Small but mighty: the causes and consequences of micronucleus rupture. *Exp. Mol. Med.* 52, 1777-1786. doi:10.1038/s12276-020-00529-z
- Laine, R. F., Tosheva, K. L., Gustafsson, N., Gray, R. D. M., Almada, P., Albrecht, D., Risa, G. T., Hurligt, F., Lindås, A. C., Baum, B. et al. (2019). NanoJ: a high-performance open-source super-resolution microscopy toolbox. *J. Phys. D Appl. Phys.* 52, 163001. doi:10.1088/1361-6463/ab0261
- Langie, S. A., Koppen, G., Desaulniers, D., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Azqueta, A., Bisson, W. H., Brown, D. C., Brunborg, G. et al. (2015). Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis* 36, S61-S88. doi:10.1093/carcin/bgv031
- Latonen, L. (2011). Nucleolar aggresomes as counterparts of cytoplasmic aggresomes in proteotoxic stress. Proteasome inhibitors induce nuclear ribonucleoprotein inclusions that accumulate several key factors of neurodegenerative diseases and cancer. *BioEssays* 33, 386-395. doi:10.1002/bies.201100008
- Latonen, L. (2019). Phase-to-phase with nucleoli - stress responses, protein aggregation and novel roles of RNA. *Front. Cell Neurosci.* 13, 151. doi:10.3389/fncel.2019.00151
- Latonen, L., Moore, H. M., Bai, B., Jäämaa, S. and Laiho, M. (2011). Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* 30, 790-805. doi:10.1038/onc.2010.469
- Lenain, C., Gusyatin, O., Douma, S., van den Broek, B. and Peeper, D. S. (2015). Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis* 36, 1263-1274. doi:10.1093/carcin/bgv124
- Li, Y., Jiang, X., Zhang, Y., Gao, Z., Liu, Y., Hu, J., Hu, X., Li, L., Shi, J. and 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. doi:10.1186/s13046-019-1048-8
- Lin, W., Yuan, N., Wang, Z., Cao, Y., Fang, Y., Li, X., Xu, F., Song, L., Wang, J., Zhang, H. et al. (2015). Autophagy confers DNA damage repair pathways to protect the hematopoietic system from nuclear radiation injury. *Sci. Rep.* 5, 12362. doi:10.1038/srep12362
- Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., Cai, Y., Norberg, H. V., Zhang, T., Furuya, T. et al. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 147, 223-234. doi:10.1016/j.cell.2011.08.037
- Liu, E. Y., Xu, N., O'Prey, J., Lao, L. Y., Joshi, S., Long, J. S., O'Prey, M., Croft, D. R., Beaumatin, F., Baudot, A. D. et al. (2015). Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 773-778. doi:10.1073/pnas.1409563112
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C. et al. (2015). Activity-induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes. *Cell* 161, 1592-1605. doi:10.1016/j.cell.2015.05.032
- Mao, Y., Desai, S. D., Ting, C. Y., Hwang, J. and Liu, L. F. (2001). 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 40652-40658. doi:10.1074/jbc.M104009200
- Marino, G., Fernandez, A. F., Cabrera, S., Lundberg, Y. W., Cabanillas, R., Rodriguez, F., Salvador-Montoliu, N., Vega, J. A., Germana, A., Fueyo, A. et al. (2010). Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J. Clin. Invest.* 120, 2331-2344. doi:10.1172/JCI42601
- Medvedeva, N. G., Panyutin, I. V., Panyutin, I. G. and Neumann, R. D. (2007). Phosphorylation of histone H2AX in radiation-induced micronuclei. *Radiat. Res.* 168, 493-498. doi:10.1667/RR0788.1
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101-1111. doi:10.1091/mbc.e03-09-0704
- Moore, H. M., Bai, B., Boisvert, F. M., Latonen, L., Rantanen, V., Simpson, J. C., Pepperkok, R., Lamond, A. I. and Laiho, M. (2011). Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.009241. doi:10.1074/mcp.M111.009241
- Nunes, V. S. and Moretti, N. S. (2017). Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biol. Int.* 41, 2-7. doi:10.1002/cbin.10703
- Okamoto, A., Utani, K. and Shimizu, N. (2012). DNA replication occurs in all lamina positive micronuclei, but never in lamina negative micronuclei. *Mutagenesis* 27, 323-327. doi:10.1093/mutage/ger082
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S. N. and Nitiss, J. L. (2016). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 703-721. doi:10.1038/nrm.2016.111
- Rao, X., Zhang, Y., Yi, Q., Hou, H., Xu, B., Chu, L., Huang, Y., Zhang, W., Fenech, M. and Shi, Q. (2008). Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging. *Mutat. Res.* 646, 41-49. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.09.004
- Rello-Varona, S., Lissa, D., Shen, S., Niso-Santano, M., Senovilla, L., Marino, G., Vitale, I., Jemaa, M., Harper, F., Pierron, G. et al. (2012). Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle* 11, 170-176. doi:10.4161/cc.11.1.18564
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858-5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858
- Rohrbach, S., Siddoway, B., Liu, C. S. and Chun, J. (2018). Genomic mosaicism in the developing and adult brain. *Dev. Neurobiol.* 78, 1026-1048. doi:10.1002/dneu.22626
- Rosas-Arellano, A., Villalobos-Gonzalez, J. B., Palma-Tirado, L., Beltran, F. A., Carabez-Trejo, A., Missirlis, F. and Castro, M. A. (2016). A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochem. Cell Biol.* 146, 421-430. doi:10.1007/s00418-016-1447-2
- Salmina, K., Huna, A., Inashkina, I., Belyayev, A., Krigerts, J., Pastova, L., Vazquez-Martin, A. and Erenpreisa, J. (2017). Nucleolar aggresomes mediate release of pericentric heterochromatin and nuclear destruction of genotoxicity treated cancer cells. *Nucleus* 8, 205-221. doi:10.1080/19491034.2017.1279775
- Schatz, D. G. and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251-263. doi:10.1038/nri2941
- Simon, H. U., Friis, R., Tait, S. W. and Ryan, K. M. (2017). Retrograde signaling from autophagy modulates stress responses. *Sci. Signal.* 10, eaag2791. doi:10.1126/scisignal.aag2791
- Singh, I., Ozturk, N., Cordero, J., Mehta, A., Hasan, D., Cosentino, C., Sebastian, C., Kruger, M., Looso, M., Carraro, G. et al. (2015). High mobility group protein-mediated transcription requires DNA damage marker gamma-H2AX. *Cell Res.* 25, 837-850. doi:10.1038/cr.2015.67
- Terradas, M., Martin, M., Hernandez, L., Tusell, L. and Genesca, A. (2012). Nuclear envelope defects impede a proper response to micronuclear DNA lesions. *Mutat. Res.* 729, 35-40. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.09.003
- Utani, K., Okamoto, A. and Shimizu, N. (2011). Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding. *PLoS One* 6, e27233. doi:10.1371/journal.pone.0027233
- Xu, J. (2005). Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter* 28, Unit 28 21. doi:10.1002/0471142727.mb2801s70
- Xu, F., Fang, Y., Yan, L., Xu, L., Zhang, S., Cao, Y., Xu, L., Zhang, X., Xie, J., Jiang, G. et al. (2017). Nuclear localization of Beclin 1 promotes radiation-induced DNA damage repair independent of autophagy. *Sci. Rep.* 7, 45385. doi:10.1038/srep45385
- Zeng, X., Overmeyer, J. H. and Maltese, W. A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J. Cell Sci.* 119, 259-270. doi:10.1242/jcs.02735
- Zhao, M., Wang, F., Wu, J., Cheng, Y., Cao, Y., Wu, X., Ma, M., Tang, F., Liu, Z., Liu, H. et al. (2021). CGAS is a micronucleophagy receptor for the clearance of micronuclei. *Autophagy* 17, 3976-3991. doi:10.1080/15548627.2021.1899440

Critical Review



Autophagy as a Target for Therapeutic Uses of Multifunctional Peptides

Gabriel Muciño¹
Susana Castro-Obregón¹
Rogelio Hernandez-Pando²
Gabriel Del Rio^{3*}

¹Department of Neurodevelopment and Physiology, Instituto De Fisiología Celular, UNAM, México, D.F, México

²Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán," Mexico

³Department of Biochemistry and Structural Biology, Instituto De Fisiología Celular, UNAM, México, D.F, México

Abstract

The emergence of complex diseases is promoting a change from one-target to multitarget drugs and peptides are ideal molecules to fulfill this polypharmacologic role. Here we review current status in the design of polypharmacological peptides aimed to treat complex diseases, focusing on tuberculosis. In this sense, combining multiple activities in single molecules is a two-sided sword, as both positive and negative side effects might arise. These polypharmacologic compounds may be directed to regulate autophagy, a catabolic process that enables cells to eliminate intracellular microbes (xenoph-

agy), such as *Mycobacterium tuberculosis* (MBT). Here we review some strategies to control MBT infection and propose that a peptide combining both antimicrobial and pro-autophagic activities would have a greater potential to limit MBT infection. This endeavor may complement the knowledge gained in understanding the mechanism of action of antibiotics and may lead to the design of better polypharmacological peptides to treat complex diseases such as tuberculosis. © 2016 IUBMB Life, 68(4):259–267, 2016

Keywords: autophagy; antimicrobial peptides; polypharmacology; tuberculosis

Introduction

Identifying molecules with highly specific biological activities useful in therapeutic interventions has been largely influenced by the discovery of salvarsan by Paul Erlich during the beginning of the 20th century (1); Erlich proposed the idea of "magic bullets" to refer to those drugs capable of traversing the body of a patient with an infection and only act on the

infectious agent. But it was the discovery by Alexander Fleming of the antibiotic penicillin produced by *Penicillium chrysogenum*, followed by the consequent development of large-scale production methods, that has had the greatest influence on identifying new therapeutic compounds (2). Noticeably, both salvarsan and penicillin are molecules with specificity to kill microbes, yet their impact on therapeutics is beyond infectious diseases. For instance, development and production of many new biomolecules with therapeutic applications, such as cancer, autoimmune diseases, vaccines, among others, use the same microbial strain selection and large-scale chemical engineering methods that were first pioneered for penicillin. Additionally, the use of antibiotics has proven indispensable in understanding fundamental aspects of cell physiology, such as cell-wall biogenesis, DNA biosynthesis and the translation process, among others (3). It has, at the same time, influenced much of our current understanding of different diseases.

In the last decades the emergence of complex diseases has impacted our societies, including diseases associated with aging (*e.g.*, Alzheimer disease) (4), resilient cancers (*e.g.*, leukemia) (5,6), and infectious diseases caused by multidrug

Abbreviations: TB, tuberculosis; MBT, *Mycobacterium tuberculosis*; IFN- γ , interferon gamma; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL, interleukin; AMPs, antimicrobial peptides

© 2016 International Union of Biochemistry and Molecular Biology
Volume 68, Number 4, April 2016, Pages 259–267

*Address correspondence to: Gabriel Del Rio, Department of Biochemistry and Structural Biology, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., México. Tel: +52-55-5622-5663; Fax: +52-55-5622-5630.

E-mail: gdelrio@ifc.unam.mx

Received 18 November 2015; Accepted 17 January 2016

DOI 10.1002/iub.1483

Published online 10 March 2016 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com)



resistant microorganisms (*e.g.*, tuberculosis) or viruses (*e.g.*, HIV) (7). As a consequence, there has been a shift in the paradigm to identify bioactive molecules to address these complex diseases (8). The recognition that compounds with multiple biological activities have the ability to treat some of these complex diseases has fostered the development of polypharmacology (9).

Peptides constitute a new class of bioactive molecules with the ability to incorporate the needs of polypharmacology. They are permeable and many of them are naturally multifunctional. Furthermore, peptides may be chemically or biologically synthesized, facilitating both testing and large-scale production scenarios. Actually, recent reports show the economical potential of peptides as therapeutics for the near future (10). Yet, much is to be learned in terms of the consequences of using multifunctional peptides in therapies.

In the present review we focus on antimicrobial peptides aimed to treat tuberculosis (TB), to provide a general overview on two of the complex aspects of therapeutic uses of polypharmacological compounds: their potential side effects due to emerging functions, and the induction of resistance *versus* tolerance of the infection. Resistance involves the control of proliferation of an infectious agent, while tolerance refers to a reduced toxicity without controlling proliferation. Usually, these two mechanisms are mutually exclusive.

Side Effects of Polypharmacological Compounds: A Double-Edged Sword

Using molecules with multiple activities to treat complex diseases increases the likelihood of potential problems that may emerge by targeting multiple pathways simultaneously. Polypharmacological compounds may act on two different types of targets: (1) single proteins that are at a crossroad of critical pathways for a disease or (2) different proteins at different critical pathways for a disease. In either case, side effects may be anticipated as a result of off-target activity of the compound. For example, kinase inhibitors can target additional kinases (11) or proteins with a function unrelated to the disease, yet necessary for the cell homeostasis. While combining activities from compounds with well-established mechanisms of action may circumvent some of these side effects, it may happen that combining two activities into a single molecule may render an emergent activity; we have previously observed such phenomena occurring in the case of multifunctional peptides (12). An emergent activity in a peptide may be created by two different mechanisms, as summarized in Fig. 1. In the case of an intrinsic mechanism (Fig. 1A), the combination of two activities (*i.e.*, peptide conformations) may facilitate a novel conformation of the peptide that might render a novel active site. Alternatively, an extrinsic mechanism (Fig. 1B) requires that the peptides trigger two different pathways in a cell rendering an epistatic outcome. Thus, even when combining activities with well-established mechanisms of action, off-

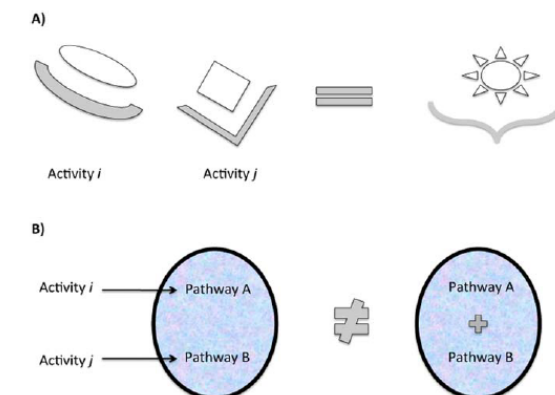


FIG 1

Proposed mechanisms involved for the development of emergent activities in polypeptides. A) Intrinsic mechanism. Two different activities (*i* and *j*) in a polypeptide may be combined in a way to promote access to a new conformation (gray bracket-shaped object) with a new activity. In the figure, the gray-colored concave objects (*e.g.*, semi-circle, half-square) represent different polypeptide conformations and the white objects represent their interacting partners/ligands/reactants. B) Extrinsic mechanism. Two different polypeptide activities (*i* and *j*) may act within a cell (round blue object) on two different pathways (A and B); the pathways may interact pleiotropically, that is, in a way that is not simply the sum of the activities.

target side effects might arise in polypharmacological compounds.

In this sense, polypharmacological compounds are no different than classical one-target directed compounds where off-target side effects are observed. Yet, not all off-target side effects are undesirable; for instance, Sildenafil (Viagra), a phosphodiesterase inhibitor used to treat hypertension and ischemic heart disease, became a frequently used compound to treat erectile dysfunction (13). Nevertheless, these side effects may be a risk for human health and it has justified the canceling of some polypharmacological compounds in clinical studies, such as in the case of Lumiracoxib, a COX-2 selective inhibitor/non-steroidal anti-inflammatory drug, the anti-inflammatory Rofecoxib, and the protein kinase C inhibitor Stauroporine (9). Hence, it may be anticipated that side effects in polypharmacological compounds may be either beneficial or deleterious for human health. Consequently, the clinical testing of polypharmacological compounds should be considered an opportunity to further understand the complexity of biological mechanisms. In this sense, gaining a more in-depth understanding of biological processes involved in a disease will foster the development of more effective treatments, as the history of antibiotics has taught us.

Eliminating Pathogens or Adapting to Live with them

Host-pathogen interactions are largely complex, not only by the large number of molecules and genes involved and the different cell types participating over time, but mainly because the outcome of these relationships depends on many environmental factors as well. From the viewpoint of the host, the result of an interaction with a pathogen may be the development of resistance or tolerance against the pathogen. Resistance is commonly defined as the ability of the host to prevent pathogen replication, whereas tolerance is achieved by maintaining host homeostasis (limited ensuing pathology) in the presence of a replicating pathogen (14). Thus, resistance mechanisms involve impeding pathogen entrance, replication and establishment, while tolerance mechanisms reduce pathogen toxicity and, at the same time, reduce resistance mechanisms to prevent immunopathology. That is, to reduce the collateral damage of the host by immune-related defense mechanisms (15).

In terms of defining a therapy, it is important to recognize that the balance between protection against pathogen toxicity and immunopathology determines the survival of the host. Thus, it is relevant to take into account the stage of the disease (*e.g.*, whether it is in an expansion or in a stable phase) to design an appropriate treatment. Yet, most efforts are dedicated to generate resistance to infections, but this strategy may have undesired outcomes, as the indiscriminated use of antibiotics has taught us (see below). In the next sections we will review our current understanding of a complex disease, TB, where these aspects for designing an efficient therapy are considered.

Tuberculosis as a Target for Multifunctional Peptides

The first step of a host infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) is the recognition of mycobacteria as an invading pathogen by activating innate immune responses, which subsequently initiate the adaptive immune responses. After inhalation of aerosols with suspended mycobacteria into the lungs of the host, the first encounter of mycobacteria is with alveolar resident macrophages and respiratory airway epithelium. Mycobacteria that escape the initial intracellular destruction can multiply and disrupt macrophages, inducing the production and secretion of chemokines that attract neutrophils and monocytes. Monocytes will differentiate into macrophages, which ingest but do not destroy the mycobacteria (16). Airway epithelium also produce chemotactic substances such as interleukin 8, which attracts and activates neutrophils, and bronchial epithelial cells produce antimicrobial peptides such as beta-defensins, which contribute to bacilli elimination and chemotaxis of T lymphocytes (17). Thus, at this stage inflammatory cells accumulate but little tissue damage occurs.

Two to 3 weeks after infection, acquired immunity is activated, as observed by antigen-specific T-lymphocytes arrival, proliferation, and differentiation particularly within specific lesions called granulomas, and release proinflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN-gamma) that will activate macrophages to kill the intracellular mycobacteria. In the majority of the infected subjects, mycobacteria are eliminated, stationary, or dormant and few individuals (5–10%) will suffer progressive disease in the lung with the possibility to develop hematogenous dissemination. Importantly, dormant bacilli can reactivate months or years afterwards, presumably under conditions of failing immune surveillance. During progressive disease, granulomas often develop central necrosis, which give rise to cavities and aerogenic spread of mycobacteria.

Macrophages are the key cell type in mycobacterial infection, as they are involved in phagocytosis and killing of mycobacteria as well as in the initiation of adaptive T-cell immunity. Phagocytosis of mycobacteria involves different receptors such as the scavenger receptors, the mannose receptor, and complement receptors. Macrophages can eliminate mycobacteria through different mechanisms, such as production of reactive oxygen and nitrogen species or by autophagy (18) (see below). Activation of autophagy leads to phagosome maturation, increased acidification in the phagosome, and killing of mycobacteria in macrophages (19). However, MBT is able to avoid destruction mainly by inhibiting phagosome-lysosome fusion (20).

The interaction between mycobacteria and cells from both the innate and adaptive immune systems results in the secretion of chemokines and cytokines, the most important being tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-1 family (IL-1 β , IL-18), IL-12, and IFN-gamma. These molecules presumably are relevant for the progression of the disease. Accordingly, TNF- α -deficient mice succumb rapidly after MBT infection (21), and infection of IL-1 receptor type 1 knockout mice with mycobacteria is associated with lower production of IFN-gamma, defective granuloma formation, and lower survival (22). IFN-gamma activates macrophages to kill and eliminate the mycobacteria, and also enhances the expression of MHC class II molecules, which results in efficient antigen presentation to Th-1 cells, NK, CD4+, and CD8+ T cells upon release of endogenous IL-12 and IL-18 by macrophages and dendritic cells secrete IFN-gamma. Regarding macrophages, two main subtypes have been described: the classical and alternative activated phenotypes. The classical activated macrophages are induced by microbial products or IFN-gamma; this kind of cells have efficient antimicrobial effects and production of proinflammatory cytokines such as TNF α , IL1 β , IL12 (p40), and IL23 (23,24). Alternatively activated macrophages have lower antimicrobial activity and production of IL-12; they have a poor antigen presenting capacity and can suppress cellular immunity by production of IL-10 or TGF. These cells are induced by Th-2 cytokines such as IL-4, IL-13, or IL-10, which are predominant during the late phase of progressive disease. In fact, both alternatively activated macrophages and Th2



lymphocytes are efficient anti-inflammatory cellular elements that emerge during late progressive disease, when extensive inflammation has been evoked and produced tissue damage, but their activity suppress the protective Th1 response allowing bacilli proliferation and disease progression. Thus, T lymphocytes and macrophages polarization determine the outcome of the host response by skewing the pro- and anti-inflammatory immune response and subsequently the elimination of mycobacteria. Thus, the activation of the anti-inflammatory response is important to prevent the cellular damage induced by MBT infection and the excessive inflammatory response. This phenomenon has been observed, yet the mechanism that leads to this damage is still under investigation. For instance, we have observed that during the late stage of MBT infection, when a Th-2 response with high IL-4 production has emerged, TNF- α induces necrosis (25). Similarly, over-expressing IL-13, a cytokine expressed during Th2 immune response (26), may reproduce granuloma necrosis observed in MBT infection. It has been also reported that IL17-producing cells that participate in inflammatory responses are produced during MBT infection or vaccination, and can also induce necrosis by recruiting, activation and degranulation of neutrophils that produce tissue damage (27).

Since T lymphocytes and macrophages respond differently depending on different signals, it would be relevant to develop polypharmacologic compounds able on one side to directly kill MBT and at the same time to reduce the inflammatory damage caused by immune cells to the host; this combination of activities may on one side promote tolerance (*i.e.*, reduce toxicity of the pathogen) and on the other hand may promote resistance (reduce/eliminate the pathogen infection). Recognizing MBT's ability to escape this first line of defense, it is desirable to suppress the anti-inflammatory response of the host to allow for a prolonged, but moderated and more effective inflammatory response to eliminate MBT. Much of these pharmacologic actions may be achieved by controlling adequately autophagy as we will argue next.

Overview of Autophagy and Immune Response to *M. tuberculosis* Infection

Cells control the quality and quantity of organelles and biomass through a process known as "macroautophagy" (hereafter referred to as autophagy), in which the cytoplasmic target is wrapped into a double membrane vesicle, called autophagosome. Autophagosomes form *de novo* by the expansion of a membranous precursor structure named phagophore. Autophagosomes fuse with lysosomes to deliver the engulfed content for degradation or reuse. The molecular machinery for autophagy is conserved in evolution and involves several protein complexes that act in a sequential order. Here we mention only the molecules relevant for our discussion, a more comprehensive review can be found elsewhere (see for example Ref. 28). In a steady state, mTORC1 complex mainly inactivates the initiation complex ULK. Upon autophagy induction, ULK complex gets derepressed and activates class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) complex, in which BECN1 is a key component. This complex, in turn, stimulates nucleation of additional molecular components necessary to elongate the phagophore, surrounding the cytoplasmic cargo to be engulfed. Among the molecules recruited to the elongating phagophores is LC3-II, which is a lipidated protein attached to the membrane of the phagophore and autophagosome. It is degraded when autophagosomes fuse with lysosomes, so it is a reliable marker of autophagic vesicles. LC3-II serves as docking for autophagy receptors (protein adaptors like p62/SQMTS1), which bind to LC3-II and the cargo labeled for degradation (*e.g.*, with ubiquitin) (Fig. 2).

In the context of immunology, as a part of host defense, autophagy contributes to endogenous antigen presentation and it is induced by macrophage activation. Autophagy is an effector of T-helper 1 (Th1)/Th2 cell polarization, being activated by cytokines secreted by Th1, and inhibited by cytokines secreted by Th2. Autophagy also affects B and T-cell homeostasis and repertoire selection, and assist pattern recognition receptors (PRRs) by delivering cytosolic pathogen-associated molecular patterns (PAMP) to endosomal Toll-like receptors (TLRs) (29,30).

Autophagy also enables cells to eliminate intracellular microbes (intracellular bacteria, protozoan parasites and viruses) in a process called xenophagy. In order for bacteria to be engulfed, these must be labeled with ubiquitin or galectins, which are recognized by autophagic receptors (Fig. 2). Thus, autophagy has a prominent role in the control of cellular homeostasis and bacterial infections, which have motivated the use of diverse autophagy inducers to control this infection as reviewed below.

Autophagy also enables cells to eliminate intracellular microbes (intracellular bacteria, protozoan parasites and viruses) in a process called xenophagy. In order for bacteria to be engulfed, these must be labeled with ubiquitin or galectins, which are recognized by autophagic receptors (Fig. 2). Thus, autophagy has a prominent role in the control of cellular homeostasis and bacterial infections, which have motivated the use of diverse autophagy inducers to control this infection as reviewed below.

Targeting MBT Infection by Autophagy Induction

In the particular case of MBT, xenophagy is necessary to restrict the infection. There is a genetic connection between compromised autophagy and predisposition to TB. In a genome-wide association study (GWAS), two genes regulating autophagy (*ATG16L* and *IRGM*) were found to have polymorphisms in individuals affected by TB and chronic inflammatory bowel disease. Interestingly, mice lacking *Lrg47* (mouse orthologue for *IRGM*) fail to control MBT (31). An *in vivo* confirmation of the role of autophagy to reduce tuberculosis comes from studies in mice lacking *Atg5* expression in the myeloid lineage (*Atg5^{fl/fl}* LysM-Cre), which includes macrophages. Bacterial burden, inflammation, lung pathology and death were reduced in *Atg5^{fl/fl}* LysM-Cre mice compared with control mice (32). These results suggest that induction of autophagy for longer periods of time may reduce inflammation and promote the efficient elimination of MBT. Although further studies are required to validate this hypothesis, some further evidence described below supports this idea.

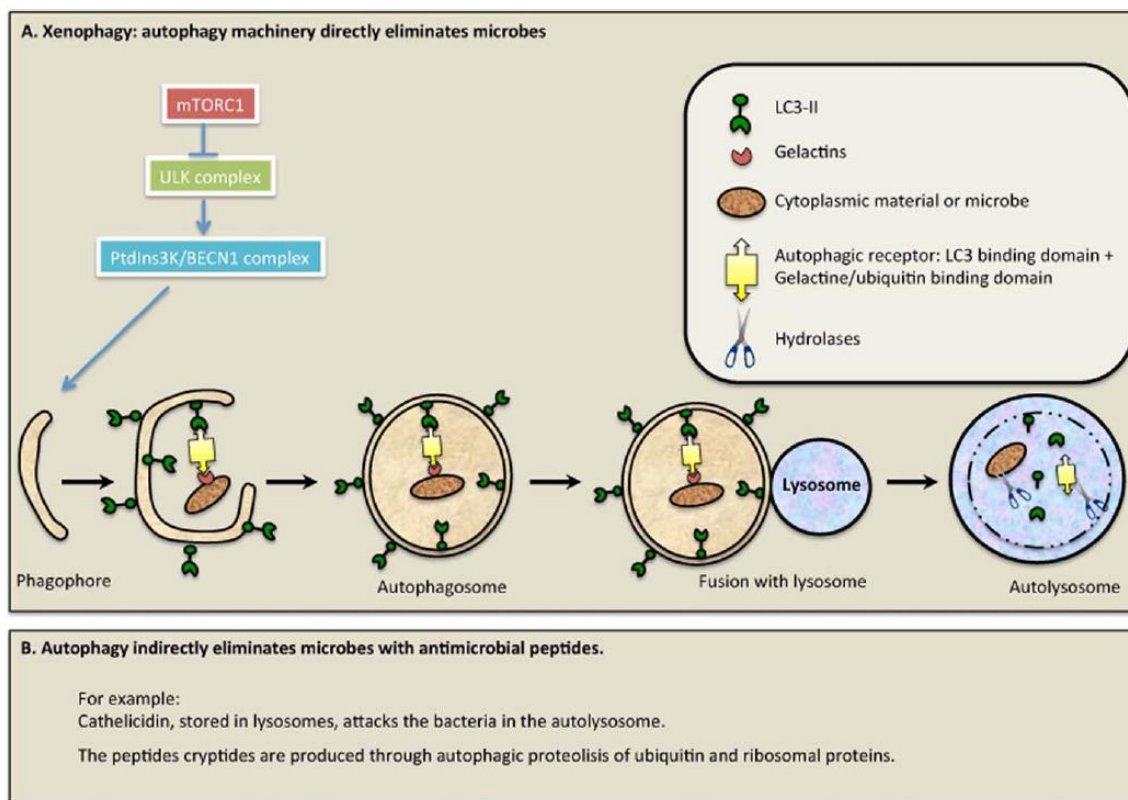


FIG 2

General overview of autophagy/xenophagy. A. In response to several stimuli, PtdIns3K/BECN1 protein complex triggers the nucleation of the molecular machinery necessary to elongate the phagophore around the material to be degraded. This complex is activated by active (phosphorylated) ULK complex, which in steady state is negatively regulated by mTORC1 complex. Once the leading edges of the elongating phagophore touch, they fuse to form a double membrane vesicle named autophagosome. This vesicle then fuses with a lysosome to create an autolysosome, where hydrolyases digest the engulfed material. The LC3-II protein binds to an adaptor protein that function as an autophagic receptor, binding both LC3-II and a molecular label (ubiquitin, gelactin, etc.) on the target to be engulfed. When microbes are also engulfed into autophagosomes and eliminated, this form of autophagy is called xenophagy. B. By autophagy, several antimicrobial peptides are produced that attack microbes. See text for details.

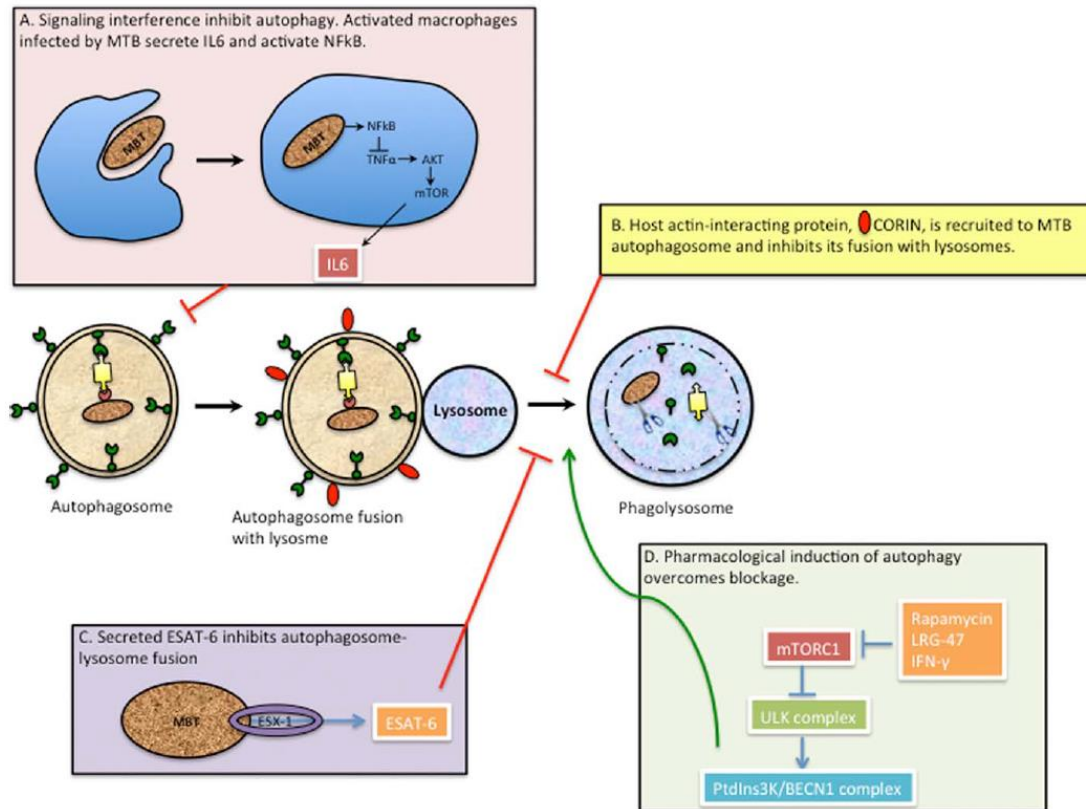
Autophagy may also promote the elimination of MBT by an indirect antimicrobial mechanism. During xenophagy against MBT, antibacterial peptides contribute to eliminate the parasite. For example, the peptide cathelicidin, which is normally stored in the lysosome, attacks the bacteria in the autolysosome (33). The peptides cryptides, on the other hand, are produced through autophagic proteolysis of ubiquitin (34) and ribosomal proteins (35). However, MBT and many other pathogens defend themselves from xenophagy by different mechanisms. In this review we mention only some strategies used by MBT to escape xenophagy degradation (Fig. 3) that might be targeted for pharmacological intervention to treat MBT infection.

One mechanism involves regulation of gene expression. In a study integrating genome wide RNAi screening with data

from transcriptional profiling during MBT infection, the genes predominantly affected were those that negatively regulate autophagy (36).

Another mechanism is through signaling interference. Macrophages infected by MBT produce TNF- α , which would induce autophagy by inhibiting mTOR through the AKT pathway. At the same time, MBT induces NF- κ B, a known inhibitor of TNF- α signaling. Another example is the production of IL6, an interleukin with multiple functions, including both pro- and anti-inflammatory. IL6 inhibits autophagy in THP-1 cells infected with MBT (reviewed in Ref. 29).

MBT has developed other strategies to escape xenophagy degradation mediated by the production of factors with anti-autophagic activity. For example, a 6kDa protein named ESAT-6 is secreted by MBT through ESX-1, a type VII


FIG 3

Some strategies used by MBT to escape xenophagy degradation. A, Signaling interference inhibits autophagy. B, C, examples of mechanisms by MBT to prevent autolysosome maturation. D, Pharmacological induction of autophagy overcomes MBT-induced autophagosome-lysosome fusion inhibition. See text for details.

secretion system. ESAT-6 inhibits autophagosome-lysosome fusion. Fortunately, this block can be overcome by pharmacological induction of autophagy (37). During MBT infection there is a characteristic lipid droplets accumulation that gives a foamy phenotype. Since lipid droplets are also digested by autophagy, their accumulation seems to be related to the inhibition of autophagosome maturation, for ESAT-6 presence correlates with the foamy phenotype (38). Another factor with anti-autophagic activity is CORIN, a host actin-interacting protein, which is recruited to MBT phagosomes and inhibits their fusion with lysosomes (39).

Interestingly, activating autophagy might overcome the xenophagy inhibition imposed by bacteria and could restore its bactericidal role. For example, in host phagocytic cells, as mentioned before, MBT interferes with phagosome maturation, inhibiting phagosome-lysosome fusion. Nevertheless, induction of autophagy with chemical compounds like rapamycin promotes maturation of mycobacterial phagosomes in a

PtdIns3K/BECN1-dependent fashion and concomitantly suppresses mycobacterial survival in infected macrophages (19). The same results were obtained by inducing autophagy with IFN-gamma (a cytokine with anti-tuberculosis action) or with LRG-47 (a downstream effector of autophagy in HeLa cells in response to IFN-gamma) (40).

Actually, the classic anti-tuberculosis drugs isoniazid and pyrazinamide require autophagy for their full potency against MBT in infected macrophages, as mycobacterial viability is not affected when *Becn1* or *Atg5* are knocked down. Autophagy induced by isoniazid and pyrazinamide also has an anti-inflammatory role (41). In addition, several compounds that induce autophagy, without a direct effect on MBT, also inhibit mycobacterial growth or survival (reviewed in Ref. 42). In a screen to identify molecules that specifically target host proteins required for controlling MBT infection, kinase inhibitors, G-protein coupled receptor modulators and ion channel inhibitors were identified as compounds that limit the proliferation

of the pathogen. One of them, SSRI fluoxetine, also enhances autophagy (43).

BCG, the only vaccine in current use against TB, is very irregular in its conferred protection and is not useful as a therapeutic vaccine in promoting the elimination of latent infection. In addition, a considerable number of MBT strains are becoming resistant to antimicrobial drugs (44). Therefore, finding autophagy inducers as alternative therapies will be beneficial. The clinical use of agents that augment autophagy, like rapamycin and everolimus, is already approved, but these compounds exert pleiotropic effects and cause side effects, revealing a need to develop specific inducers of autophagy. In such attempts, a strategy has been to manipulate microbial virulence factors that modulate host autophagy, and create autophagy-inducing peptides.

The first example was created analyzing the molecular domains of the interaction between BECN1 and the HIV-1 virulence factor, NEF, which lead to finding the sequence of BECN-1 necessary and sufficient for autophagy induction. This sequence was used to develop Tat-beclin1, an autophagy-inducing peptide able to improve the clinical outcome of neonatal mice infected with WNV or CHIKV viruses. The Tat-beclin1 peptide is composed of the HIV-1 Tat protein transduction domain (PTD) attached via a diglycine linker to 18 amino acids derived from amino acids 267 to 284 of BECN1, with three residues substituted to enhance peptide solubility. Because Tat-beclin 1 binds to GAPR1, which negatively regulates autophagy by recruiting BECN1, it was proposed that this peptide promotes the release of BECN1 and consequently induces autophagy (45). Further modifications were later included to improve intracellular delivery of Tat-beclin 1 and reduce its toxicity, binding it to an oligomer of 11 arginine residues through a leucine zipper motif. The hybrid peptide preserved the functionality of Tat-beclin1 (46). These peptides, however, have not been tested in treating bacterial infections caused by bacteria capable of inhibiting autophagy.

Other autophagy-inducing peptides were developed from the glycoprotein G of rhabdoviruses, since autophagy inhibits both *in vivo* and *in vitro* replication of these viruses in mammals and fish. Glycoprotein G of VSV (vesicular stomatitis virus) appears to be the pathogen-associated molecular pattern (PAMP) that interacts with Toll-7 (toll receptor 7), activating the autophagic antiviral program. To identify the autophagy-inducing region in glycoprotein G, 15-mer overlapping peptides spanning the whole sequence of Gvsv and Gvhsv (viral hemorrhagic septicemia virus) were tested. Two peptides located in the fusion domain of both VSV and VHSV Gs induced autophagy and inhibited viral replication. Interestingly, regardless of the source of the autophagy-inducing peptides (Gvsv or Gvhsv), protection against either virus was achieved (47).

Taking together all the strategies so far to control MBT infection, it is tempting to speculate that a peptide combining both antimicrobial and pro-autophagic activities would have a greater potential to limit MBT infection.

Lessons from Antimicrobial Peptides in Clinical Trials

With more than 2,500 antimicrobial peptides (AMPs) described in the Antimicrobial Peptide Database (48), only polymyxins, gramicidins, nisin, and daptomycin are currently approved for medical use (49). Recognizing the need of new antibiotics for clinical use (50), many AMPs have been tested in clinical trials providing knowledge from where to improve the development of new AMPs more likely to succeed in clinical trials.

Among the features that need to be improved is the selective toxicity against microorganisms *versus* host cells; many AMPs failed clinical tests because the required concentrations to kill microbes were toxic for mammalian cells (51–53). Increasing the peptide activity against a particular microbe may lead to reduced toxicity against the host cells. A possible route to achieve this is the development of specifically targeted antimicrobial peptides (STAMPs) that include functionally independent targeting, linker and antimicrobial regions synthesized as a single peptide (54,55). These are a particular class of multifunctional peptides, and certain combinations of targeting peptides with AMP are not always effective, since antimicrobial activity is reduced or abolished in some cases (56,57). The identification of the only STAMP currently entering clinical trials (C16G92) was the result of combining known peptide activities (58). Therefore more knowledge is required to understand the basis to design multifunctional peptides.

Another important aspect to take into account is the known ability of natural AMPs to boost the immune system, possibly by a mechanism independent of autophagy, thus reducing the need for long treatments or large amounts of antibiotics. If STAMPs were the route to improve current AMPs, this activity has to be taken into account. It is also important to consider modifications in peptides to make them more stable or available at the right place within the organism (bioavailability) (49). If these modifications are irreversible, it is important to consider the effect these may have on the multifunctional nature of AMPs. Recent reports on LL-37, an antimicrobial peptide capable of inducing autophagy in macrophages, may be one possible lead to explore TB treatment (59). In agreement with these observations, it has been recognized that host-directed therapies that promote autophagy, induce antimicrobial peptides in the host. Among other immune modulating activities, they have the potential to shorten treatment and reduce the lung injury caused by MBT infection (60).

Thus, multifunctionality of AMPs is a feature to be improved for clinical trials success. Currently, only few reports address the multifunctionality property in peptides, but the growing interest in peptides for clinical use may foster the area. The history of past antibiotics studies has shown us that gaining knowledge of their mechanism of action may lead to the design of better polypharmacological peptides to treat complex diseases such as TB.



Acknowledgements

To Dr. Maria Teresa Lara Ortiz and Dr. Beatriz Aguilar Maldonado for technical assistance in writing this work. This work was in part supported by grant number IN208014 (to G.R.) and IN206015, CB2013-220515 and Miguel Aleman foundation (to S.C.-O.) and CONACyT 253053 (to R.H.-P.).

References

- [1] Zaffiri, L., Gardner, J., and Toledo-Pereyra, L. H. (2012) History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *J. Invest. Surg.* 25, 67–77.
- [2] Kardos, N., and Demain, A. L. (2011) Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 677–687.
- [3] Falconer, S. B., Czarny, T. L., and Brown, E. D. (2011) Antibiotics as probes of biological complexity. *Nat. Chem. Biol.* 7, 415–423.
- [4] Barreto, P. D. S. (2013) Alzheimer's disease: learning from the past, looking to the future. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 28, 304–305.
- [5] Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768.
- [6] Clevers, H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* 17, 313–319.
- [7] Kumate, J. (1997) Infectious diseases in the 21st century. *Arch. Med. Res.* 28, 155–161.
- [8] Hopkins, A. L. (2008) Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* 4, 682–690.
- [9] Reddy, A. S. and Zhang, S. (2013) Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 6, 41–47.
- [10] Fosgerau, K., and Hoffmann, T. (2014) Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discov. Today* 20, 122–128.
- [11] Anighoro, A., Bajorath, J., and Rastelli, G. (2014) Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. *J. Med. Chem.* 57, 7874–7887.
- [12] Rodríguez Plaza, J. G., Villalón Rojas, A., Herrera, S., Garza-Ramos, G., Torres Larios, A., et al. (2012) Moonlighting peptides with emerging function. *PLoS One* 7, e40125.
- [13] DeBusk, R. F., Pepine, C. J., Glasser, D. B., Shpilsky, A., DeRiesthal, H., et al. (2004) Efficacy and safety of sildenafil citrate in men with erectile dysfunction and stable coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 93, 147–153.
- [14] Råberg, L. (2014) How to live with the enemy: understanding tolerance to parasites. *PLoS Biol.* 12, e1001989.
- [15] Glass, E. J. (2012) The molecular pathways underlying host resistance and tolerance to pathogens. *Front. Genet.* 3, 263.
- [16] Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L., Netea, M., and VanCrevel, R. (2011) Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 405310.
- [17] Rivas-Santiago, C., Hernández-Pando, R., and Rivas-Santiago, B. (2013) Immunotherapy for pulmonary TB: antimicrobial peptides and their inducers. *Immunotherapy* 5, 1117–1126.
- [18] Kunduand, M., and Thompson, C. B. (2008) Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu. Rev. Pathol* 3, 427–455.
- [19] Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., et al. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119, 6.
- [20] Armstrong, J. A., and D'Arcy, H. P. (1975) Phagosome lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent *Tubercle bacilli*. Reversal of the usual non-fusion pattern and observations on bacterial survival. *J. Exp. Med.* 142, 1.
- [21] Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., et al. (1995) Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 2, 6.
- [22] Juffermans, N. P., Florquin, S., and Camoglioetal, L. (2000) Interleukin1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 182, 902–908.
- [23] Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., et al. (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4560–4565.
- [24] Verreck, F. A. W., De Boer, T., Langenberg, D. M. L., Van Der Zanden, L., and Ottenhoff, T. H. M. (2006) Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukocyte Biol.* 7, 285–293.
- [25] Hernandez-Pando, R., and Rook, G. A. W. (1994) The role of TNF- α in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82, 591.
- [26] Heitmann, L., Abad Dar, M., Schreiber, T., Erdmann, H., Behrends, J., et al. (2014) The IL-13/IL-4R α axis is involved in tuberculosis-associated pathology. *J. Pathol.* 234, 338.
- [27] Khader, S. A., Bell, G. K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-Moreno, J., et al. (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* 8, 369.
- [28] Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D. J. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24.
- [29] Yu, X., Li, C., Hong, W., Pan, W., and Xie, J. (2013) Autophagy during *Mycobacterium tuberculosis* infection and implications for future tuberculosis medications. *Cell Signal.* 25, 1272–1278.
- [30] Delgado, M., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., et al. (2009) Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* 227, 189–202.
- [31] MacMicking, J. D., Taylor, G. A., and McKinney, J. D. (2003) Immune control of tuberculosis by IFN-gamma inducible LRG-47. *Science* 302, 654–659.
- [32] Castillo, E. F., Dekonenko, A., Arko-Mensah, J., Mandell, M. A., Dupont, N., et al. (2012) Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109.
- [33] Fabri, M., Stenger, S., Shin, D. M., Yuk, J. M., Liu, P. T., et al. (2011) Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci. Transl. Med.* 3, 104ra102.
- [34] Alonso, S., Pethe, K., Russell, D. G., and Purdy, G. E. (2007) Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6031–6036.
- [35] Ponpuak, M., Davis, A. S., Roberts, E. A., Delgado, M. A., Dinkins, C., et al. (2010) Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* 32, 329–341.
- [36] Kumar, D., Nath, L., Kamal, M. A., Varshney, A., Jain, A., et al. (2010) Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 140, 731–743.
- [37] Romagnoli, A., Etna, M. P., Giacomini, E., Pardini, M., Remoli, M. E., et al. (2012) ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy* 8, 1357–1370.
- [38] Singh, V., Jambwal, S., Jain, R., Verma, P., Gokhale, R., et al. (2012) *Mycobacterium tuberculosis*-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. *Cell Host Microbe* 12, 669–681.
- [39] Seto, S., Tsujimura, K., and Koide, Y. (2012) Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* 14, 710–727.
- [40] Ní Cheallaigh, C., Keane, J., Lavelle, E. C., Hope, J. C., and Harris, J. (2011) Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 291–300.
- [41] Kim, J. J., Lee, H. M., Shin, D. M., Kim, W., Yuk, J. M., et al. (2012) Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell Host Microbe* 11, 457–468.
- [42] Bradfute, S. B., Castillo, E. F., Arko-Mensah, J., Chauhan, S., Jiang, S., et al. (2013) Autophagy as an immune effector against tuberculosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 355–365.

- [43] Shoji-Kawata, S., Sumpster, R., Leveno, M., Campbell, G. R., Zou, Z., et al. (2013) Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* 494, 201–206.
- [44] Stanley, S. A., Barczak, A. K., Silvis, M. R., Luo, S. S., Sogi, K., et al. (2014) Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth. *PLoS Pathog* 10, e1003946.
- [45] García-Valtanan, P., Ortega-Villaizán Mdel, M., Martínez-López, A., Medina-Gali, R., Pérez, L., et al. (2014) Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral G glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules. *Autophagy* 10, 1666–1680.
- [46] Hakata, Y., Tsuchiya, S., Michiue, H., Ohtsuki, T., Matsui, H., et al. (2015) A novel leucine zipper motif-based hybrid peptide delivers a functional peptide cargo inside cells. *Chem. Commun.* 51, 413–416.
- [47] Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Renna, M., Imarisio, S., Fleming, A., et al. (2011) Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Mol. Cell* 43, 19–32.
- [48] Wang, Z., and Wang, G. (2004) APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res.* 32, D590–D592.
- [49] Eckert, R. (2011) Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Fut. Microbiol* 6,6, 635–651.
- [50] Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Oppici, C. A., Heiligers, D., et al. (2014) The emergence of peptides in the pharmaceutical business: from exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics* 4, 58–69.
- [51] Bartlett, K. H., Mccray, P. B., Jr., and Thorne, P. S. (2003) Novispirin g10-induced lung toxicity in a *Klebsiella pneumoniae* infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3901–3906.
- [52] Maher, S., and Mcclean, S. (2006) Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 71, 9.
- [53] Vaucher, R. A., Teixeira, M. L., and Brandelli, A. (2010) Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide p40 on eukaryotic cells. *Curr. Microbiol.* 60, 1.
- [54] Eckert, R., He, J., Yarbrough, D. K., Qi, F., Anderson, M. H., et al. (2006) Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3651–3657.
- [55] He, J., Yarbrough, D. K., Kreth, J., Anderson, M. H., Shi, W., et al. (2010) Systematic approach to optimizing specifically targeted antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2143–2151.
- [56] Qiu, X. Q., Zhang, J., Wang, H., and Wu, G. Y. (2005) A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1184–1189.
- [57] Qiu, X. Q., Wang, H., Lu, X. F., Zhang, J., Li, S. F., et al. (2003) An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. *Nat. Biotechnol* 21, 1480–1485.
- [58] Franzman, M. R., Burnell, K. K., Dehkordi-Vakil, F. H., Guthmiller, J. M., Dawson, D. V., et al. (2009) Targeted antimicrobial activity of a specific IgG-SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 14–20.
- [59] Rekha, R. S., Rao Muvva, S. J., Wan, M., Raqib, R., Bergman, P., et al. (2015) Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Autophagy* 11, 1688.
- [60] Wallis, R. S., and Hafner, R. (2015) Advancing host-directed therapy for tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 255.