

***PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BASICAS***

***(PEDECIBA)***

***MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.***

***OPCIÓN GENÉTICA***

**ROL DE LA REMODELACIÓN NUCLEOSÓMICA  
EN CÉLULAS SÍMIL SÍNDROME DE COCKAYNE**

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Maestría en Ciencias Biológicas

Sub-Área Genética

Montevideo- Uruguay

2016

# **ROL DE LA REMODELACIÓN NUCLEOSÓMICA EN CÉLULAS SÍMIL SÍNDROME DE COCKAYNE**

**Aspirante a Título de Maestría:**

Biólogo. JONATAN VALENCIA PAYÁN

**Tutor:**

WILNER MARTINEZ LOPEZ

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

Instituto De Investigación Biológicas Clemente Estable

Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Genética

Montevideo- Uruguay

2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo agradezco a Dios por permitirme alcanzar esta meta tan importante para mi desarrollo profesional y por todas las bendiciones recibidas en el transcurso de esta etapa.

Agradezco a mis padres, Renzo y Deyanira, y hermanos, Carmen y Cristian, por su apoyo y especialmente a Dayana por su colaboración y apoyo en el transcurso de esta experiencia profesional, pero aún más como experiencia de vida en su compañía.

A mis amigos, a todos aquellos que hicieron parte en cercanía y a la distancia, especialmente a las chicas LEIG, Veronica, Mareney y Leticia por su amistad y respaldo tanto profesional como personal con su compañía, apoyo y buenos consejos. A todos los integrantes de los laboratorios del Departamento de Genética y Microbiología del IIBCE, por su asesoría y permitir el desarrollo de gran parte de este trabajo.

Agradezco a mi tutor Wilner Martinez, por sus asesorías, su paciencia y apoyo para el desarrollo y cumplimiento en esta etapa profesional y toda su familia por su hospitalidad y amistad.

A los miembros del tribunal por su tiempo y buenos aportes para culminar con éxito esta meta.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	10
<b>1. INTRODUCCION</b>	12
1.1 Tipos de daño en el ADN	12
1.2 Mecanismos de reparación de ADN	13
1.2.1 Reparación de alineamientos erróneos (Mismatch Repair o MMR)	15
1.2.2 Reparación por escisión de bases (Base Excision Repair o BER)	16
1.2.3 Reparación de lesiones por rotura de doble cadena (DSBR)	17
1.2.4 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)	19
1.3 Organización de la cromatina	22
1.4 El código de histonas y la remodelación de la cromatina	27
1.5 Modificaciones post-traduccionales de las histonas	29
1.5.1 Metilación	31
1.5.2 Fosforilación	32
1.5.3 Ubiquitinación	33
1.5.4 Biotinilación	33
1.5.5 Sumoilación	34
1.5.6 Ribosilación	34
1.5.7 Acetilación	34

1.5.7.1 Acetiltransferasas de histonas (HATs)	37
1.5.7.2 Desacetilas de histonas (HDACs)	37
1.6 Inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDAC)	40
1.6.1 Ácidos grasos de cadena corta	41
1.6.2 Ácidos hidroxámicos	41
1.7 Remodeladores de cromatina ATP-dependientes	42
1.7.1 SNF2/ISWI	43
1.7.2 INO80	44
1.7.3 ISWI	45
1.7.4 CHD	45
1.8 Respuesta celular al daño, remodelación de la cromatina y NER	46
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>53</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
4.1 Objetivo general	54
4.2 Objetivos específicos	54
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>56</b>
5.1 Líneas celulares (AA8 y UV61) y condiciones de cultivo	56
5.2 Irradiación UVC y tratamiento con TSA	56
5.3 Ensayo de sobrevivencia o ensayo clonogénico	57

5.4 Ensayo de triple coloración fluorescente para detección de células apoptóticas	58
5.5 Ensayo “inmunoslotblot” para detectar inducción de CPD por UVC	60
5.6 Ensayo de digestión con nucleasa micrococcal (MNasa)	63
5.7 Lisado de células para extracción de proteínas totales	65
5.8 SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos anti-histona H4 acetilada y anti-histona total	66
5.9 Análisis de imágenes realizadas con el programa “Image J” (NIH)	67
5.10 Análisis estadísticos	67
<b>6. RESULTADOS</b>	69
6.1 Análisis del nivel global de acetilación de la histona H4 en células proficientes y deficientes en TC-NER expuestas a UVC	69
6.2 Análisis de la sobrevivencia de células AA8 y UV61 expuestas a diferentes dosis de UVC y/o TSA	74
6.3 Análisis morfológico de la frecuencia de células apoptóticas inducidas por UVC, TSA o UVC+TSA	77
6.4 Cuantificación de CPD inducidos por UVC en presencia o ausencia de TSA	79
6.5 Digestión de ADN por la nucleasa micrococcal (MNasa) de células AA8 y UV61 expuestas a UVC en presencia o ausencia de TSA	82
<b>7. DISCUSIÓN</b>	86

7.1 Niveles de acetilación de histonas en células símil Síndrome de Cockayne	88
7.2 Análisis de sobrevivencia e inducción de apoptosis en células proficientes y deficientes en CSB tratadas en forma combinada con UVC y TSA	89
7.3 Remoción de CPD inducidos por UVC en presencia o ausencia de TSA en células proficientes y deficientes en CSB	90
7.4 Remodelación nucleosómica inducida por UVC en presencia o ausencia de TSA en células proficientes y deficientes en CSB	92
<b>8. CONCLUSIONES</b>	94
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	96
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	99
<b>ANEXOS</b>	

## ABREVIATURAS

6-4 PP	6-4 Photoproducts – 6-4 fotoproductos
BER	Base Excision Repair – Reparación por escisión de bases
pb	Pares de bases
CHO	Chinese Hamster Ovary cells – Células de Ovario de Hámster Chino
CPD	Cyclobutane Pyrimidine Dimers - dímeros de pirimidinas
CSA	Cockayne Syndrome A – Síndrome de Cockayne A
CSB	Cockayne Syndrome B – Síndrome de Cockayne B
DSB	Double Strand Break – Ruptura de doble cadena
GGR	Global Genome Repair – Reparación Genómica Global
hs	Horas
HAT	Histone Acetyl Transferase – acetyltransferasas de histonas
HDAC	Histone Deacetylase – desacetilasas de histonas
iHDAC	Inhibidores de desacetilasas de histonas
HMT	Histone Methyl Transferase – metiltransferasa de histonas
HR	Homologous Recombination – recombinación homóloga
IRIF	Ionizing radiation induced foci – foco de inducción de radiaciones ionizantes
K	Lisina



MMR	Mismatch Repair – reparación de bases mal apareadas
NEHJ	Non homologous end joining – Unión terminal no homóloga
NER	Nucleotide Excision Repair- Reparación por escisión de Nucleótidos
R	Arginina
SAM	S-adenosilmetionina
TC-NER	Transcription Coupled Repair- Reparación acoplada a la Transcripción
TSA	Tricostatina A

## RESUMEN

El Síndrome de Cockayne se caracteriza por un defecto en la proteína denominada CSB (“Cockayne’s Syndrome B”), una enzima que forma parte de la familia de ATPasas SNF2 e integra un complejo remodelador de la cromatina relacionado con la vía de reparación acoplada a la transcripción (TCR) del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER). CSB facilita el reconocimiento de la lesión en el ADN y el acceso de las proteínas del sistema TC-NER. CSB también interactúa con la acetiltransferasa P300 en el sitio de la lesión, incrementando a nivel local la acetilación de las histonas.

La irradiación con UVC induce principalmente dos tipos de lesiones en el ADN llamadas dímeros de pirimidina (80%, CPD) y 6-4 fotoproductos (20%, 6-4PP), que son removidas por el sistema NER, el cual está dividido en dos sub-vías: la reparación genómica global (GG-NER) y la reparación acoplada a la transcripción (TC-NER). AA8 y UV61 son líneas celulares derivadas de fibroblastos de Hámster Chino, las cuales presentan una mutación en p53 y son deficientes en la reparación genómica global (GGR-NER). UV61, células similar Síndrome de Cockayne, se diferencia de AA8 por la presencia de una mutación en la proteína CSB (“Cockayne Syndrome B”) por tanto deficiente en el sistema TC-NER. En el presente trabajo de tesis nos hemos planteado determinar si cambios en el nivel de acetilación global de histonas en células deficientes en la proteína CSB están asociados con la hipersensibilidad de estas células a UVC, y de qué modo alteraciones en la remodelación de la cromatina afectan el procesamiento del daño inducido por la irradiación UVC. A su vez, nos planteamos como hipótesis que alteraciones en los niveles de acetilación provocan cambios en la remodelación nucleosómica originando la hipersensibilidad a UVC que poseen las células deficientes en CSB, similar Síndrome de

Cockayne, porque impiden el adecuado acceso de las proteínas del sistema TC-NER a las lesiones producidas por UVC sobre el ADN. Con los resultados obtenidos hemos demostrado mediante el empleo de western blot que la relajación global de la cromatina está asociada a un proceso de acetilación de histonas aún en células que son deficientes en p53 como ocurre con todas las líneas celulares CHO. A su vez, UV61 mostró una mayor sensibilidad a los tratamientos con TSA y UVC por separado, mientras que cuando se combinaron los tratamientos no se observó diferencia en la sensibilidad entre ambas líneas. Además, mediante inmunoblot empleando anticuerpos anti-CPD se cuantificó la cantidad de lesiones inducidas por UVC en presencia o ausencia de TSA. Se observó que con los tratamientos combinados UVC+TSA se produce una deficiencia en la remoción de CPD, fundamentalmente en las células proficientes en CSB o normales. Esto indicaría que un cambio en el nivel de acetilación de histonas pudiera estar impidiendo una correcta interacción entre las proteínas del sistema de reparación y el adecuado acceso a las lesiones en el ADN. Para verificar si un cambio en la remodelación de la cromatina estuviera impidiendo el adecuado acceso de las proteínas del sistema TC-NER a las lesiones inducidas por UVC, realizamos ensayos de digestión con nucleasa micrococcal, los cuales mostraron una disminución con los tratamientos combinados UVC+TSA, principalmente en la línea celular proficiente en CSB o normal. Estas evidencias, nos permitieron plantear que el desbalance en el proceso de acetilación de histonas podría estar en la base de la disminución en la remoción de las lesiones inducidas por UVC tanto en células símil Síndrome de Cockayne como en células normales tratadas con TSA, al disminuir las interacciones normales entre las proteínas de los sistemas de reparación y el daño sobre el ADN debido a cambios en la conformación de la cromatina.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Tipos de daño en el ADN

La exposición a diferentes factores del medio ambiente o incluso del medio intracelular puede originar daños al ADN, pero sin duda, la principal fuente de mutaciones proviene de errores espontáneos durante la replicación del material genético. Por otro lado, los daños en los nucleótidos por factores ambientales lo constituyen la radiación solar ultravioleta, radiaciones ionizantes o el humo del tabaco; productos del metabolismo celular normal como el agua oxigenada, las moléculas de oxígeno reactivas y ciertos metabolitos que actúan como agentes alquilantes; o la desaminación espontánea o inducida de citosina, adenina y guanina. Se estima que cada día se alteran unas 25000 bases por célula del total de  $3 \times 10^9$  que contiene el genoma humano. En términos generales, las lesiones en el ADN pueden ser de diferente naturaleza: rupturas de simple y doble cadena (inducidas por rayos X), “crosslinks” inter e intra cadena (a causa de agentes químicos) y diferentes tipos de modificaciones de bases (Figura 1). El daño en el ADN tiene consecuencias tanto a nivel celular como a nivel del organismo. En el primero dificulta los procesos de transcripción y replicación induciendo a la célula a la detención del ciclo celular, a la muerte celular programada y a la inestabilidad genómica. Las lesiones en el ADN pueden afectar directamente la transcripción o la replicación, lo que podría conducir a la muerte celular, contribuyendo al envejecimiento, e inducir mutaciones que pueden eventualmente desencadenar la carcinogénesis (Jan de Boer & Jan HJ Hoeijmakers, 2000). Alteraciones como los quiebres de doble cadena (DSB) son una de las lesiones más desafiantes para la integridad del ADN. Por otro lado, como resultado de la incorporación de dímeros de pirimidina (Cyclobutane Pirimidine Dimers,

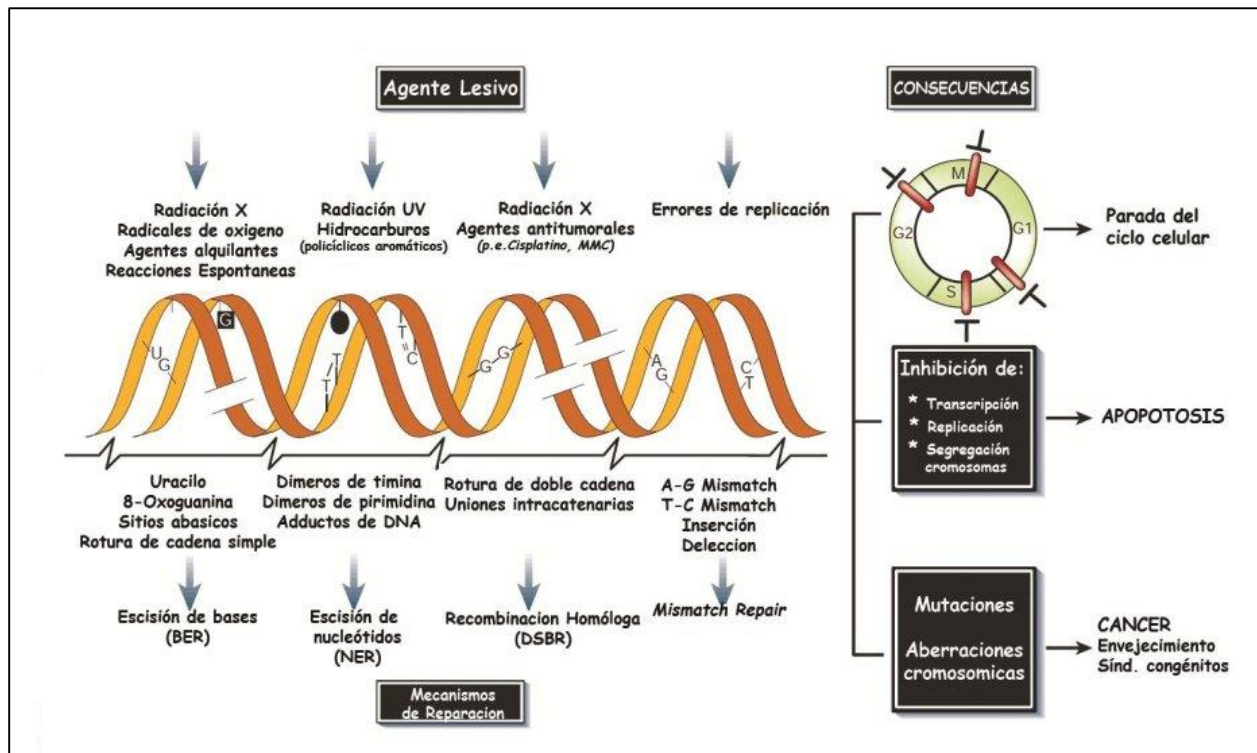
CPD) y 6-4 fotoproductos (pyrimidine-(6-4) pyrimidone photoproducts, 6-4PP) en la cadena de ADN inducidos por la exposición a la luz UV (principalmente UVC), puede llevar a la formación de las aberraciones cromosómicas a través del procesamiento de estas lesiones (Thompson, 2012).

Para preservar la integridad genómica frente a la acción de agentes genotóxicos como la irradiación UV, las células han desarrollado una red interrelacionada de diversas respuestas biológicas incluyendo la detección y señalización del daño en el ADN, la detención del ciclo celular y la activación de los sistemas de reparación (Jan HJ Hoeijmakers, 2001; Overmeer et al., 2011). Este complejo mecanismo de vigilancia y reparación del ADN, impide que el ADN dañado se transforme en una mutación, de modo de garantizar la transmisión precisa de la información genética, e impedir que la misma, de ocurrir en células germinales, sea heredada (Jan de Boer & Jan HJ Hoeijmakers, 2000). A su vez, defectos en la reparación o replicación del ADN dañado por la radiación UV, se encuentran relacionados con un incremento en el riesgo de desarrollar melanoma (Kaufmann et al., 2014).

## **1.2 Mecanismos de reparación de ADN**

El reconocimiento y la señalización del daño en el ADN es un prerrequisito para la inducción de las subsiguientes respuestas celulares: reparación, detención del ciclo celular en G1/S y G2/M y apoptosis (de Boer y Hoeijmakers, 2000). Se han descrito cuatro mecanismos principales de reparación del ADN: Mismatch Repair (MMR), Reparación por escisión de bases (BER), Reparación de rotura de doble cadena (DSBR), y Reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Figura 1). Los genes que codifican las proteínas que reconocen el daño en el genoma y los encargados de repararlo,

interactúan con los responsables del control del ciclo celular, de manera que la replicación y división de la célula se posterga hasta que las lesiones se hayan reparado. Si esto no se logra, se induce la apoptosis celular, evitando la transmisión del error a las células hijas. Cuando estos mecanismos fallan y el daño permanece sin que la célula muera, ésta la transmitirá a sus células descendientes, pudiendo iniciarse la transformación tumoral (Hoeijmakers, 2001).



**Figura 1.-** Tipo de lesiones inducidas en el ADN y sus mecanismos de reparación (de Boer y Hoeijmakers, 2000)

La funcionalidad de cada una de estas vías en un individuo determinado es independiente, y se han caracterizado varios síndromes hereditarios con una alta predisposición al cáncer debidos a defectos en los genes que participan en estas vías (Tabla 1).

**Tabla 1.-**Síndromes hereditarios por defectos en los mecanismos de reparación de ADN (Hoeijmakers, 2001)

SÍNDROME	Mecanismo de reparación afectado	Alteración genómica observada	Tipos de cáncer más frecuentes
Xeroderma Pigmentoso	NER	Mut. Puntuales	Cutáneos
Cockayne	TCR	Mut. Puntuales	Ninguno
Tricotiodistrofia	NER/TCR	Mut. Puntuales	Ninguno
Ataxia-Teleangiectasia	DSB	Alt. Cromosómicas	Linfomas
Nijmegen	DSB	Alt. Cromosómicas	Linfomas
BRCA1/BRCA2	HR	Alt. Cromosómicas	Mama y Ovario
Werner	HR	Alt. Cromosómicas	Varios
Bloom	HR	Alt. Cromosómicas	Leucemia, linfoma
Rothmund-Thomsom	HR	Alt. Cromosómicas	Osteosarcoma
HNPCC	MMR	Mut. Puntuales	Colorrectal

MMR: Mismatch Repair; DSB: rotura de doble cadena; NER: Reparación por escisión de nucleótidos; HR: Recombinación Homóloga; TCR: Transcription-coupled repair; HNPCC: Cáncer de colon hereditario no polipósico

### 1.2.1.- Reparación de alineamientos erróneos (*Mismatch Repair* o *MMR*)

La importancia del sistema MMR para mantener la estabilidad del genoma bacteriano se demostró hace más de 30 años con la observación que defectos en estas vías se asociaban a una alta tasa de mutaciones espontáneas. Poco después se comprobó que los defectos en MMR en células humanas producían un aumento de la inestabilidad de todo el genoma, incluyendo unas regiones altamente repetitivas denominadas microsatélites, lo que se asocia con el desarrollo de tumores tanto hereditarios como esporádicos (Kolodner, 1999).

La capacidad de este sistema para mantener la estabilidad genómica se ha asociado con la corrección de emparejamientos que se producen de forma errónea durante la replicación del ADN y el bloqueo de la recombinación entre secuencias similares, pero no idénticas (Recombinación no Homóloga). Se ha visto que el sistema MMR interviene también en los puntos de control del ciclo celular y en la muerte celular programada en respuesta a ciertos daños en el ADN (Hanawalt et al., 2003).

Los primeros estudios de inestabilidad genética, observaron que cuando el sistema MMR no funcionaba adecuadamente, se producía un aumento y, una alteración en el número de repeticiones de los microsatélites. Dicha inestabilidad (MSI), se asoció inicialmente con el desarrollo de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) debido a la presencia de una mutación inactivante en los genes MLH1, MSH2, MLH3, MSH6 y más rara vez en PMS2 (Bronner et al., 1994).

Trabajos posteriores demostraron que las formas esporádicas de cáncer de colon presentaban con cierta frecuencia alteraciones estructurales (Modrich, 1997) o inactivaciones epigenéticas (Hsieh, 2001) en estos mismos genes. Esta pérdida de MMR se ha observado también en tumores de endometrio, ovario, gástrico, cérvix, piel, pulmón, próstata, vejiga, mama y linfomas (Eshleman y Marcowitz, 1996). Por otro lado, se han publicado varios estudios que demuestran la importancia de MMR en la resistencia a quimioterápicos como temozolamida, cisplatino o 5-fluoruracilo (Li, 2007a).

### *1.2.2. Reparación por escisión de bases (Base Escisión Repair o BER)*

Algunos productos del metabolismo celular normal suponen una amenaza constante para la integridad del genoma, entre los que se incluyen las especies reactivas de



oxígeno (aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) derivados de la respiración oxidativa y de la peroxidación de los lípidos. Además, algunas uniones químicas pueden romperse de forma espontánea en condiciones fisiológicas, como sucede con la hidrólisis de nucleótidos a 37°C (Wood et al., 2001)

La escisión de bases (BER) es el principal mecanismo de eliminación de bases alteradas o añadidas erróneamente. El reconocimiento de la lesión y la rotura del enlace N-glicosil entre la base nitrogenada y la desoxirribosa-fosfato se realizan a través de un conjunto de glicosilasas, enzimas clave de este proceso. Presentan gran especificidad de sustrato, aunque se ha descrito cierta redundancia. La más abundante es UNG, que elimina los residuos de uracilo que han sido incorporados en vez de timina. Poseen un dominio catalítico de hasta 250 residuos y utilizan las regiones amino y carboxilo terminales para realizar interacciones adicionales con la cadena complementaria (Hoeijmakers, 2001).

Este mecanismo de reparación actúa a lo largo de todo el genoma, produciéndose en ocasiones el bloqueo de la transcripción, en cuyo caso se activa a la vez el mecanismo de TC-NER (*Transcription Coupled-Nucleotide Escisión Repair*). Actualmente, no se conoce ninguna patología humana causada por déficits en este mecanismo de reparación, en parte debido a la redundancia de función de algunas glicosilasas y al citado solapamiento con TC-NER. En estudios con modelos animales, se ha visto que la inactivación de las proteínas que intervienen en BER es letal (Hoeijmakers, 2001).

### 1.2.3. Reparación de lesiones por rotura de doble cadena (DSBR)

La rotura de doble cadena, que constituye una de las lesiones más nocivas para la célula, puede producirse por productos del metabolismo celular como las especies reactivas de

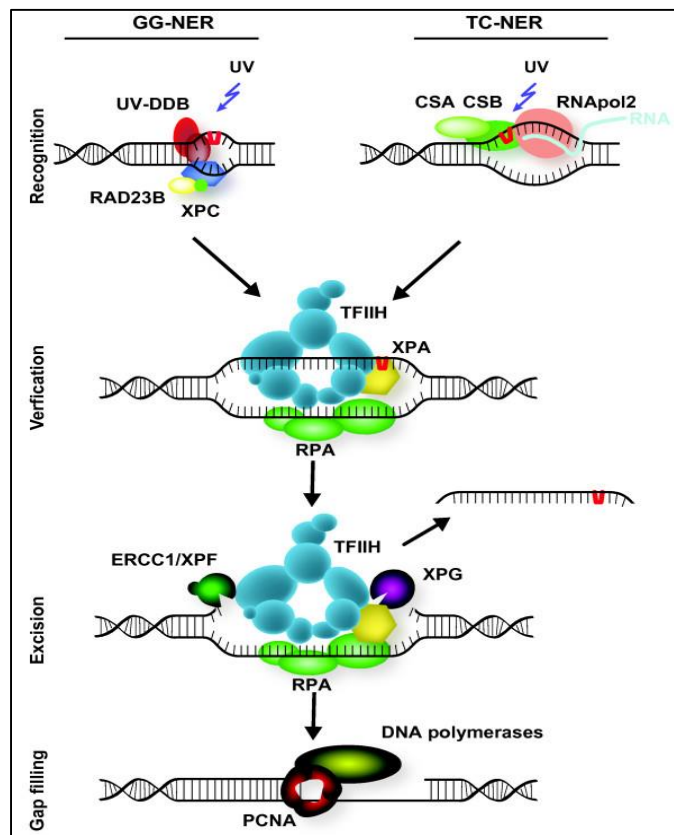
oxígeno, las radiaciones ionizantes, la rotura espontánea de cromosomas durante la replicación del ADN y algunos quimioterápicos como los inhibidores de la topoisomerasa IIa. Paradójicamente, también pueden ser secundarios a la actividad de otros mecanismos de reparación, como NER (Hoeijmakers, 2001; Haber, 2000). La célula dispone de dos sistemas para reparar estas lesiones: Recombinación Homóloga (HR, *homologous repair*) y Recombinación no homóloga (NHEJ, *Non-homologous end joining*). HR requiere una secuencia de ADN homólogo como molde, generalmente la cromátida hermana, por lo que solo puede llevarse a cabo tras la replicación del ADN, en las fases S y G2 del ciclo celular (Sonoda et al., 2006; Shen y Nickoloff, 2007). En cambio, mediante NHEJ, los extremos rotos son procesados por nucleasas y emparejados con otra secuencia de escasa o ninguna homología, por lo que es activa durante todo el ciclo, pero fundamentalmente durante G1, cuando no existe un cromosoma homólogo para que se produzca la recombinación (Mimitou y Symington, 2009). La reparación mediante NHEJ es mucho más rápida, pero introduce errores, ya que se pierde la secuencia del lugar donde asienta el DSB y la unión de extremos de secuencias situadas en dos cromosomas diferentes, puede originar translocaciones (Wood et al., 2001; Sonoda et al., 2006; Shen y Nickoloff, 2007). La elección del mecanismo que utilice la célula depende por lo tanto de la fase del ciclo celular en que se encuentre, así como, del manejo inicial de la rotura de doble cadena. Si los extremos 5' son degradados por nucleasas para producir colas 3' de cadena sencilla, que son el sustrato de RAD51, entonces, se iniciara el mecanismo de HR, inhibiéndose la NHEJ (Mimitou y Symington, 2009).

#### 1.2.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

La mayoría de los organismos vivos dependen directa o indirectamente de la energía solar para su subsistencia, lo que por otro lado puede ocasionarle graves daños debido a la exposición a los rayos ultravioletas (UV). NER es el mecanismo principal para resolver estas lesiones. Sin embargo, esta vía es muy versátil y a través de ella se reparan no solo los dímeros de pirimidinas inducidos por la radiación UV, sino también aductos de ADN debidos a sustancias químicas como cisplatino, N-acetil-acetoaminofluoreno o el tabaco. De hecho, se calcula que mediante la vía NER se reparan cerca del 70% de las lesiones en el ADN inducidas por el medio ambiente. Estas alteraciones distorsionan la estructura de la doble hélice e interfieren en la unión normal de las bases, alterando y bloqueando la replicación y la transcripción (Hoeijmakers, 2001). Se distinguen dos vías de reparación NER, según el mecanismo de reconocimiento de la lesión: a) GG-NER (*Global Genome Repair*) reconoce lesiones que distorsionan la doble hélice a lo largo de todo el genoma. Este reconocimiento se realiza a través del complejo XPC–HHR23B, que atrae hacia ese lugar al heterodímero DDB (*ADN damage binding*), iniciándose la reparación. b) TC-NER (*Transcription Coupled Repair*) actúa únicamente en las regiones transcripcionalmente activas cuando existe una lesión que bloquea la actividad de la RNA polimerasa II. Las proteínas CSA y CSB son las encargadas de reclutar el resto de factores que intervienen en esta vía, por lo que su función es crítica.

Una vez que se ha producido el reconocimiento de la lesión, los pasos que siguen GG-NER y TC-NER son idénticos (Li, 2007b) (Figura 2) y se inician con el desenrollamiento de la hélice mediante el complejo TFIIH, constituido por nueve proteínas, entre ellas,

XPD y XPB, con función helicasa. A continuación, y de forma secuencial, las endonucleasas realizan dos incisiones a ambos lados de la lesión. La primera de ellas, a unas 6 bases en sentido 3', la realiza XPG, mientras que la segunda, a 22 bases en sentido 5', la realizan un complejo que incluye a XPA, RPA y ERCC1-XPF. Se genera un oligonucleótido de 28 pb que ha perdido las uniones covalentes con el resto de la cadena de ADN y únicamente se mantiene unida a sus bases complementarias mediante puentes de hidrógeno (Hoeijmakers, 1996).



**Figura 2.-** Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en mamíferos (Lans, Marteijn, & Vermeulen, 2012)

Durante este proceso, RPA ha permanecido unida a la cadena sana, protegiéndola y facilitando la posterior resíntesis del fragmento eliminado. Para ello atrae a PCNA, un

factor de replicación que es capaz de reclutar a las ADN polimerasas  $\delta$  ó  $\epsilon$ . Finalmente, la ADN Ligasa I, une el extremo 5' del nuevo fragmento a la secuencia original (Laat y Hoeijmakers, 1999; Friedberg, 2001; Hanawalt et al., 2003).

Al menos tres síndromes se han asociado con déficits congénitos en NER: Xeroderma Pigmentoso (XP), Síndrome de Cockayne (CS) y Tricotiodistrofia (TTD), todos ellos con una extraordinaria sensibilidad a la luz solar. XP se origina por mutaciones en uno de los siete genes XP (XPA-XPG) y conlleva un riesgo de cáncer de piel 1000 veces mayor que el de la población general. El Síndrome de Cockayne se debe a mutaciones en CSA (ERCC8) y CSB (ERCC6) lo que produce un fallo en TC-NER. Esto hace que las células de estos individuos sean especialmente proclives a la apoptosis inducida por lesiones en el ADN, lo que les protege del desarrollo de tumores, pero cursa con un envejecimiento prematuro. Mutaciones e XPD o XPB pueden originar cualquiera de estos tres síndromes. Esto se explica porque estos dos genes son subunidades de TFIIH, que interviene tanto en NER como en el inicio de la transcripción, por lo que alteraciones en estos genes, no solo comprometen la reparación, sino también la transcripción y con ello favorecen la aparición de tumores y de alteraciones del desarrollo (Hoeijmakers, 2001; Li, 2007b; de Boer y Hoeijmakers, 2000).

Diferentes estudios sugieren que existen interacciones entre factores de unas y otras vías, como entre las ADN glicosilasas que intervienen en BER y factores de MMR y NER. También se relacionan a través de proteínas como PCNA y RPA, implicadas en la replicación que sigue a estos tres mecanismos de reparación (Hang, 2007).

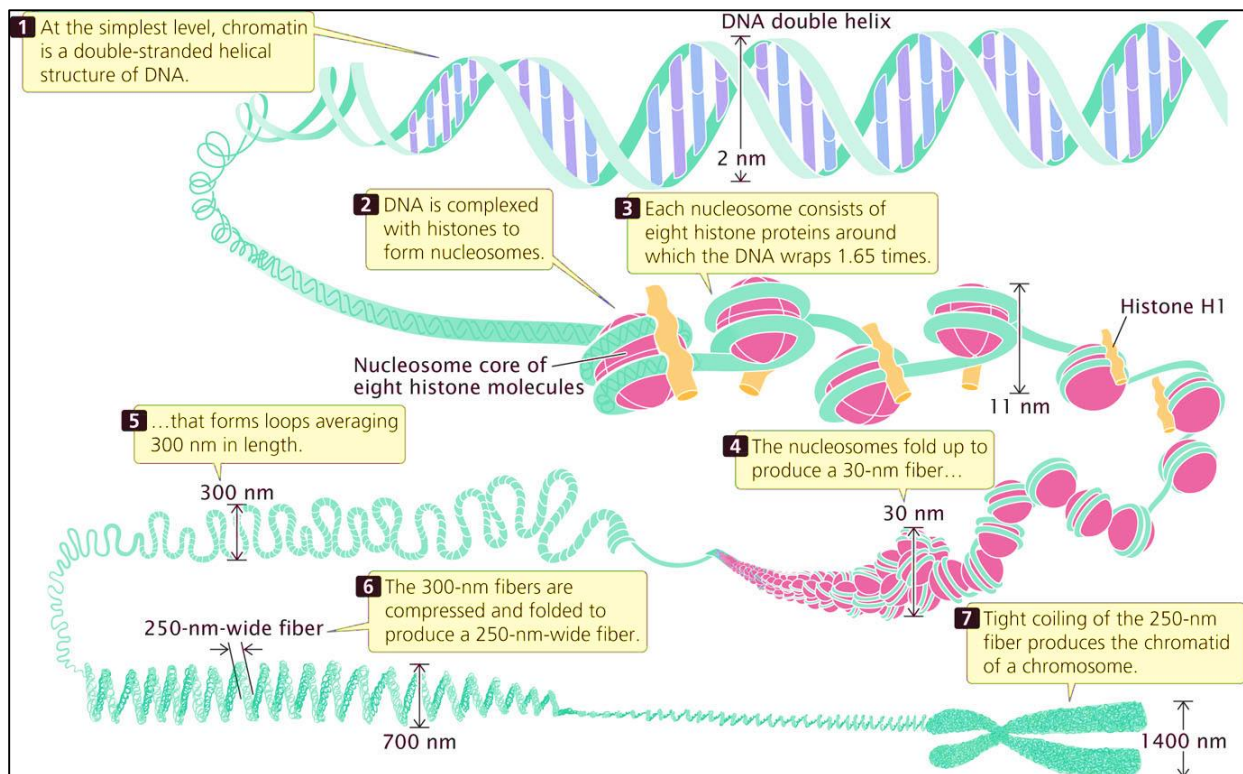
Debido a su naturaleza física, la estructura de la cromatina proporciona un enorme obstáculo para la maquinaria de reparación que intenta acceder a las lesiones del

ADN. De hecho, la reparación del ADN *in vitro* se ve considerablemente reducida o impedida cuando una lesión está contenida dentro de un nucleosoma. Por el contrario, la reparación del ADN *in vivo* se produce de manera eficiente a lo largo de todo el genoma, lo que indica que las células probablemente hayan desarrollado mecanismos para desempaquetar el ADN durante la reparación y volver a empaquetarlo al finalizar dicho proceso (Catherine M Green & Geneviève Almouzni, 2003). Numerosas investigaciones, sugieren que en este mecanismo interviene el código epigenético, modulado por las modificaciones post-traduccionales, especialmente por el proceso de acetilación de histonas del “core” nucleosómico. Éste, se ha asociado con una estructura de cromatina más abierta, facilitando la accesibilidad de la maquinaria de la transcripción, replicación y reparación (Ehrenhofer-Murray, 2004).

### **1.3 Organización de la cromatina**

El ADN de los organismos eucariotas se encuentra en el interior del núcleo celular interaccionando con proteínas que regulan su función. La cromatina es la estructura en la cual el ADN está empaquetado dentro del núcleo celular. Está constituida por ADN y proteínas, entre las que destacan las histonas. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que está compuesto por 147 pb de ADN que rodean, dando aproximadamente 1,7 vueltas, a un octámero de histonas formado por 2 dímeros de las histonas H3 y H4 y un tetrámero de histonas H2A y H2B (Luger et al., 1997; Napper et al., 2005). Existen varios niveles de compactación de la cromatina. El nivel más básico es el conformado por los nucleosomas separados entre sí por una porción de ADN (ADN espaciador) de longitud variable entre 10-90 pb que garantiza la flexibilidad de la fibra de cromatina. A este primer nivel se le llama estructura primaria de la cromatina o fibra de

11 nm de diámetro con estructura de “collar de cuentas”. La histona de unión H1 se puede unir al ADN espaciador permitiendo un mayor grado de compactación, la fibra de 30 nm de diámetro o estructura secundaria. Mediante interacciones entre proteínas específicas y ADN se producen los niveles superiores de compactación de la cromatina que constituyen los cromosomas (Figura 3).



**Figura 3.-** Niveles estructurales de la cromatina (tomado de [http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital\\_first\\_content/trunk/test/pierce5e/asset/img\\_ch11/c11\\_fig04.html](http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/pierce5e/asset/img_ch11/c11_fig04.html))

Funcionalmente la cromatina se divide en eucromatina y heterocromatina (Wolffe, 1998). La eucromatina es el estado en el que la cromatina es accesible a factores de transcripción y a la ARN polimerasa, con lo cual se asocia generalmente a un estado de transcripción génica activa. En cambio, la heterocromatina, mucho más compacta, se asocia a un estado de inactividad transcripcional (Hsu, 1962). La heterocromatina puede ser a su vez facultativa o constitutiva. La heterocromatina facultativa está asociada a aquellos genes que han de ser reprimidos específicamente en ciertos tejidos y la constitutiva a regiones de ADN repetido. La formación de eucromatina o heterocromatina depende fundamentalmente del número de contactos que se establezcan entre nucleosomas. Estos contactos a su vez están influidos por distintos factores: las modificaciones post-traduccionales de histonas, la maquinaria de remodelación de la cromatina y la incorporación de variantes de histonas (Belmont et al., 1999; Bassett et al., 2009).

Las histonas son proteínas altamente conservadas en eucariotas, lo que sugiere que la estructura fundamental de la cromatina aparece de forma temprana en la evolución, probablemente para solucionar el problema de empaquetamiento del ADN en el núcleo celular. Las histonas son las proteínas más abundantes que se unen al ADN en las células eucariotas. Son proteínas básicas con un peso molecular que oscila entre 11 y 20 kDa y que contienen aproximadamente un 20% de aminoácidos cargados positivamente, como la arginina y la lisina. Las células eucariotas contienen principalmente cinco tipos de histonas: la H1 o histona de unión, y las cuatro histonas nucleosómicas (H2A, H2B, H3 y H4) que conforman el octámero. Las histonas que forman parte del nucleosoma tienen una estructura similar; un dominio central y un extremo amino-terminal (N-terminal) de unos 20-35 aminoácidos. El dominio central



contribuye al ensamblaje del octámero que conforma el nucleosoma, mientras que los extremos N-terminales, ricos en aminoácidos básicos, tienen funciones muy importantes en los procesos normales de replicación y transcripción, ya que pueden ser modificados post-traduccionalmente y covalentemente por enzimas específicas provocando cambios en la estructura del nucleosoma y modificando los contactos internucleosomales (Zhang y Reinberg, 2001).

Además de las histonas descritas anteriormente, existen variantes de las histonas que se localizan en regiones concretas de la cromatina y con características distintas a las otras que pueden alterar las propiedades del nucleosoma y regular la dinámica de la cromatina. Las variantes de histonas no se sintetizan en la fase S del ciclo celular y se incorporan a la cromatina de forma independiente a la replicación del ADN. Las diferencias entre las histonas y sus variantes pueden oscilar entre pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos hasta cambios biofísicos importantes. La histona H1 tiene numerosas variantes (H5, variantes específicas de esperma y de testículo, entre otras) con funciones específicas. Algunas de ellas se han asociado a represión transcripcional durante la diferenciación celular (Buttinelli et al., 1999). La histona H2A es la que presenta un mayor número de variaciones: por ejemplo, H2A.Z, MacroH2A y H2A.X. La histona MacroH2A se localiza predominantemente en el cromosoma X inactivo y está asociada a una represión transcripcional (Costanzi y Pehrson, 1998). La histona H2A.Z se localiza en los sitios de unión de la proteína asociada a heterocromatina HP1, con lo cual también está asociada a un estado transcripcionalmente inactivo (Rangasamy et al., 2003). H2A.X se deposita a lo largo de todo el cromosoma y es fosforilada por las quinasas ATM y ATR en los sitios donde hay una rotura de la doble hélice, por lo que esta histona parece ser esencial en el reclutamiento al ADN de la maquinaria de reparación del ADN (Rogaku

et al., 1999). La histona H3 tiene dos variantes principales, la H3.3 y la variante centromérica que en mamíferos se llama CENP-A. H3.3. Se localiza en las regiones transcripcionalmente activas del cromosoma (Ahmad y Henikoff 2002) y CENP-A es necesaria para una correcta segregación cromosómica (Folco et al., 2008).

La función más común y la mejor estudiada de la histonas es la organización de la cromatina dentro del núcleo celular; sin embargo, también regula fuertemente los procesos que ocurren en el ADN, incluyendo la reparación, la replicación y la transcripción; características, de fundamental importancia para el desarrollo y la diferenciación (Ehrenhofer-Murray, 2004). Las modificaciones de las histonas que otorgan un nivel superior de regulación de la expresión génica se las integra dentro de los mecanismos denominados epigenéticos. La estructura de la cromatina es esencial para el control epigenético de genes y para la organización funcional de los cromosomas. Diferentes estudios han relacionado las distintas modificaciones covalentes de las colas de las histonas con la modulación del estado “encendido” o “apagado” de la cromatina, influenciando a la transcripción y la condensación de los cromosomas (Vettese-Dadey et al., 1996). Las histonas nucleosómicas experimentan una serie de modificaciones post-traduccionales como resultado de procesos de acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, entre otros (Grunstein, 1997). Estas modificaciones ocurren generalmente en residuos aminoacídicos específicos de sus extremos N-terminales, generando una gran diversidad en la estructura de los nucleosomas. El alto número de combinaciones posibles de cambios post-traduccionales permite generar un amplio repertorio de señales para la regulación génica; fenómeno denominado “código de histonas” (Jenuwein y Allis, 2001).

#### **1.4. El código de histonas y la remodelación de la cromatina**

Hasta hace algunos años se pensaba que la cromatina sólo constituía una forma de compactación del ADN para mantenerlo dentro del núcleo celular. Sin embargo, el descubrimiento que la adición de grupos acetilos en las histonas altera el acceso de otras proteínas al ADN, ha llevado a los investigadores a plantear un papel importante de la cromatina en la regulación génica (Pennisi, 2001). Las histonas son químicamente modificadas por distintos mecanismos ya sea en forma temporal o permanente. Las histonas no acetiladas se encuentran frecuentemente metiladas; esta adición de grupos metilo podría estar involucrada con el silenciamiento de genes, tal como sucede con la metilación del ADN. Ha sido demostrado que la metilación de la histona H3 por ejemplo, constituye la base para que otra proteína denominada HP1, que impide el proceso de transcripción, se una a la cromatina (Rea et al., 2000). Procesos como metilación, acetilación, fosforilación y otros cambios que probablemente ocurran en combinación han llevado a Jenuwein y Allis (2001) a definir la existencia de un “código de histonas” que podría extender la información potencial del código genético. Estos autores proponen que este sistema de marcado epigenético representa un mecanismo de regulación de la expresión génica. Las variaciones en la estructura de las histonas mediante modificaciones covalentes (acetilación, fosforilación, metilación) de sus dominios terminales permiten regular el contacto de otras proteínas con el ADN subyacente. Los diferentes estados de la cromatina (tales como los dominios de eucromatina y heterocromatina) dependen de la combinación y concentración local de los nucleosomas modificados en forma diferencial. Por tanto, estas tres modificaciones covalentes pueden encontrarse ya sea en regiones de cromatina activa o inactiva (Jenuwein y Allis, 2001).

A modo de ejemplo, un extremo amino terminal de una histona H3 puede existir en dos estados de modificación diferente que son probablemente regulados por un cambio entre la lisina en posición 9 (Lys9) metilada y la serina en posición 10 (Ser10) fosforilada. La fosforilación en Ser10 inhibe a Lys9 metilada, pero se acopla en forma sinérgica con la acetilación de la Lys9 y/o Lys14 durante la estimulación hormonal o mitogénica en células de mamífero. En este estado fosforilado-acetilado, el extremo amino terminal de la histona H3 modificada favorece la activación transcripcional. Por el contrario, la deacetilación de Lys14 en la histona H3 ocurre para facilitar la subsecuente metilación de Lys9. El epítipo constituido por Lys9 metilada de la histona H3 facilita la unión de la proteína HP1 a las regiones heterocromáticas (Jenuwein y Allis, 2001).

Además de los procesos de modificación covalente existen complejos de proteínas que utilizando la hidrólisis del ATP pueden alterar la estructura de la cromatina. Se han descrito varios complejos dependientes de ATP que remodelan la cromatina, pero las familias SWI/SNF e ISWI son los más conocidos (Narlikar et al., 2002). Los complejos de remodelación dependientes de ATP probablemente afectan diferentes tipos de procesos regulatorios que ocurren en la cromatina (por ejemplo, a nivel de la replicación, recombinación o reparación), y seguramente la regulación de estas actividades pueda contribuir en la regulación de la arquitectura nuclear. El complejo SWI/SNF ha sido fuertemente relacionado con la regulación de promotores específicos, con lo cual se sugiere la importancia que seguramente posean los complejos de remodelación dependientes de ATP en la regulación de la expresión génica. Se sugiere, a su vez, que los complejos de remodelación dependientes de ATP serían utilizados en primera instancia para modificar la estructura de la cromatina y que posteriormente procesos como la acetilación o deacetilación podrían ser una parte esencial del proceso que altera

la estabilidad termodinámica de una estructura de cromatina dada, y por tanto, ayudaría a fijar la estructura en un estado ya sea activo o reprimido (Peterson y Workman, 2000).

Todo lo expuesto anteriormente demuestra claramente que la estructura de la cromatina es dinámica y que los cambios en la misma, se encuentran fuertemente regulados. Una serie de evidencias experimentales sugieren que los complejos de remodelación dependientes de ATP utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para aumentar la velocidad a la cual diferentes estructuras se intercambian. Estos complejos convertirían entonces a la cromatina en una estructura más fluida. A su vez, mecanismos como por ejemplo acetilación y deacetilación, permitirían posteriormente fijar a los genes en un estado activo o reprimido (Kingston y Narlikar, 1999). Los procesos de modificación de las histonas darían lugar a cambios en el acoplamiento ADN-histonas que permitiría una mayor accesibilidad al ADN, tanto para los factores de transcripción como para los agentes mutagénicos. Este último hecho podría desempeñar un papel crítico en la distribución del daño inducido sobre el genoma.

### **1.5. Modificaciones post-traduccionales de las histonas**

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas están estrechamente ligadas con el proceso de regulación de la transcripción génica. Las histonas que constituyen el nucleosoma tienen una conformación predominantemente globular, a excepción de sus extremos N-terminales, que están desestructurados. Una de las particularidades de estas histonas es que pueden estar sometidas a un gran número de modificaciones covalentes. Aunque la mayor tasa de modificación reside en los extremos N-terminales, también se han descrito modificaciones en la parte globular de estas histonas (Ng et al., 2002). Gracias a la espectrometría de masas y al uso de anticuerpos específicos se han descrito

al menos ocho modificaciones diferentes de histonas localizadas en más de 60 aminoácidos distintos (Tabla 2). Estas modificaciones son dinámicas y reversibles, que aparecen y desaparecen de la cromatina en cuestión de minutos dependiendo de las condiciones de señalización dentro de la célula.

**Tabla 2.** Tipos de modificaciones de histonas y principales funciones (Tomado de Kouzarides,2007).

<b>TIPO DE MODIFICACIÓN</b>	<b>RESIDUOS MODIFICADOS</b>	<b>FUNCIÓN REGULADA</b>
<b>ACETILACIÓN</b>	K9H3, K14H3, K18H3, K36H3, K56H3 K5H4, K8H4, K12H4, K16H4 K5H2A, K12H2B, K15H2B	Transcripción, reparación del DNA, replicación, condensación cromosómica
<b>METILACIÓN DE LISINAS</b>	K4H3, K9H3, K27H3, K36H3, K79H3 K20H4	Transcripción, reparación del DNA
<b>METILACION DE ARGININAS</b>	R2H3, R8H3, R17H3, R26H3 R3H4	Transcripción
<b>FOSFORILACIÓN</b>	T3H3, S10H3, S28H3 S1H4 S14H2B	Transcripción, reparación del DNA, condensación cromosómica
<b>UBIQUITILACIÓN</b>	K119H2A, K120H2B	Transcripción, reparación del DNA,
<b>SUMOILACIÓN</b>	En residuos de lisina	Transcripción
<b>RIBOSILACIÓN</b>	En residuos de lisina	Transcripción
<b>DEIMINACIÓN</b>	R2H3, R3H4	Transcripción
<b>ISOMERIZACION</b>	P30H3, P38H3	Transcripción

Hay dos mecanismos de acción bien caracterizados por los cuales las modificaciones de histonas se traducen en una función celular determinada: la eliminación o relajación de las uniones entre histonas y ADN para producir un estado abierto de cromatina o eucromatina, y el otro mecanismo, relacionado con la capacidad que tienen estas modificaciones para reclutar a proteínas no histónicas al ADN y ejercer así una función determinada. Las proteínas no histónicas se unen a estas modificaciones a través de dominios específicos de unión. La metilación de las histonas puede ser reconocida por cromosomas, por dominios Tudor y dominios MBT (*malignant brain-tumor*). La

acetilación de histonas es reconocida por bromo-dominios y la fosforilación es reconocida por dominios de la familia de proteínas 14-3-3 (Kouzarides, 2007).

### *1.5.1. Metilación*

La metilación de histonas está relacionada con los procesos de regulación de la transcripción génica, respuesta al daño genético y formación de la heterocromatina. Tiene lugar sobre residuos de lisina y arginina, que pueden ser mono- di- o trimetiladas en el caso de la lisina, y mono- o dimetilados en el de la arginina. La histona que presenta una mayor tasa de metilación es la H3, seguida de la H4. Esta metilación ocurre en las lisinas 4, 9, 27 y 36 de la histona H3, en la lisina 20 de la H4, en las argininas 2, 8, 17 y 26 de la histona H3 y en la arginina 3 de la histona H4 (Munshi et al., 2009). El extremo amino terminal de la histona H1 y sus variantes también puede estar metilado (Lu et al., 2009). A diferencia de la acetilación y fosforilación de histonas, la metilación parece ser más estable, lo que podría convertirla en una modificación epigenética de larga duración ligada a la conformación de la cromatina (Jenuwein y Allis, 2001).

Las enzimas que catalizan la adición de un grupo metilo a las argininas y/o lisinas de las histonas se llaman metiltransferasas de histonas (HMTs) y son enzimas muy específicas que modifican normalmente a un determinado residuo de una histona en particular. Estas enzimas contienen una secuencia de 130 aminoácidos muy conservada llamada dominio SET y utilizan SAM (S adenosil-metionina) como donante del grupo metilo. Existen tres sitios de metilación en las histonas que están bien caracterizados como activadores de la transcripción: 3meK4H3, 3meK36H3 y 3meK79H3. En levadura, la modificación 3meK4H3 se localiza hacia el extremo 5' de los genes activos, asociándose con la ARN polimerasa II durante la iniciación de la transcripción (Ng et al., 2003). La 3meK36H3 se

acumula en la región 3' de los genes activos, asociándose con la ARN polimerasa II durante el proceso de elongación (Kouzarides, 2007). La trimetilación de K79H3 por la metiltransferasa DOT1L se relaciona también con una actividad transcripcional (Steger et al., 2008). Por el contrario, otras tres metilaciones específicas de histonas se han asociado con una represión transcripcional: K9H3, K27H3 y K20H4. La metilación de la K9H3 está implicada en el silenciamiento génico y en la formación de heterocromatina por reclutamiento de la proteína HP1 a los promotores de los genes reprimidos (Eskeland et al., 2007). La metilación de la K20H4 está asociada a la formación de heterocromatina y a la reparación del ADN (Sanders et al., 2004). Sin embargo, la metilación de histonas en los residuos de arginina, se pueden asociar tanto a activación como a represión génica, dependiendo de las enzimas que se recluten a los promotores (Lee et al., 2005).

### 1.5.2. Fosforilación

La fosforilación de histonas se lleva a cabo sobre residuos de treonina y serina y se ha relacionado con el control transcripcional y mitótico. Es un proceso mediado por diferentes quinasas (i.e. MSK1, MSK2) en el que está implicado múltiples vías de señalización celular. La fosforilación de la histona H1 aumenta la tasa de disociación de la cromatina *in vivo*, favoreciendo así la transcripción génica. La fosforilación de H1 también está implicada en la progresión del ciclo celular: los niveles de fosforilación de H1 son bajos en la fase G1 y van aumentando a lo largo de la progresión del ciclo, existiendo niveles máximos de fosforilación cuando los cromosomas están condensados durante la mitosis y meiosis. La fosforilación de la Ser10 de la histona H3, que está mediada por las quinasas de la familia aurora (Aurora-A y B en mamíferos), se ha asociado a genes transcripcionalmente activos (Allison y Milner, 2003). Esta modificación



covalente tiene un papel muy importante en la reparación del ADN. La variante de la histona H2A, la H2AX, se fosforila en el extremo carboxilo terminal como respuesta a la rotura de la doble hélice de ADN producida por radiaciones y colabora en el reclutamiento de enzimas reparadoras del ADN (Furuta et al., 2003).

### 1.5.3. Ubiquitinación

La ubiquitinación de histonas la llevan a cabo las enzimas denominadas ubiquitinasas (i.e. Bmi, RNF) sobre los residuos de lisina. Aún no está clara la asociación de esta modificación con un estado transcripcional activo o inactivo, ya que se han visto resultados en ambas direcciones. La ubiquitinación de K119H2A llevada a cabo por las proteínas Bmi1/Ring1A (*Bmi1 polycomb ring finger oncogene/ring finger protein*) se ha asociado con represión transcripcional, mientras que la ubiquitinación de la K120H2B mediada por RNF20/RNF40 (*ring finger protein 20/ring finger protein 40*) y UbcH6 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2E1; UBC4/5 homolog yeast*) se asocia con activación. Además, la monoubiquitinación de la H2A se ha relacionado con la reparación del ADN (Zhu et al., 2009).

### 1.5.4. Biotinilación

La biotinilación o incorporación de biotina a las histonas es una reacción catalizada por dos clases de enzimas: la biotinilasa, que usa lisina biotinilada como sustrato, y la holocarboxilasa sintetasa (*HCS*), que usa como sustrato biotina y ATP. Se han identificado varios sitios de biotinilación, la K4, K9 y K18 de la H3 y la K8 y K12 de la H4. Aún no se sabe mucho sobre las implicaciones que puede tener la biotinilación de histonas en los procesos celulares. Se ha relacionado con silenciamiento transcripcional

y reparación del ADN (Peters et al., 2002) y se ha observado que pequeños cambios en la biotilación pueden afectar a otras modificaciones de histonas, tales como acetilación y metilación (Kothapalli et al., 2005).

#### 1.5.5. Sumoilación

La sumoilación es la incorporación de un grupo SUMO (*Small Ubiquitin Modifier*) de forma covalente a residuos de lisina de las histonas. Esta modificación puede ocurrir sobre cualquiera de las histonas que conforman el nucleosoma. La sumoilación antagoniza con la acetilación y la ubiquitinación sobre en el mismo residuo de Lys, estando relacionada por lo tanto con una represión génica (Nathan et al., 2006).

#### 1.5.6. Ribosilación

Las histonas pueden estar mono- o poli-ribosiladas con ADP (adenosín difosfato) en los residuos de lisina mediante 2 tipos de enzimas, las que catalizan la reacción de mono-ribosilación denominadas MARTs (*mono-ADPribosyltransferases*), y las que catalizan la reacción de poli-ribosilación, las enzimas PARPs (*poly-ADP-ribosyltransferases*). Esta modificación se ha relacionado con la transcripción génica. La rotura de la doble hélice induce los mecanismos de reparación celular y produce un aumento en los niveles de histona poli-ribosilada gracias a un incremento en la actividad de PARP-1, activando la transcripción génica de *PS2 (estrogenresponsive gene)* (Ju y Rosenfeld, 2006).

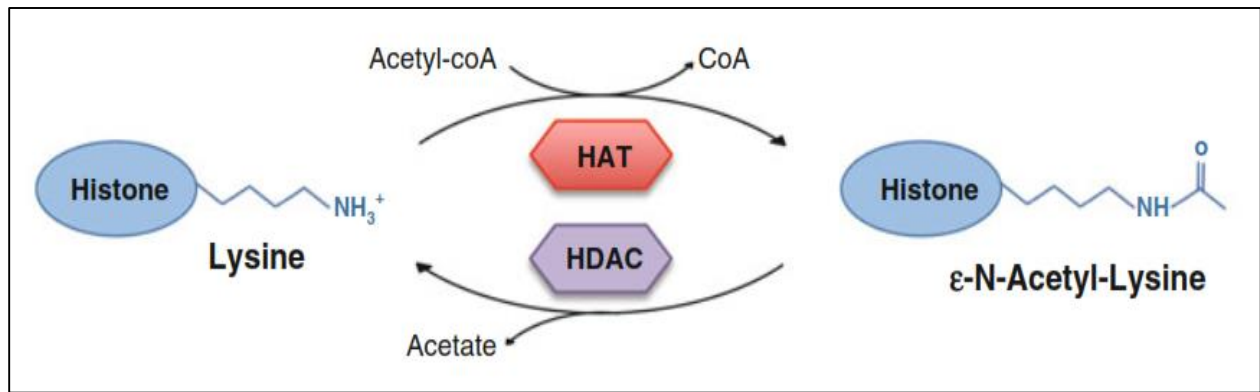
#### 1.5.7. Acetilación

La acetilación de las histonas tiene lugar sobre los residuos de lisina y es la modificación covalente más estudiada. Está implicada en el control transcripcional y en la reparación

de daños en el DNA (Zhao et al., 2008). La acetilación de histonas es un proceso relacionado con una transcripción génica activa, mientras que la desacetilación de histonas está asociada con un estado más compacto de la cromatina y un silenciamiento transcripcional. En las células eucariotas la mayor parte del genoma está constituido por cromatina transcripcionalmente inactiva cuyas histonas presentan hipoacetilación. La incorporación de un grupo acetilo al grupo amino de una lisina tiene efectos sobre la cromatina a dos niveles. En primer lugar, la acetilación neutraliza la carga positiva del grupo amino de la lisina, por lo cual las interacciones entre la carga positiva de la histona y la negativa del ADN se hacen más débiles, por lo que aumenta la accesibilidad de distintas proteínas, entre las que se incluyen factores de transcripción, al ADN nucleosómico. En segundo lugar, la acetilación es reconocida por proteínas portadoras de un dominio específico, el bromo-dominio. Estas proteínas pueden ser factores de transcripción o proteínas implicadas en el remodelaje de la cromatina dependiente de ATP. En la mayoría de las especies los principales residuos donde se produce acetilación son las lisinas 9, 14, 18 y 23 de la histona H3 y las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histona H4 (Jeppesen, 1997). La acetilación de las histonas H3 y H4 tiene distintas funciones. La acetilación de la H3 parece estar implicada en la regulación de la expresión génica, mientras que la acetilación de la histona H4 depende del ciclo celular, siendo más abundante en fase S, por lo que parece tener un papel en la incorporación de histonas al ADN recién replicado y en la estructura de la cromatina. Por todo ello, no es de extrañar que la histona H3 tenga mucha mayor densidad que la H4 en número de modificaciones post-traduccionales, además de presentar más variantes de histonas que la H4 (Margueron et al., 2005).

La Lys 16 de la histona H4 (K16H4) es el residuo que aparece acetilado con más frecuencia (entre un 40 y un 60% de la H4) en las células de mamífero. Esta modificación está asociada a un estado transcripcional activo y es el primer de los 4 residuos de lisina de la cola N-terminal de H4 en ser acetilado, seguido de la K12 y K5/K8. La acetilación de K16H4 (AcK16H4) está implicada en la regulación de la topología del ADN y en la inhibición de la formación de la fibra de 30 nm de ADN. La acetilación de la K16H4 está relacionada con el estado abierto y activo de la cromatina y está asociada a otras modificaciones de histonas tales como: acetilación de K12H4, K9H3, K11H2B, K16H2By 3meK4H3. Sin embargo, esta modificación antagoniza con las siguientes: 3meK9H3, 3meK27H3, meK20H4 y con la sumoilación de la H4 (Huang et al., 2005b). Debido a la facultad de esta modificación de relajar las uniones entre histona y ADN y generar un estado abierto de la cromatina, la acetilación de K16H4 también se ha asociado a la reparación del ADN, ya que facilita la unión al ADN de las proteínas de reparación (Gupta et al., 2005; Yu et al., 2005). Además, AcK16H4 puede ser reconocido y unirse a varios factores, por ejemplo, al factor de transcripción Bdf1, componente del complejo Swr1 de remodelaje de la cromatina.

La acetilación de histonas es un proceso reversible y altamente dinámico mediado por dos clases de enzimas con actividades opuestas, las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs) (Figura 4).



**Figura 4.-** Reacción reversible de acetilación de histonas catalizada por HDACs y HATs (Tomado de: Steunou, Rossetto y Côté, 2014).

#### 1.5.7.1. Acetiltransferasas de histonas (HATs)

Las HATs son las enzimas responsables de la adición de un grupo acetilo de la acetilcolina a ciertas lisinas del extremo amino terminal de las histonas. Las HATs se pueden clasificar siguiendo dos criterios, según su homología y según su función. En función de la homología de secuencia se clasifican en 3 familias: GNAT, CBP/P300 y MYST. Según su función, las HATs se pueden clasificar en dos tipos: las HATs de tipo A, responsables de la acetilación de histonas implicadas en la regulación de la estructura de la cromatina y de la transcripción génica; y las HATs de tipo B, proteínas citoplasmáticas que catalizan la acetilación de histonas en el citoplasma (en particular de la lisina 5 y 12 de la histona H4) antes de que se unan a la nueva hebra de ADN recién replicado (Verrault et al., 1998).

#### 1.5.7.2. Desacetilasas de histonas (HDACs)

Las HDACs humanas están divididas, basándose en su homología con las HDACs de levadura, en cuatro familias: Clase I, Clase II, Clase III o Sirtuinas y Clase IV. Las HDACs

de clase I comprenden a la HDAC-1, -2, -3, y -8. Las HDACs de clase II están subdivididas, según homología en su secuencia y según su organización en dominios, en dos clases: IIa y IIb. Las HDACs de clase IIa incluyen a las enzimas HDAC-4, -5, -7 y -9 y las de clase IIb, la HDAC6 y HDAC-10. Las HDACs de clase III son enzimas dependientes de NAD<sup>+</sup> y conforman la familia de las Sirtuinas, llamada así por su homología con SIR2 de levadura. La clase IV de HDACs está conformada únicamente por la HDAC11 (Tabla 3). Las clases I, II y IV, también llamadas HDACs clásicas, comparten homología en sus secuencias y requieren Zn<sup>+2</sup> para ejercer su actividad de desacetilación. En cambio, las Sirtuinas no comparten homología con las otras clases de HDACs y necesitan NAD<sup>+</sup> como cofactor.

FAMILIA	MIEMBRO	LOCALIZACIÓN CELULAR	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	SUSTRATOS NO HISTÓNICOS
Clase I	HDAC1	núcleo	1p34	p53, MyoD, E2F-1, Stat3, androgen
	HDAC2	núcleo	6q21	Bcl-6, Stat3, GR, YY-1
	HDAC3	núcleo	5q31	GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP
	HDAC8	Núcleo/citoplasma	Xq13	nd
Clase IIa	HDAC4	Núcleo/citoplasma	2q37	GCMa, GATA-1, HP-1
	HDAC5	Núcleo/citoplasma	17q21	Smad7, HP-1, GCMa
	HDAC7	Núcleo/citoplasma	12q13 (2 isoformas)	FLAG1, FLAG2
	HDAC9	Núcleo/citoplasma	7p15-p21 (3 isoformas)	nd
Clase IIb	HDAC6	citoplasma	Xp11	α-tubulina, HSP90, SHP, Smad7
	HDAC10	citoplasma	22q13	HSP90?
Clase IV	HDAC11	Núcleo/citoplasma	3p25	nd

**Tabla 3.-** Diferentes clases de HDACs. GR: receptor de glucocorticoides.

nd: no determinado (Witt et al., 2009).

Las HDACs de clase I se expresan en todas las células, con localización predominantemente nuclear y tienen un papel muy importante en la regulación de la proliferación. HDAC2 podría suprimir la apoptosis en células tumorales (Huang et al.,

2005a). En cambio, HDAC6, que está localizada en el citoplasma, desacetila a  $\alpha$ -tubulina e interviene en el control de la dinámica de microtúbulos y además, también se ha visto que tiene la facultad de unirse directamente a proteínas ubiquitinadas (Boyault et al., 2006).

Las HDACs de clase II tienen un papel más importante a nivel local, estando estrechamente ligadas a procesos de diferenciación celular. Las HDACs pueden regular la expresión génica de distintas formas. En primer lugar, las HDACs pueden impedir la transcripción génica mediante su actividad desacetiladora de histonas, que produciría un incremento entre las interacciones iónicas de las histonas cargadas positivamente y el ADN cargado negativamente, produciendo una estructura de la cromatina más compacta que dificultaría el acceso a los factores de transcripción y maquinaria de transcripción. Además, las HDACs pueden regular la expresión génica de otras formas. Pueden hacerlo por interacción directa con factores de transcripción (E2F, p53, Rb, NF- $\kappa$ B) o bien, ejerciendo su actividad catalítica sobre sustratos no histónicos implicados en funciones de homeostasis, diferenciación y apoptosis (Minucci y Pelicci, 2006). Las HDACs son enzimas clave en la regulación del ciclo celular y la apoptosis gracias a su interacción con determinados factores de transcripción. Por ejemplo, HDAC1 y HDAC2 están implicadas en la represión transcripcional mediada por la proteína Rb. E2F, factor de transcripción implicado en el control del ciclo celular, se asocia a la proteína Rb reprimiendo la transcripción de los genes que están bajo su control. Esta represión puede estar causada por un reclutamiento de HDACs a los promotores de estos genes (Robertson et al., 2000).

Una de las interacciones mejor conocidas entre HDACs y proteínas no histónicas es la interacción de HDACs y ADN metilado mediante la unión a proteínas con un dominio de unión al ADN metilado (MBD, *methyl-binding domain*). Las proteínas MBD reclutan complejos que contienen HDACs a promotores hipermetilados como mecanismo de represión génica. Las HDACs también pueden interaccionar con otras proteínas modificadoras epigenéticas, tales como metiltransferasas del ADN. Por ejemplo, se ha observado que células tumorales deficientes en DNMT1 tienen incrementados los niveles de H3 acetilada y disminuidos los de H3 metilada. Estos cambios se asocian con una pérdida de interacción de HDACs y proteína HP1 (*heterochromatin protein 1*) con la histona H3 (Espada et al., 2004).

#### **1.6. Inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDAC)**

Las HDACs regulan gran cantidad de procesos celulares como la expresión génica, la homeostasis, el control del ciclo celular, la diferenciación o la apoptosis celular. En tumores se han descrito patrones de expresión alterados de las distintas HDACs que ponen de manifiesto su implicación en los procesos de formación y progresión tumoral. El uso de iHDAC para revertir los cambios epigenéticos anómalos presentes en las células cancerosas, ha surgido como una estrategia potencial para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos malignos (Slingerland, Guchelaar, & Gelderblom, 2014). La actividad adicional de histonas en las proteínas no histónicas proporciona la oportunidad del iHDAC para revertir y prevenir los efectos de la desacetilación anómala a través de modificaciones epigenéticas y de los efectos sobre otras proteínas no histonas que son importantes en la oncogénesis (Lane & Chabner, 2009). Según su estructura química, los inhibidores de HDACs (iHDAC) se pueden dividir en cuatro



clases: ácidos grasos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos y benzamidas.

#### 1.6.1. Ácidos grasos de cadena corta

Los más estudiados son los butiratos y el valproato. Su mecanismo de acción aún no está claro; podrían competir con el acetato liberado en la reacción de desacetilación. Los butiratos se han asociado a la inhibición del crecimiento tumoral en próstata, colon, endometrio, neuroblastoma en donde actúan a concentraciones del rango de milimolar (Condorelli et al., 2008). El butirato sódico (NaB) es un producto de la fermentación anaeróbica generado por las bacterias intestinales y es uno de los ácidos grasos con actividad de IHDAC mejor estudiados. Inhibe el crecimiento de células tumorales induciendo arresto del ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Kim et al., 2007b; Li et al., 2008). El valproato sódico (VPA) inhibe a las HDACs de clase I y IIa más eficientemente que el NaB. Aunque el VPA se usa como anticonvulsivo para el tratamiento de la epilepsia, numerosos estudios demuestran su efecto antitumoral en cáncer de próstata, neuroblastoma, etc. Reduce de forma significativa el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en animales con tumores. Es causante también del arresto del ciclo celular, de la descondensación de la cromatina y de fenómenos de diferenciación celular (Marchion et al., 2005).

#### 1.6.2. Ácidos hidroxámicos

A este grupo pertenecen dos de los IHDAC más comúnmente utilizados en el laboratorio, la tricostatina A (TSA) y el ácido hidroxámico del suberoylanilide (SAHA). El TSA fue aislado de *Streptomyces hygroscopicus* como antibiótico antifúngico. El TSA es un

inhibidor no competitivo de HDACs de clase I y de clase II, pero no ejerce ningún efecto sobre las Sirtuinas. TSA puede interactuar con el sitio catalítico de la desacetilasa de histona resultando en la inactivación de este sitio catalítico y la prevención de la unión a su sustrato (Meschini, Morucci, Berni, Lopez-Martinez, & Palitti, 2015). De acuerdo con múltiples estudios, el tratamiento con TSA provoca un aumento en la acetilación de histonas globalizado, causando una decondensación reversible de las regiones eucromáticas (Tóth et al., 2004). El SAHA es un potente inhibidor de HDACs de clase I y II capaz de unirse y bloquear el centro activo de estas enzimas. Es muy eficaz como inductor de apoptosis y diferenciación celular a bajas concentraciones. Desde el año 2006, el SAHA, o también llamado Vorinostat, está aprobado por la US FDA (*Food and Drug Administration of United States*) como agente antitumoral para el tratamiento de CTCL (*Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma*) y está siendo usado en numerosos ensayos clínicos contra el cáncer de próstata, melanoma, linfomas, etc.

### **1.7. Remodeladores de cromatina ATP-dependientes**

Los remodeladores de cromatina ATP-dependientes son grandes complejos multiproteicos que se encuentran muy conservados en eucariotas. Se caracterizan por presentar una subunidad ATPasa perteneciente a la familia SNF2 de ATPasas y helicasas que contienen un dominio ATPasa compuesto por las regiones DExx y HELICc (Flaus, 2006; Flaus et al., 2006). Estos complejos se agrupan en cuatro familias fundamentales: SWI/SNF, INO80/SWR1, ISWI y CHD, en base a la organización de sus dominios funcionales.

Estos complejos carecen de la capacidad de unirse a los genes de forma específica, por lo que los factores de transcripción suelen dirigir su reclutamiento hacia los promotores

donde realizan su acción. Allí emplean la energía derivada de la hidrólisis del ATP para alterar sus interacciones entre ADN e histonas y mediar diferentes acciones, como: el deslizamiento de nucleosomas, variando la posición de estos en el ADN; la creación de un estado remodelado en el que el ADN es más accesible pero las histonas permanecen unidas; la disociación completa entre el ADN y las histonas y el reemplazamiento de histonas por variantes de histonas (Mohrmann y Verrijzer, 2005).

### 1.7.1. SNF2/ISWI2

El complejo SWI/SNF, en levaduras (cuyo homólogo humano es SNF2/SWI2), fue el primer complejo remodelador de cromatina descrito. Varias de sus subunidades fueron identificadas genéticamente como proteínas implicadas en la regulación del gen codificante de la endonucleasa HO y del gen SUC2 en levaduras. HO es necesario para el intercambio del tipo sexual, de ahí SWI (SWItching deficient), mientras que los mutantes Suc2 son clasificados como no fermentadores de sacarosa y de ahí el acrónimo SNF (Sucrose NonFermenting) (Sudarsanam y Winston, 2000). El complejo SWI/SNF está altamente conservado en eucariotas y posee homólogos en *Drosophila* y humanos (Kingston y Narlikar, 1999). La función del complejo SWI/SNF fue inicialmente asociada a la cromatina, cuando se descubrió que mutaciones que suprimían los fenotipos asociados a los mutantes *swi/snf* de levadura correspondían a genes que codificaban proteínas de histonas y otros componentes de la cromatina (Winston y Carlson, 1992). Posteriormente, se comprobó que el complejo SWI/SNF, purificado tanto en levaduras como en humanos, alteraba la estructura de los nucleosomas de forma ATP dependiente. El complejo SWI/SNF tiene la capacidad de unirse al ADN y a los nucleosomas con alta afinidad, pero sin especificidad de secuencia; contiene un dominio de interacción rico en

AT (ARID) que permite la unión no específica al ADN y un dominio conservado SANT que interacciona con los dominios N-terminales de las histonas, y que es importante para la función del complejo. Los complejos SWI/SNF de levaduras y eucariotas superiores contienen proteínas relacionadas con actina, Arp7 y Arp9. Estas proteínas podrían proporcionar una unión a estructuras nucleares, tales como la matriz nuclear (Yang et al., 2007).

### 1.7.2. *INO80*

La familia de remodeladores INO80/SWRI (INOitol requiring 80/Sick UIT Rat8 ts 1) es única ya que contiene un dominio ATPasa dividido en dos regiones (Bao y Shen, 2011). El gen INO80 apareció en un rastreo genómico dirigido a la identificación de genes requeridos para la activación del gen de síntesis de inositol INO1, importante en varias rutas de señalización. INO80 juega un papel más amplio que el resto de los remodeladores en la regulación génica ya que participa en la activación transcripcional, en la reparación del ADN y en paradas de las horquillas de replicación (Shimada et al., 2008). El complejo INO80 carece de dominios de reconocimiento de histonas, por lo que se desconoce cómo es dirigido a los sitios de transcripción, reparación y replicación. El complejo SWR-C/SWR1 es un remodelador de cromatina que altera la composición de los nucleosomas. SWR1 utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para reemplazar la histona H2A por su variante H2A.Z en los nucleosomas del promotor. H2A.Z promueve la transcripción mediante la desestabilización de nucleosomas (Zhang et al., 2005). Esta variante de histona se ha asociado con estados de cromatina abierta, más que con estados cerrados, aunque su presencia no es suficiente para crear un entorno transcripcionalmente activo.

### 1.7.3. ISWI

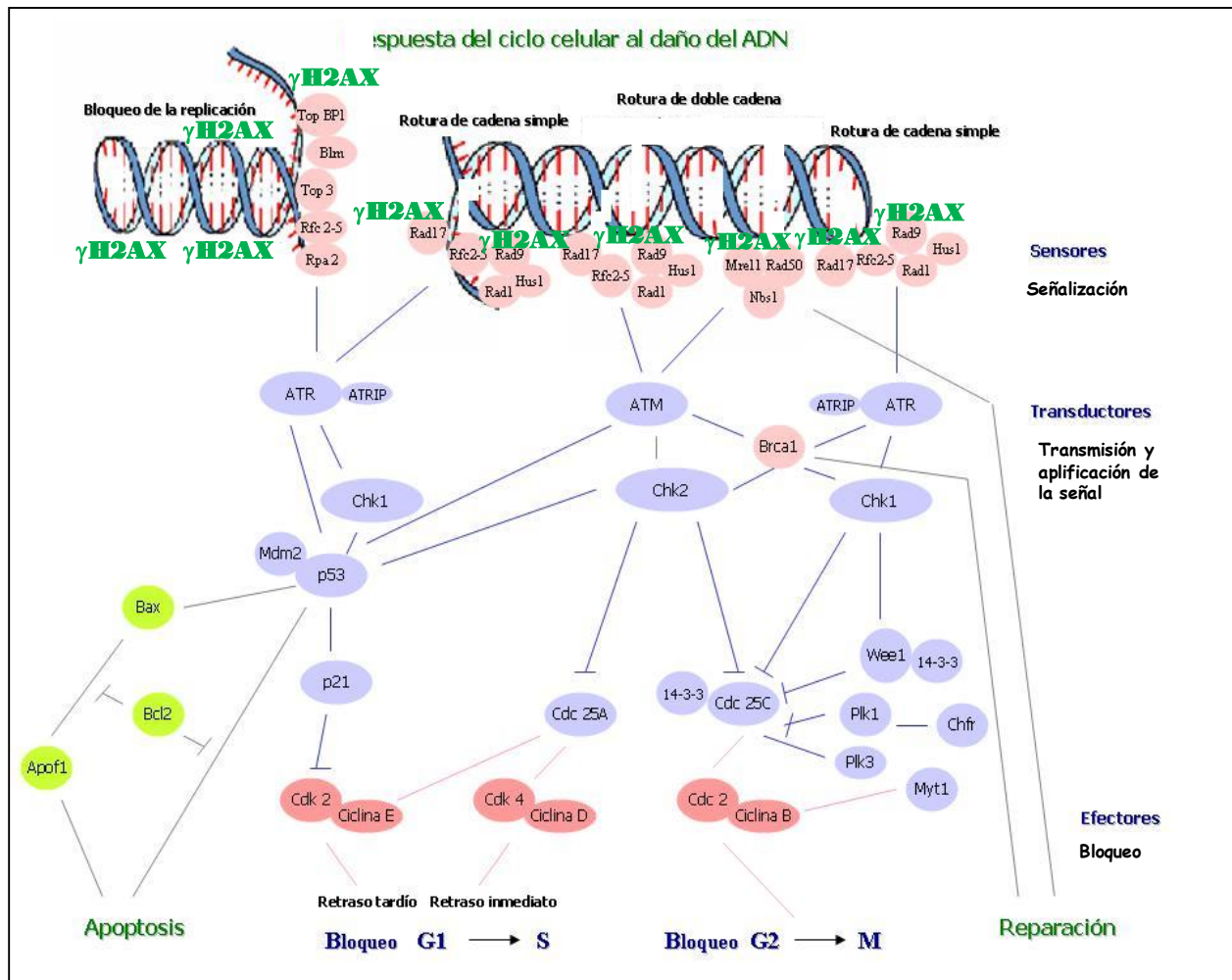
Al contrario que los complejos de las familias SWI/SNF e INO80, la familia ISWI (Immunitation SWItch) lleva a cabo la organización de la cromatina creando cadenas de nucleosomas uniformemente espaciados, en las que algunos nucleosomas se sitúan en regiones inicialmente desfavorables. La organización de la cromatina por estos complejos, ayuda a prevenir la transcripción en sentido contrario en regiones intergénicas y la transcripción aleatoria por la RNAP II que tiene lugar si la densidad y localización de nucleosomas no está optimizada (Whitehouse et al., 2007).

### 1.7.4. CHD

Las ATPasas de la familia CHD (Chromodomain-Helicase-ADN-binding) se caracterizan por tener un tándem de cromodominios en el extremo amino terminal, además del dominio ATPasa conservado ya mencionado. Se conocen 9 miembros dentro de esta familia que han sido divididos en 3 subfamilias basándose en la similitud de los dominios estructurales que presentan. Los miembros CHD1 y CHD2 se distinguen por presentar un dominio de unión a ADN en el extremo carboxilo, CHD3- CHD5 tienen PHD fingers emparejados en el extremo amino terminal, y CHD6-9 tienen otros dominios funcionales en su extremo carboxiloterminial (Nioi et al., 2005). También se ha podido observar que CHD6 se induce en células linfoblastoides humanas sometidas a radiación gamma de baja dosis y, por lo tanto, podría estar implicado en proliferación celular y radiosensibilidad (Wang et al., 2006a).

## **1.8. Respuesta celular al daño, remodelación de la cromatina y NER**

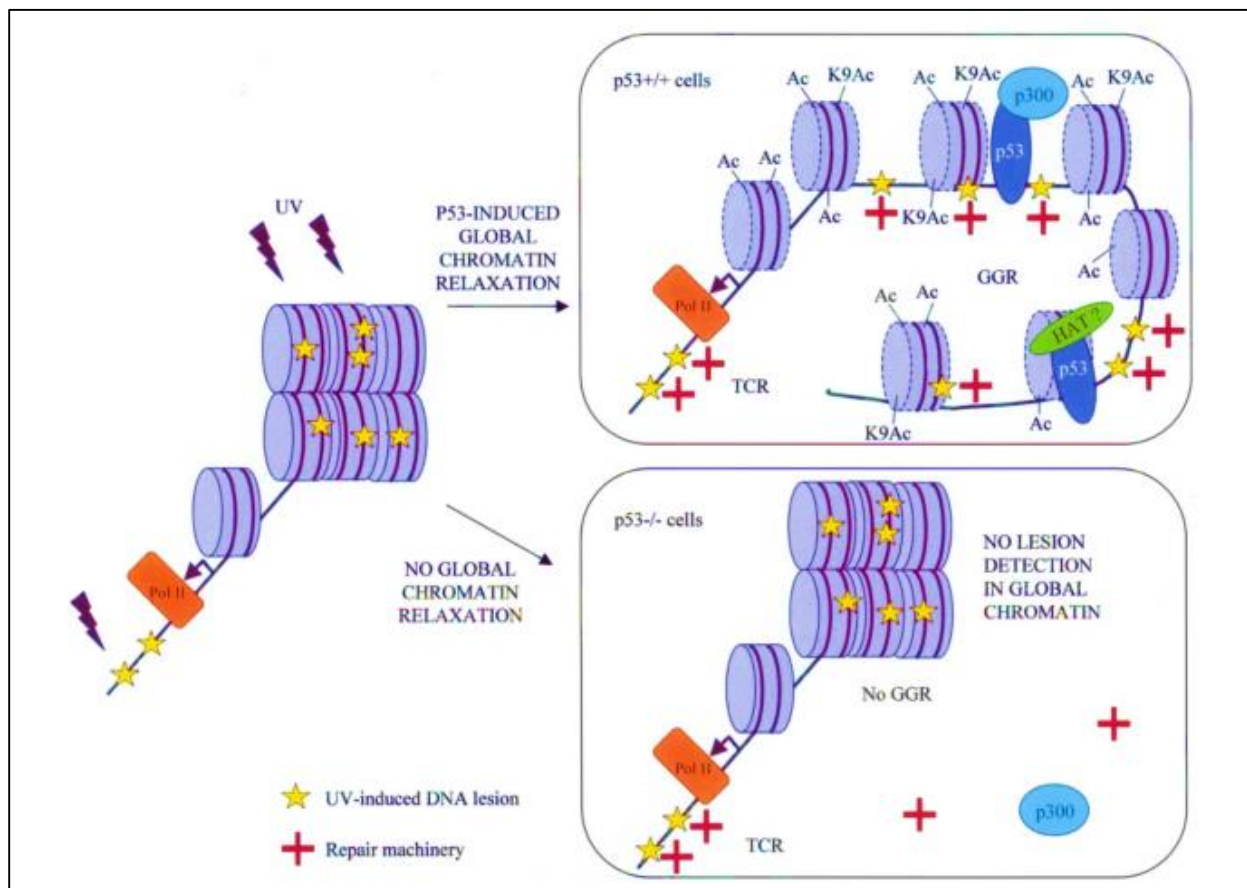
El mantenimiento de la integridad genómica es indispensable para el correcto funcionamiento de la célula. Para asegurarse de que la información genética es fielmente transmitida, el proceso de la división celular se realiza bajo el control de vías dedicadas a la preservación de dicha información. Las funciones de estas vías incluyen la reparación de lesiones en el ADN, la detención del ciclo celular y transcripción de genes, e incluso la activación del mecanismo apoptótico cuando el daño es irremediable (Figura 5) (Zhou & Elledge, 2000). Los denominados “checkpoints” del ciclo celular son responsables de los mecanismos de vigilancia, el mantenimiento de la estabilidad genómica y la viabilidad celular después de producido un daño genotóxico (Lazzaro et al., 2009). La pérdida de la función de los checkpoints conduce a la inestabilidad cromosómica y promueve la carcinogénesis (Kerzendorfer y O'Driscoll, 2009). Los mamíferos, en respuesta al daño del ADN, poseen una proteína denominada ATM, la cual es responsable de la detención del ciclo celular en G1 y G2, y también en detener la síntesis de ADN en curso. ATM controla la detención en la fase G1 del ciclo celular por la activación de p53, que induce la transcripción del inhibidor de p21, Cdk CIP1/WAF1, dando como resultado la detención en G1. Para la detención de una célula dañada durante la fase G2 del ciclo celular se produce el mantenimiento de Cdc2 en un estado de tirosina fosforilada, una capacidad que es importante para prevenir la entrada en mitosis cuando el ADN está dañado (Matsuoka, Huang, & Elledge, 1998).



**Figura 5.-** Vías de respuesta al daño (Con permiso de Di Tomasso, MV).

En respuesta al daño en el ADN, la acumulación y activación de p53 puede llevar a la apoptosis o a la detención del ciclo celular, probablemente para proveer el tiempo necesario para reparar el daño antes que la célula se divida o inicie una nueva ronda de replicación (Hanawalt, 2002). p53 media el siguiente camino para acceder a la lesión global: detección de la lesión asociada a la transcripción (bloqueo de la elongación de la transcripción) → relajación global de la cromatina → detección global de la lesión (Rubbi y Milner, 2003).

Para un sistema de reparación por escisión de nucleótidos eficiente es necesario p53, en su contexto natural de cromatina. El efecto de p53 en la eficiencia de la GGR es mucho mayor para los dímeros de pirimidina que para los 6-4PP. Los CPD generalmente están localizados dentro de los nucleosomas y por lo tanto son mucho más dependientes de la relajación de la cromatina para su reparación que los 6-4PP, los que sólo se encuentran en el ADN espaciador (Figura 6) (Friedberg et al., 1995; Allison y Milner, 2004; Ford, 2005; Rastogi et al., 2010).



**Figura 6.-** Relajación global de la cromatina inducida por p53 en respuesta a la irradiación UV (Tomado de: Allison y Milner, 2004).



La relación entre la conformación de la cromatina y la acetilación de histonas es compleja (Korolev, 2011), como lo demuestran estos tres efectos: 1) la acetilación debe modular las interacciones entre las colas de las histonas y el ADN. 2) las colas de las histonas pueden afectar la asociación internucleosomal y 3) la acetilación de la cola de las histonas puede servir como marcador para la unión de otras proteínas y luego inducir una conformación más abierta y transcripcionalmente activa (Tóth et al., 2004). Las histonas se hiperacetilan en respuesta a la irradiación con UVC y la reparación es más eficiente en los nucleosomas hiperacetilados (Dinant et al., 2008). El aumento del nivel global de la acetilación por la inhibición de las HDAC tiene, como consecuencia, el aumento de al menos dos veces la tasa de reparación en los nucleosomas hiperacetilados (Ura y Hayes, 2002). Por lo que cabe pensar que los cambios conformacionales de la cromatina a causa de la acetilación hacen al ADN más accesible a la maquinaria de reparación. Dos HAT, Gcn5 y p300, son las responsables de la acetilación de múltiples residuos de lisina dentro de los “cores” de las histonas y están implicadas en la respuesta al daño del ADN. Varias proteínas están relacionadas en el reclutamiento de p300 a los sitios dañados por UVC, incluyendo DDB1, PCNA, CSA, CSB y p53 (Dinant et al., 2008).

Por otro lado, la irradiación con UVC no sólo causa un aumento de la ubiquitinación de H2A, sino que también induce una ubiquitinación temporal (de 2 a 4 horas) de las histonas H3 y H4 que desestabiliza el nucleosoma (Wang et al., 2006b). Estas últimas ubiquitinaciones ocurren temprano en la respuesta al daño contrariamente a la ubiquitinación de H2A. Todas estas ubiquitinaciones en conjunto crean un estado cromatínico propicio que facilita el ensamblaje del complejo proteico de reparación del NER en el sitio de ADN dañado (Dinant et al., 2008). Además de las modificaciones en

las colas de las histonas, la cromatina puede ser afectada por remodeladores dependientes de ATP.

En la TC-NER se puede ver una relación directa entre la remodelación de la cromatina y la reparación del ADN. La proteína de CSB que actúa en la TC-NER tiene homología con la familia SWI2/SNF2, una familia de remodeladores de la cromatina ATP dependientes. CSB altera la conformación del ADN y es capaz de inducir cambios en la estructura de la cromatina de una forma dependiente de ATP. Esta proteína interactúa directamente con los núcleos de las histonas y exhibe actividad remodeladora de la cromatina. La energía para la remodelación de la cromatina la obtiene de la hidrólisis del ATP. Una característica de las células que poseen alterada la proteína CSB, es su predisposición a entrar en apoptosis en respuesta al tratamiento con UVC. El gen CSB mutado es responsable directo de la propensión a la apoptosis inducida por UVC en las células de un individuo portador del Síndrome de Cockayne (Selby y Sancar, 1997; Citterio et al., 2000).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La proteína CSB pertenece a la familia de ATPasas SNF2 que se encuentran en el núcleo de un complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP de tipo SWI/SNF. La familia contiene miembros que participan en la regulación de la transcripción, la estabilidad cromosómica, la reparación y la recombinación del ADN. Una característica común de las proteínas SNF2 es la desestabilización de las interacciones proteína-ADN (Christiansen et al., 2003).

Particularmente interesante es el trabajo realizado por Newman et al. (2006), donde demostraron que el patrón de transcripción de las células CSB-deficientes tiene una coincidencia significativa con el patrón de transcripción de las células tratadas con el inhibidor de desacetilasas de histona (iHDAC) tricostatina A (TSA), indicando una posible correlación entre la falla de un mecanismo de remodelación de cromatina dependiente de ATP y el proceso de acetilación de histonas.

Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la falla en la reparación acoplada a la transcripción (TC-NER) no parece ser la principal responsable de la hipersensibilidad a UVC. Esto evidenciado a través del incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas en las células símil Síndrome de Cockayne (células UV61) expuestas a UVC, puesto que los puntos de ruptura en los cromosomas se distribuyeron más aleatoriamente en las células símil Síndrome de Cockayne que en las células proficientes en TC-NER, como era de esperarse dada la afectación del sistema de reparación acoplada a la transcripción en células UV61 (Martinez-Lopez, Marotta, Di Tomaso, Mendez-Acuna, & Palitti, 2010). En este mismo sentido, otros estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que las células UV61

decondensan menos la cromatina luego de la irradiación UVC, evidenciado mediante la técnica “*in situ* nick translation” aplicada sobre núcleos de células AA8 y UV61 expuestas a UVC y fijadas sobre un cubreobjeto luego de 2 hs post-irradiación. En este mismo sentido, a través de la estimación del denominado “índice de relajación” calculado como  $IR = FITC \times AREA / DAPI$ , el grado de decondensación de la cromatina obtenido luego de 2 hs post-irradiación se puso observar una menor relajación de la cromatina en las células deficientes en CSB.

Estos datos muestran que las líneas celulares derivadas de fibroblastos de hámster chino AA8 y UV61 (línea deficiente en la proteína CSB, proteína remodeladora de cromatina dependiente de ATP tipo SNF2) son capaces de producir una relajación de la cromatina al ser expuestas a UVC, aunque en menor proporción ocurre en UV61 que en AA8, probablemente debido al defecto en la proteína CSB (Citterio et al., 2000). Por otro lado, ha sido demostrado que el proceso de relajación de la cromatina se encuentra acompañado de hiperacetilación global a nivel de las histonas H3 y H4 (Yu et al., 2005).

En tal sentido, nos hemos planteado determinar si cambios en el nivel de acetilación global de histonas en células deficientes en la proteína CSB están asociados con la hipersensibilidad de estas células a UVC, y de qué modo alteraciones en la remodelación de la cromatina afectan el procesamiento del daño inducido por la irradiación UVC. A su vez, nos planteamos como hipótesis que alteraciones en los niveles de acetilación provocan cambios en la remodelación nucleosómica originando la hipersensibilidad a UVC que poseen las células deficientes en CSB, símil Síndrome de Cockayne, porque impiden el adecuado acceso de las proteínas del sistema TC-NER a las lesiones producidas por UVC sobre el ADN.

### **3. HIPÓTESIS**

Alteraciones en los niveles de acetilación provocan cambios en la remodelación nucleosómica originando la hipersensibilidad a UVC que poseen las células deficientes en CSB símil Síndrome de Cockayne, porque impiden el adecuado acceso de las proteínas del sistema de reparación acoplada a la transcripción a las lesiones producidas por UVC sobre el ADN.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar si cambios en el nivel de acetilación global de histonas en células deficientes en la proteína CSB están asociados con la hipersensibilidad de estas células a UVC, y de qué modo alteraciones en la remodelación de la cromatina afectan el daño inducido.

### **4.2 Objetivos específicos**

4.2.1 Analizar los niveles globales de acetilación de histonas inducidos por UVC en células proficientes y deficientes en CSB.

4.2.1.1 Estrategia metodológica. Establecimiento de los cambios en la acetilación de las 4 lisinas ubicadas en el extremo amino terminal de la histona H4: H4K16Ac, H4K12Ac, H4K8Ac y H4K5Ac de células de hámster Chino proficientes (AA8) y deficientes (UV61) en la proteína CSB (células símil Síndrome de Cockayne) expuestas a UVC, mediante “western blots” empleando anticuerpos específicos anti-histona H4 acetilada en los en 4 sitios antes mencionados.

4.2.2 Determinar como afectan los cambios en los niveles de acetilación de histonas producidos por un inhibidor de desacetilasas de histonas (Tricostatina A o TSA) al daño inducido por UVC en células proficientes y deficientes en CSB.

4.2.2.1 Estrategia metodológica. Evaluación la sobrevida de células proficientes y deficientes en CSB expuestas a UVC en presencia o ausencia de un inhibidor de desacetilasas de histonas como la Tricostatina A.

4.2.2.2 Estrategia metodológica. Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas inducidas por UVC en presencia de Tricostatina A en células proficientes y deficientes en CSB, mediante la técnica de triple tinción.

4.2.3 Evaluar la remodelación nucleosómica inducida por UVC en presencia o ausencia de un inhibidor de desacetilasas de histonas (Tricostatina A) en células proficientes y deficientes en CSB.

4.2.3.1 Estrategia metodológica. Cuantificación de CPD inducidos por UVC en presencia de Tricostatina A en células proficientes y deficientes en CSB mediante inmunoblot empleando anticuerpos anti-CPD.

4.2.3.2 Estrategia metodológica. Análisis de la distribución de los nucleosomas en células proficientes y deficientes en CSB expuestas a UVC en presencia o ausencia de Tricostatina A, mediante ensayos de digestión con nucleasa micrococcal (MNasa).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Líneas celulares (AA8 - UV61) y condiciones de cultivo

Se emplearon líneas celulares derivadas de células de hámster chino (CHO) denominadas AA8 y UV61 (Thompson et al., 1989). AA8 es una línea celular derivada de fibroblastos de ovario de hámster chino (CHO-K1) proficiente en la reparación de ADN. UV61 es una línea celular derivada de AA8, que posee una mutación en el gen que codifica a la proteína CSB ("Cockayne's Syndrome B"), por lo que constituye una línea celular homóloga a las células de pacientes portadores de Síndrome de Cockayne B. Las células AA8 y UV61 fueron cultivadas en medio de cultivo Ham's F12 y Medio Esencial Dulbecco (DMEM) en una proporción 1:1 (enriquecido con 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina), suplementado con suero fetal al 10%. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C en ambiente húmedo con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2. Irradiación UVC y tratamiento con TSA

Para el tratamiento con UVC, se retiró el medio de cultivo de células AA8 o UV61 en fase de crecimiento exponencial (la concentración celular fue definida al inicio de cada tratamiento dependiendo del tipo de ensayo) y se realizaron dos lavados con solución salina PBS 1X. Las dosis de irradiación UVC (UVC Lamp Spectrum Line 254 nm) empleadas fueron (dependiendo del ensayo realizado) 1,2 J/m<sup>2</sup>, 2 J/m<sup>2</sup>, 4 J/m<sup>2</sup>, 8 J/m<sup>2</sup> o 20 J/m<sup>2</sup>. Las dosis fueron monitoreadas en cada momento con un sensor de UVC (Spectrum Line).

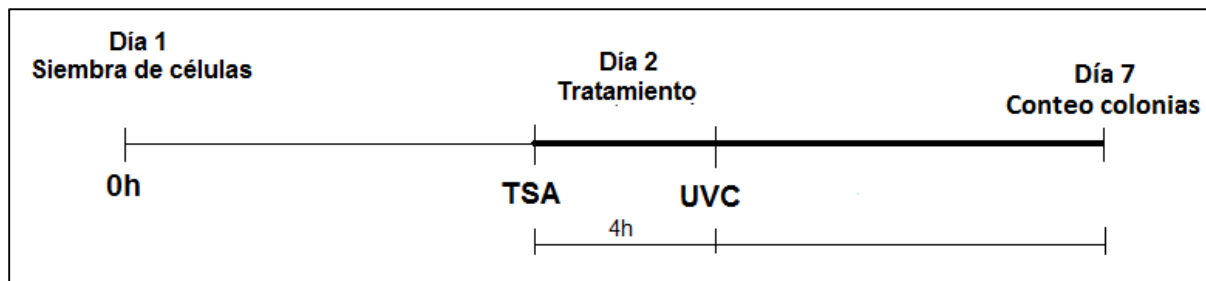
En cuanto al tratamiento con TSA se realizaron tratamientos continuos en todos los ensayos excepto para el recuento de la frecuencia de células apoptóticas donde se



ensayaron dos protocolos para la adición de TSA (5 ng/ml, 10 ng/ml o 50 ng/ml): (a) durante las 4 hs previas al tratamiento con UVC solamente, o (b) durante las 4 hs previas y 20 hs luego de la irradiación hasta la recolección del cultivo. Los tiempos de recolección de las células, para el posterior análisis del efecto de cada uno de los tratamientos dependieron de los ensayos que se describen a continuación.

### 5.3. Ensayo de sobrevida o ensayo clonogénico

Durante el primer día, 300 células de cada línea celular (AA8 o UV61) fueron sembradas en placas de Petri de 35 mm de diámetro por triplicado para cada punto experimental en dos experimentos independientes. Al segundo día, las células fueron tratadas con 5 ng/ml, 10 ng/mL o 50 ng/mL de TSA durante las 4 hs previas a la irradiación UVC. Al día siguiente, las células fueron irradiadas con 1,2 J/m<sup>2</sup>, 4 J/m<sup>2</sup> y 20 J/m<sup>2</sup> y tras la irradiación, nueva TSA fue agregada a los cultivos celulares correspondientes. Después del séptimo día, cuando las colonias fueron fácilmente reconocidas (al menos 50 células por colonia), el medio de cultivo fue removido y las células fueron fijadas con etanol al 70% durante 10 min, teñidos con una solución acuosa de Giemsa al 5% por 15 min, lavadas con agua destilada y contadas las colonias con ayuda de una lupa.

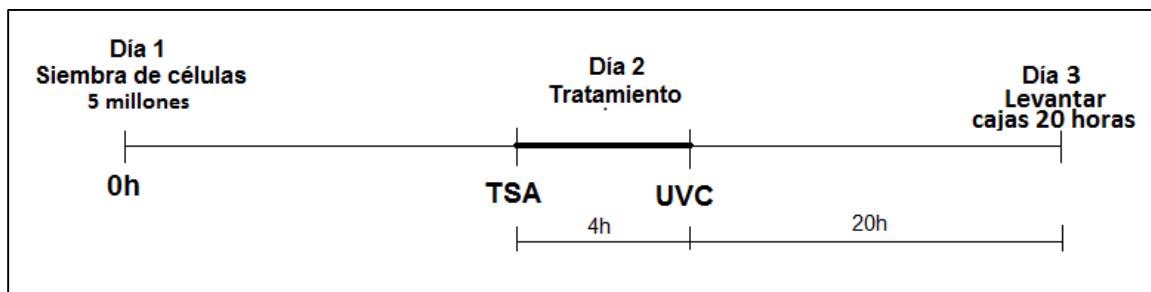
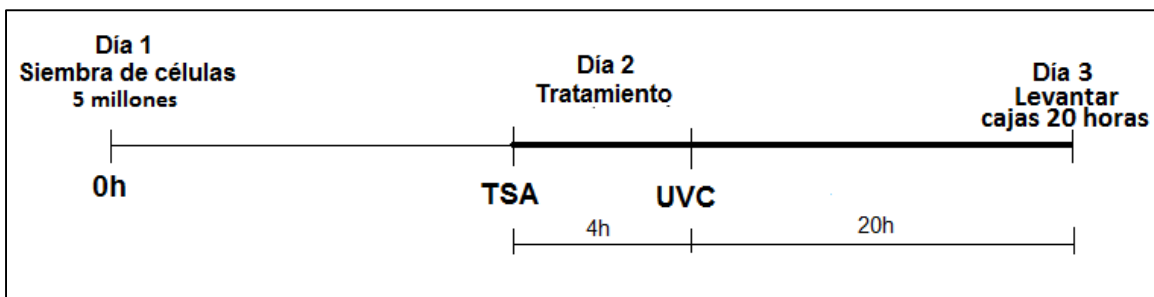


# caja	Tratamiento con TSA	Irradiación UVC
1	Sin TSA	Control
2		UVC 1,2J
3		UVC 4J
4		UVC 20J
5	TSA 5ng/mL	-
6		UVC 1,2J
7		UVC 4J
8		UVC 20J

# caja	Tratamiento con TSA	Irradiación UVC
9	TSA 10 ng/mL	-
10		UVC 1,2J
11		UVC 4J
12		UVC 20J
13	TSA 50ng/mL	-
14		UVC 1,2J
15		UVC 4J
16		UVC 20J

#### 5.4. Ensayo de triple coloración fluorescente para detección de células apoptóticas

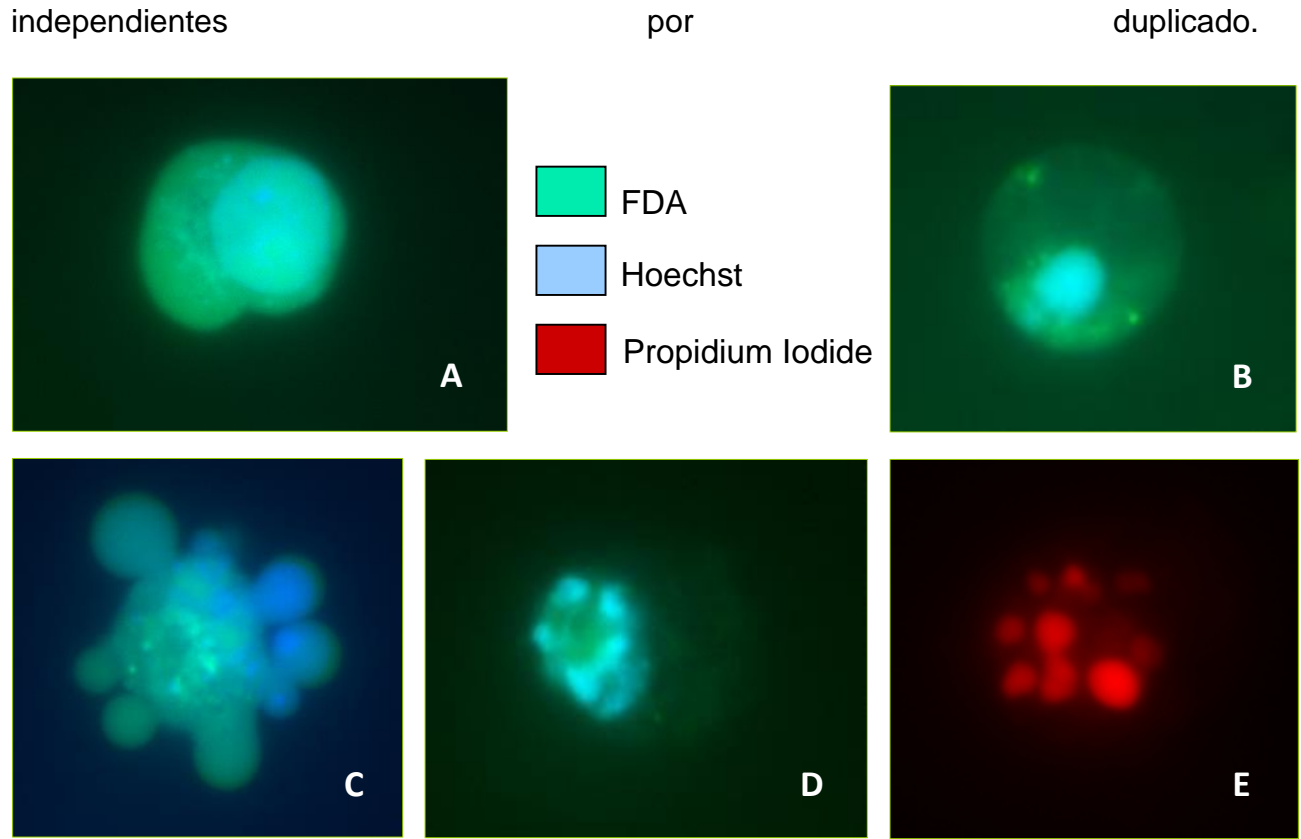
Células AA8 o UV61 en crecimiento exponencial (80% de confluencia) fueron sembradas en placas de Petri de 35 mm de diámetro por duplicado para cada punto experimental. Las células fueron pre-tratadas con TSA (5 ng/mL, 10 ng/mL o 50 ng/mL) 4 hs previo a la irradiación con 1,2 J/m<sup>2</sup> o 4 J/m<sup>2</sup> de UVC.



# caja	Tratamiento con TSA	Irradiación UVC
1	Sin TSA	Control
2		Control
3		UVC 2J
4		UVC 2J
5		UVC 4J
6		UVC 4J

# caja	Tratamiento con TSA	Irradiación UVC
7	TSA 50 ng/mL 4 h previas a irradiación	-
8		-
9		UVC 2J
10		UVC 2J
11		UVC 4J
12		UVC 4J
13	TSA 50 ng/mL 4 h previas a irradiación- Se mantiene TSA em el cultivo tras irradiar	-
14		-
15		UVC 2J
16		UVC 2J
17		UVC 4J
18		UVC 4J

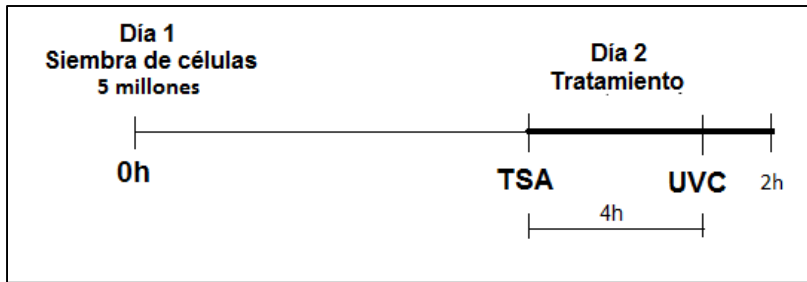
Las células apoptóticas fueron detectadas mediante microscopía de fluorescencia empleando una combinación de 3 fluorocromos (Figura 7): di-acetato fuoresceina (FDA, 5mg/mL, Sigma), ioduro de propidio (PI, 0,5mg/mL, Sigma) y Hoechst 33342 (HO, 1mg/mL, Sigma). En breve, la técnica consistió en la tripsinización de las células 20 hs después de la irradiación UVC, cuando fueron lavadas con una solución salina PBS y resuspendidas en una mezcla de los tres colorantes fluorescentes (FDA, HO y PI) en solución. Luego las células fueron mantenidas a 37°C durante 5 min y sembradas sobre un portaobjeto. Ya que el FDA y el HO son colorantes vitales que tiñen el citoplasma y el núcleo de células viables, respectivamente, fue posible detectar células normales y células en fase temprana de apoptosis mediante la observación del patrón característico de fragmentación de cromatina en el núcleo (tinción con HO) de células que contenían la coloración con FDA en su citoplasma. El ensayo fue realizado en dos experimentos



**Figura 7.-** Ejemplos típicos de morfología apoptótica obtenida mediante la combinación de tres colorantes fluorescentes: diacetato de fluoresceína (FDA), ioduro de propidio (PI) y Hoechst 33342 (HO). En el panel A se puede observar la morfología de las células viables con el citoplasma teñido con FDA y el núcleo con HO. Las células apoptóticas aún con membrana plasmática íntegra (paneles B, C y D) o sin ella (panel E) muestran la cromatina condensada típica del proceso apoptótico (Proietti De Santis et al., 2002).

### 5.5. Ensayo “inmunoslotblot” para detectar inducción de CPD por UVC

Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado empleando placas de Petri al 80% de confluencia de células AA8 o UV61, las cuales fueron tratadas con TSA (10 ng/mL or 50 ng/mL) 4 hs previas a la irradiación UVC (4 J/m<sup>2</sup> o 8 J/m<sup>2</sup>) y recuperadas a las 2 hs post-UVC.



La extracción de ADN consistió en la incubación de las células durante 1 min con 1 mL de una solución de Tritón X-100 al 0,5%, 0,1 M de NaCl y 0,1 M EDTA. Se incubaron luego durante 30 min a 37°C en 2 mL de 0,5% de SDS, 50 µg/mL de proteinasa K (20 mg/mL de solución stock), 0,1 M de NaCl y 0,01 M de EDTA. Posteriormente, se adicionó una solución 5 M de NaCl (Concentración final 1 M) mediante agitación lenta de las cajas de Petri (15 min a 37°C). Luego se recuperaron las células mediante el raspado de la capa celular y se colocaron en tubos de 15 mL. Se adicionó 2,5 mL de cloroformo y se mezcló cuidadosamente invirtiendo los tubos durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 6.000 rpm durante 20 min a 4°C. Luego se removió la fase líquida con una micropipeta de 1 mL y se transfirió a nuevos tubos de 15 mL. Se adicionaron 5 mL de alcohol absoluto previamente enfriado. Se agitó lentamente invirtiendo el tubo durante 10 min de modo de evitar la fragmentación del ADN. Se dejaron los tubos a -20°C por una noche de modo de obtener una adecuada precipitación del ADN. Se centrifugó durante 1 h a 7.000 rpm a 4°C.

Luego se descartó el sobrenadante mediante una cuidadosa aspiración y se permitió que los pellets se secan en una incubadora a 37°C por 2 hs y luego toda una noche a temperatura ambiente. El ADN se disolvió luego en buffer TE + ARNasa (625 µl de Tris-EDTA/en agua deionizada [buffer TE 10X = 100 mM Tris + 10 mM EDTA] + 0,5 µl de ARNasa (4 mg/mL). Se dejaron los tubos durante 30 min a 37°C. La concentración de

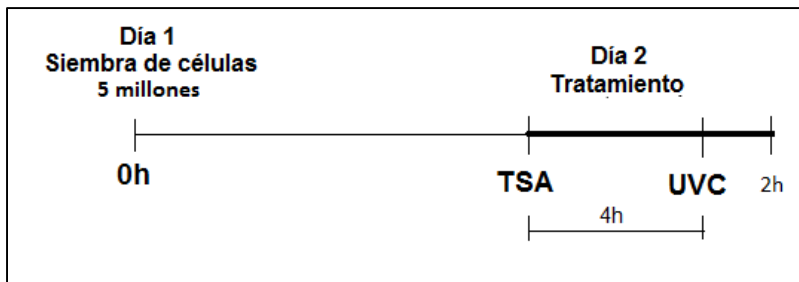
ADN de cada punto experimental se midió utilizando un equipo “nanodrop”. El ADN se mantuvo a 4 °C hasta ser empleado para los ensayos de “inmunoslotblot”.

Cada slot contuvo 200 µl de ADN en buffer TE. En cada slot se colocó 1 µg de ADN total. Por tanto, se cargaron diferentes concentraciones de ADN de cada punto experimental (controles y tratamientos) para determinar la concentración adecuada de ADN para obtener una óptima marca de CPD mediante inmunomarcación (100 ng, 200 ng y 400 ng, respectivamente), y luego se adicionó a cada tubo eppendorf con la cantidad respectiva de ADN de espermatozoos de salmón hasta completar 1 µg de ADN. El ADN colocado en los tubos eppendorf se tapó adecuadamente para colocarlos en un baño a 100°C durante 10 min para desnaturalizar el ADN e inmediatamente se colocaron en hielo. Durante la desnaturalización se preparó el equipo slotblot (Minifold II). Se cargaron 200 µl de las muestras de cada punto experimental en los slots. Inmediatamente se aspiró la solución de ADN mediante bomba de vacío. Se adicionó luego 200 µl de una solución de 1 M de acetato de amonio y se aspiró nuevamente. Luego se transfirió la membrana de nitrocelulosa a 20 mL de una solución de 5 x SSC durante 15 min a 37°C en agitador. Luego se colocó la membrana en una incubadora a 80°C durante 120 min. Posteriormente se incubó la membrana con 20 mL de una solución al 5% de leche descremada en polvo (NFDM- “non fat dry milk”) en PBS 1X en una caja de plástico durante toda la noche a 4°C empleando un agitador. Los anticuerpos anti-CPD hechos en ratón se diluyeron 1:2000 en una solución de PBS 1X + 5% de NFDM. Se incubó la membrana con el anticuerpo anti-CPD durante 2 hs a 4°C. Se lavó la membrana 3 veces durante 5 min cada uno con PBS 1X + 0,1 % de TWEEN 20. El anticuerpo secundario (anti-ratón) conjugado con HRP (“horseradish peroxidase”, peroxidasa de rábano)

también se preparó con una dilución 1:2000 en una solución de PBS 1X + 5% NFDM. Se incubó la membrana durante 2 hs a temperatura ambiente. Se lavó la membrana 3 veces con PBS 1X + 0,1% de TWEEN 20. El revelado de la marca HRP se realizó empleando el kit ECL plus de Amersham y el revelado de la placa fotográfica se llevó a cabo en cuarto oscuro de la forma habitual.

### 5.6. Ensayo de digestión con nucleasa micrococcal (MNasa)

Las células AA8 o UV61 creciendo exponencialmente a un 80% de confluencia ( $4 \times 10^6$ ) en cajas de Petri de 60 mm de diámetros fueron irradiadas con  $1,2 \text{ J/m}^2$  o  $4 \text{ J/m}^2$  de UVC y pre-tradas con TSA 4 hs previas.



# caja	Tratamiento con TSA	Irradiación UVC
1	Sin TSA	Control
2		UVC 1,2J
3		UVC 4J
4	TSA 10ng/mL	-
5		UVC 1,2J
6		UVC 4J
7	TSA 50ng/mL	-
8		UVC 1,2J
9		UVC 4J

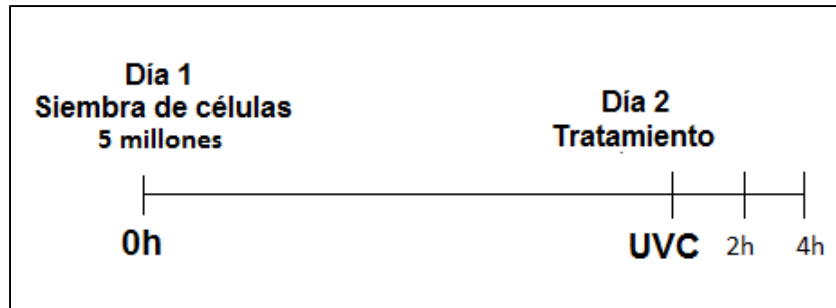
Las células se recuperaron en presencia de TSA durante 2 hs y luego fueron tripsinizadas y resuspendidas en un buffer de lisis (10mM Tris-HCl [pH 8.0], 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT) con 0,2% de NP-40. Los nucleoides obtenidos fueron luego centrifugados durante 10 min a 2.000 rpm y lavados 4 veces con buffer de lisis. Posteriormente los pellets de nucleoides fueron transferidos a tubos eppendorf. Para la digestión, los nucleoides fueron resuspendidos en el buffer de digestión de la nucleasa micrococcal o MNasa (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>). Todas las muestras fueron digeridas con 0,6 Unidades de MNasa durante 10 min a 37°C. La reacción fue detenida con una solución que contenía 1% SDS y 20 mM de EDTA. Luego fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 min. Posteriormente, el ADN fue extraído dos veces con fenol/cloroformo, precipitados en etanol puro frío y dejados toda una noche en una solución de 0,3 M de acetato de sodio y centrifugadas nuevamente a 13.000 rpm durante 15 min. El pellet fue luego lavado con etanol al 70% y centrifugado a 13.000 rpm durante 15 min.

Finalmente, el pellet fue disuelto en buffer TE (Tris-EDTA). El ADN obtenido fue cuantificado y cantidades iguales de ADN para cada muestra fueron corridas en un gel de agarosa al 1,5% mediante electroforesis horizontal que luego fue teñido con bromuro de etidio y observado bajo un transiluminador de luz UV. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado con ambas líneas celulares que fueron pre-tratadas con 10 ng/mL o 50 ng/mL de TSA 4 hs previas a la irradiación de 1,2 J/m<sup>2</sup> o 4 J/m<sup>2</sup> de UVC y recuperadas a las 2 hs post-irradiación UVC. Se realizaron 5 experimentos independientes por duplicado.



## 5.7. Lisado de células para extracción de proteínas totales

Se realizaron cinco experimentos independientes por duplicado con células AA8 o UV61 que fueron irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup> de UVC y recuperadas a 0 hs, 2 hs y 4 hs post-irradiación.



# caja	Tratamiento	Tiempo de recuperación Post UVC
1	Control	
2		
3	UVC (4 J/m <sup>2</sup> )	0 h
4		0 h
5		2 h
6		2 h
7		4 h
8		4 h

Después de completados los tratamientos y los diferentes tiempos de recuperación post-UVC las células fueron retiradas de la placa de cultivo de Petri de 100 mm de diámetro a un 80% de confluencia mediante raspado de la capa celular en presencia 500 µl de buffer Laemmli (1M Tris-HCl [pH=7.4], 2M NaCl, 1mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% NP-40 100%) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas en frío y colocadas en tubos eppendorf. Luego las proteínas fueron desnaturalizadas durante 10 minutos en un baño

a 95 °C. Las muestras de proteínas obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante SDS-page y western blot empleando anticuerpos anti-histona H4 acetilada y anti-histona total.

#### **5.8. SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos anti-histona H4 acetilada y anti-histona total**

Se cuantificaron las muestras obtenidas del lisado de células para extracción de proteínas totales mediante ensayo Bradford. Las muestras de proteínas (60 µg) fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 15% y corridas mediante electroforesis vertical a 110 V y amperaje libre durante 90 min. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de PVDF de 0,2µm de poro, bloqueadas luego con 5% de leche descremada + TBS-T (PBS + 0,1% de TWEEN 20), para posteriormente ser incubadas durante toda la noche a 4 °C en agitación constante con el correspondiente anticuerpo primario hecho en conejo para la lisina acetilada de la histona H4 (H4K16ac, H4K12ac, H4K8ac y H4K5ac; UPSTATE-Millipore) diluido en TBS-T.

Luego se realizó la incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL plus de Amersham y placas fotográficas KODAK en cuarto oscuro. Para el análisis de las placas, las mismas fueron escaneadas, y la densidad de las bandas fueron cuantificadas empleando el programa Image J (NIH). Posteriormente, se le realizó la remoción de los anticuerpos primario y secundario incubando las membranas en una solución de 0.2 M Glycine (pH=2.8) durante 60 min con el fin de volver a exponer las proteínas de membrana a un anticuerpo beta-tubulina (SIGMA) que fue empleado como control de carga. Luego se realizó la incubación con un anticuerpo secundario

conjugado con HRP y el revelado fue realizado del mismo modo que para lo realizado con los anticuerpos anti-histona H4 acetilada.

### **5.9. Análisis de imágenes realizadas con el programa “Image J” (NIH)**

Las placas fotográficas obtenidas con los “western blots” y “slot blots” fueron escaneadas en escala de grises con un DPI mayor o igual a 300. Luego se realizó un análisis cuantitativo mediante densitometría de las bandas obtenidas empleando el software Image J (NIH). Para los distintos tratamientos se determinó la intensidad relativa de las bandas estableciendo la relación de su intensidad respecto a la banda del grupo control.

### **5.10. Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos se sometieron a pruebas de estadística descriptiva como la distribución normal de los datos (Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de varianzas (Levene) e independencia de datos, donde se tuvo en cuenta medidas de tendencia central (media) y de variabilidad (desviación estándar de la media). Estas pruebas son necesarias para determinar el tipo de pruebas estadísticas a emplear.

Las figuras presentadas fueron realizadas empleando el software Microsoft® Excel® 2016. Todos los datos obtenidos se analizaron empleando las funciones estadísticas del paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics Versión 23 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences), con un nivel máximo de significancia de  $\alpha \leq 0,05$ .

La comparación de los efectos de las distintas variables fue analizada por ANOVA univariado, con ajuste de comparaciones múltiples de Bonferroni que permite controlar la tasa de error multiplicando el nivel crítico concreto de cada comparación por el número

de comparaciones que se están llevando a cabo entre las medias correspondientes a un mismo efecto de mínima diferencia significativa.

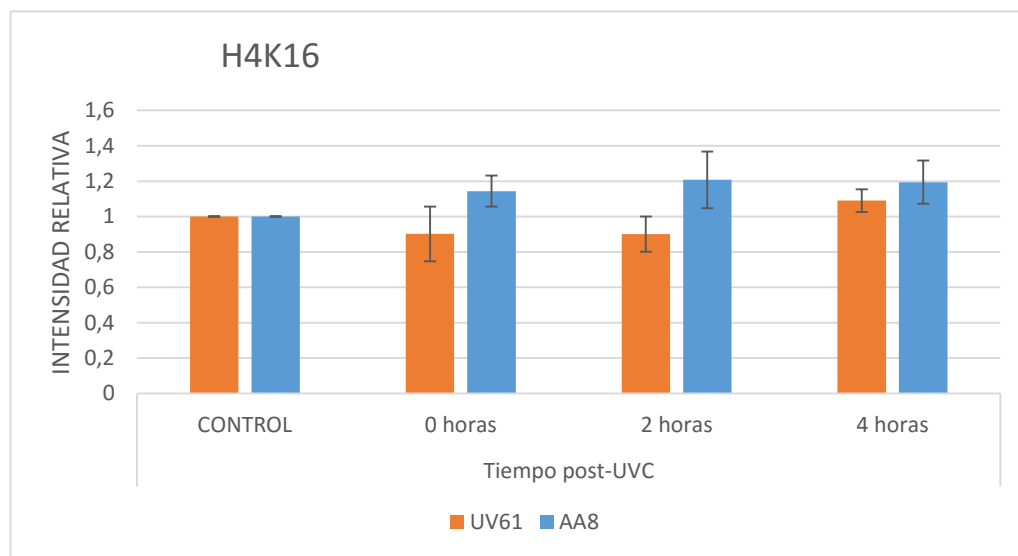
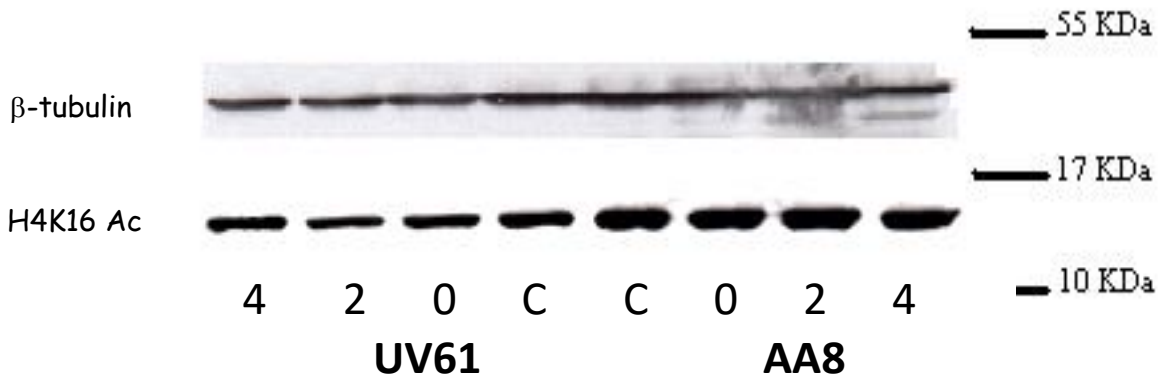
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis del nivel global de acetilación de la histona H4 en células proficientes y deficientes en TC-NER expuestas a UVC

Con el fin de determinar si en la base del proceso de remodelación de cromatina observado en células AA8 y UV61 expuestas a UVC se encuentra un incremento en los niveles de acetilación de las histonas, se irradiaron ambas líneas celulares con 4 J/m<sup>2</sup> de UVC y las células se recolectaron a las 0 hs, 2 hs y 4 hs post-irradiación.

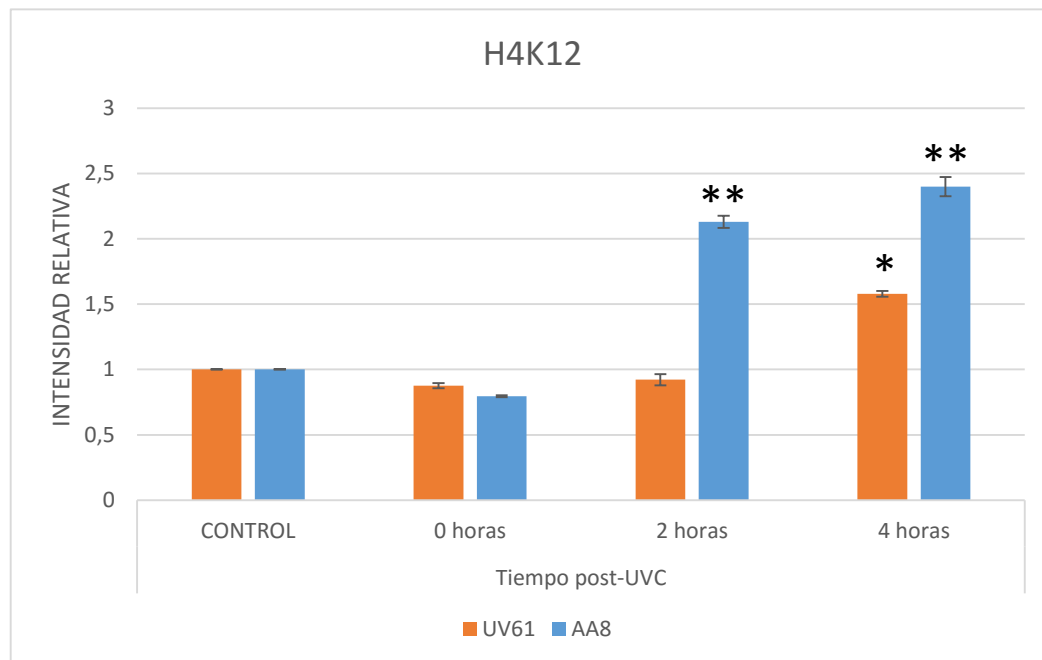
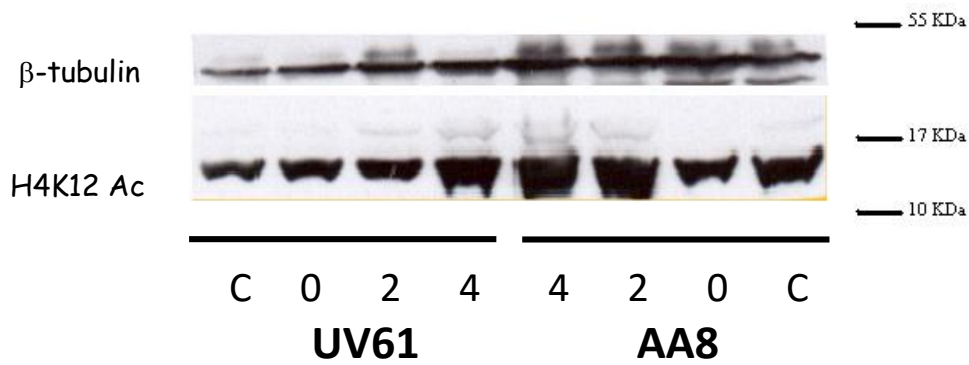
Muestras de proteínas totales extraídas con buffer Laemmli se sometieron a un SDS-PAGE y se realizaron western blots utilizando anticuerpos específicos para los cuatro sitios de acetilación de los extremos amino-terminales de la histona H4.

Debido a que las marcas di-, tri-, y tetra-acetilación de la histona H4 son consideradas como una evidencia de hiperacetilación, se analizaron los niveles de acetilación de las lisinas 12 (H4K12ac), 8 (H4K8ac) y 5 (H4K5ac), respectivamente, así como el nivel de mono-acetilación en la lisina 16 (H4K16ac). Dicha mono-acetilación se mostró invariable luego de la exposición a UVC en UV61 y un incremento significativo en AA8 a las 2 hs (Figura 8).



**Figura 8.-** Western blot mostrando el patrón de acetilación de la lisina K16 de la histona H4 (histona H4 mono-acetilada) luego de 0 hs, 2 hs o 4 hs post-irradiación UVC (4 J/m<sup>2</sup>). Nótese que no hay diferencias significativas en el nivel de mono-acetilación de la histona H4 en los diferentes tiempos de recuperación post-UVC para cada línea celular. El desvío estándar está indicado en la parte superior de las barras.

La di-acetilación de H4K12 se incrementó luego de las 2 hs post-irradiación UVC en AA8, pero sólo a las 4 hs en UV61 (Figura 9).

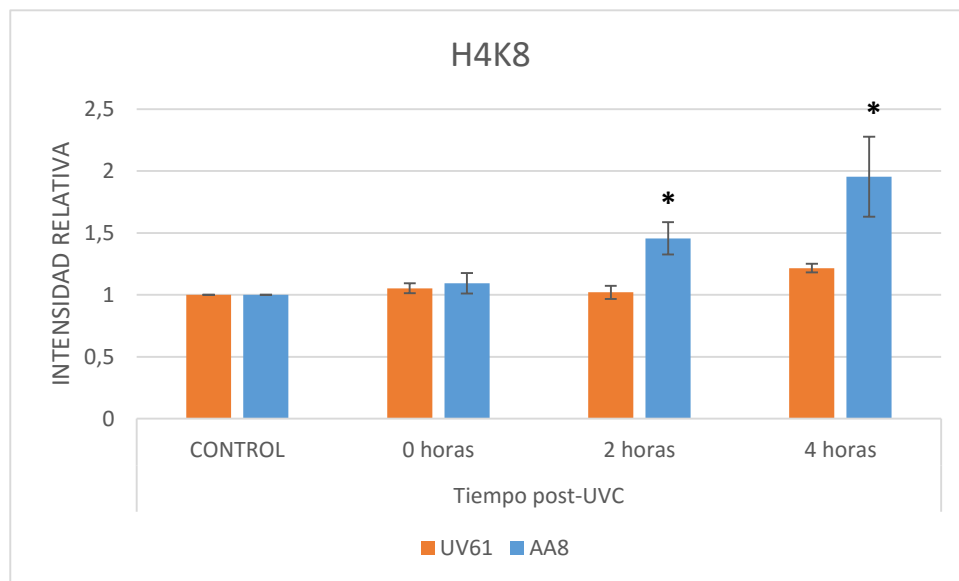
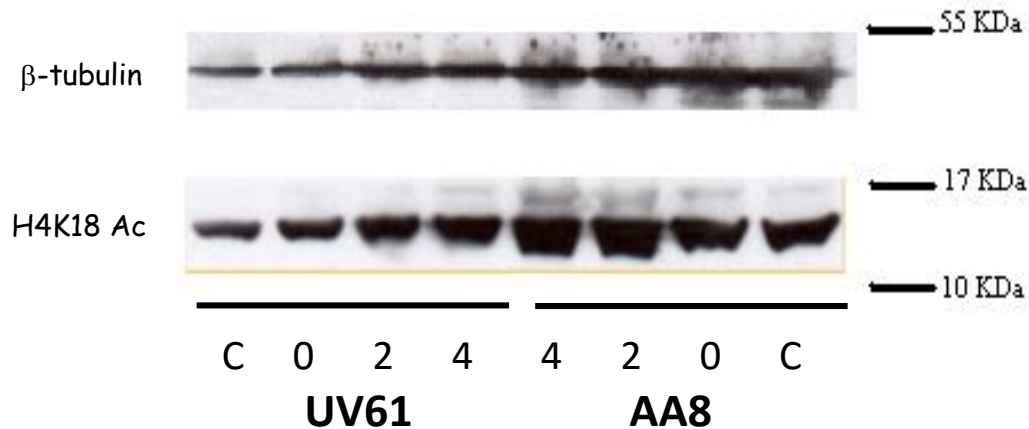


**Figura 9.-** Western blot mostrando el patrón de acetilación de la lisina K12 de la histona H4 (histona H4 di-acetilada) luego de 0 hs, 2 hs o 4 hs post-irradiación UVC ( $4 \text{ J/m}^2$ ). Nótese que existe un incremento significativo del nivel de di-acetilación de la histona H4 a 2 hs y 4 hs post-UVC para AA8, pero sólo a 4 hs para UV61. El desvío estandar está indicado en la parte superior de las barras.

\*Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Prueba de comparaciones múltiples post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD)  $p < 0.05$ .

\*\*Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Prueba de comparaciones múltiples post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD)  $p < 0.001$ .

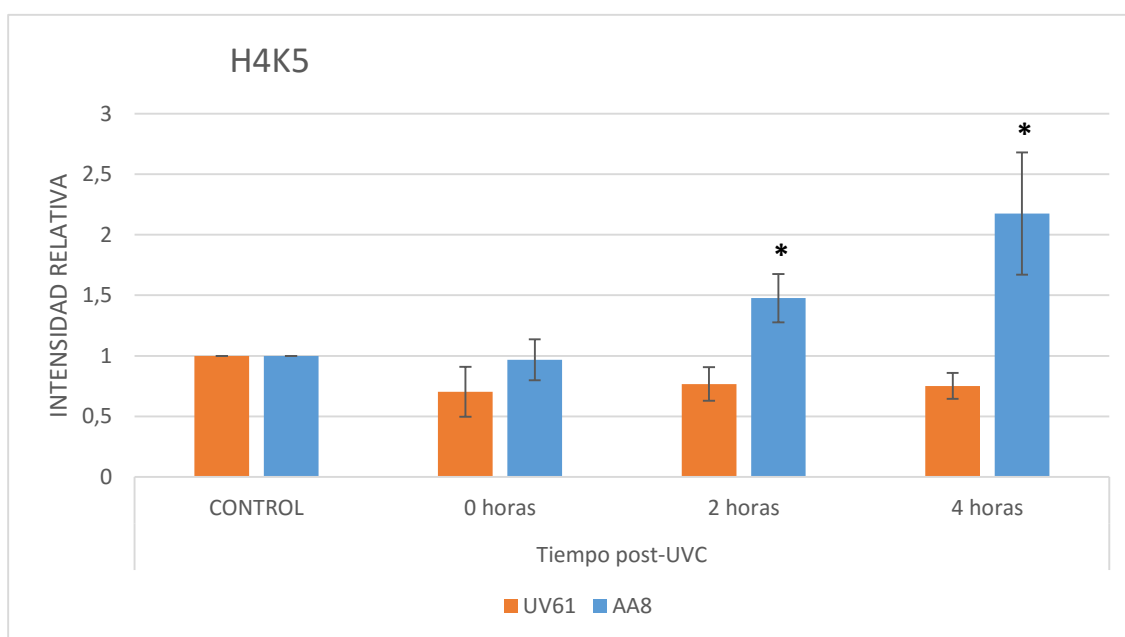
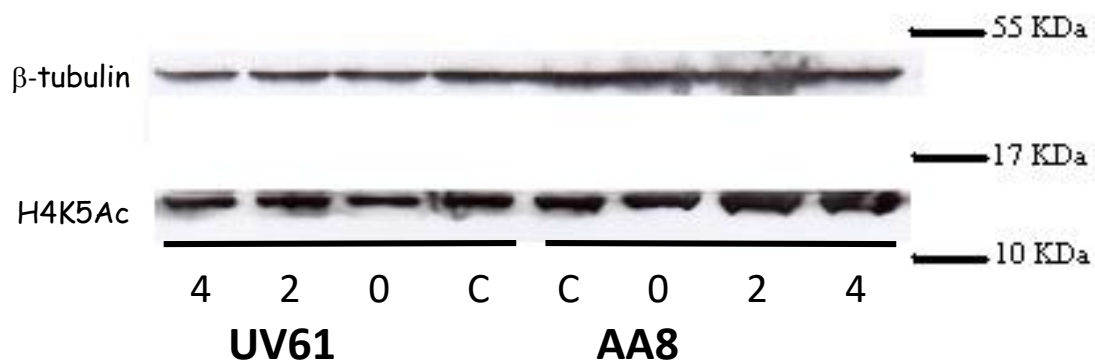
Sin embargo, la tri-acetilación de H4K8 (Figura 10) y la tetra-acetilación de H4K5 (Figura 11) se incrementaron a 2 hs y 4 hs post-UVC en AA8, pero casi no se observa un incremento de los niveles de acetilación para estos sitios en UV61, indicando que las células deficientes en la proteína CSB no pueden aumentar de manera adecuada los niveles de acetilación luego de la exposición a UVC como ocurre en las células normales.



**Figura 10.-** Western blot mostrando el patrón de acetilación de la lisina K8 de la histona H4 (histona H4 tri-acetilada) luego de 0 hs, 2 hs o 4 hs post-irradiación UVC (4 J/m<sup>2</sup>). Nótese que existe un incremento significativo del nivel de tri-acetilación de la histona H4 a 2 hs y 4 hs post-UVC sólo para AA8. El desvío estandar está indicado en la parte superior de las barras.

\*Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Prueba de comparaciones múltiples post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD) p<0.005.





**Figura 11.-** Western blot mostrando el patrón de acetilación de la lisina K5 de la histona H4 (histona H4 tetra-acetilada) luego de 0 hs, 2 hs o 4 hs post-irradiación UVC ( $4 \text{ J/m}^2$ ). Nótese que existe un incremento significativo del nivel de tetra-acetilación de la histona H4 a 2 hs y 4 hs post-UVC sólo para AA8. El desvío estandar está indicado en la parte superior de las barras.

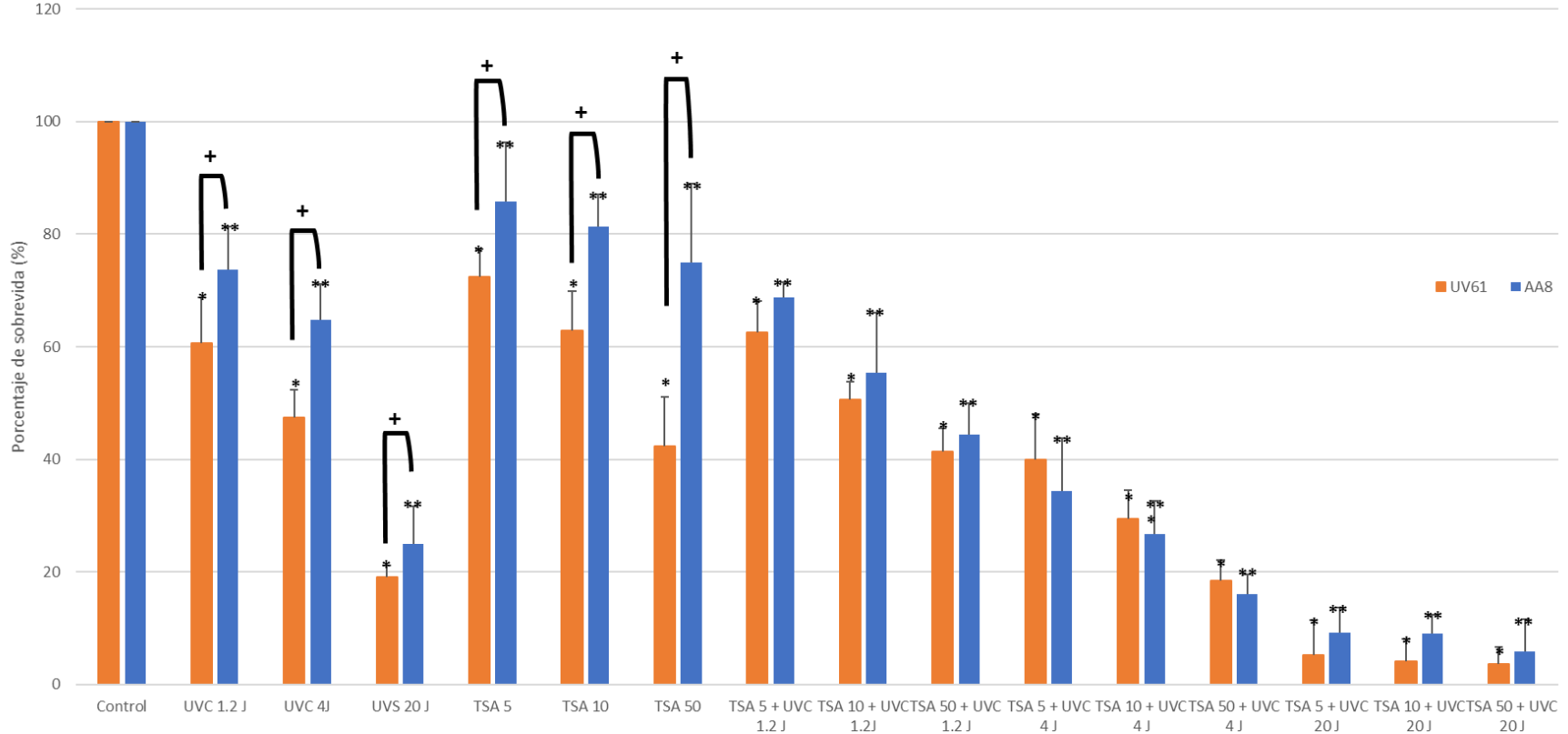
\*Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Prueba de comparaciones múltiples post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD)  $p < 0.005$ .

## **6.2. Análisis de la sobrevida de células AA8 y UV61 expuestas a diferentes dosis de UVC y/o TSA**

El propósito de este análisis fue determinar el efecto de los tratamientos simples o combinados (UVC + TSA) en la sobrevida de células AA8 y UV61, para lo cual diferentes dosis de UVC (1,2 J/m<sup>2</sup>, 4 J/m<sup>2</sup> y 20 J/m<sup>2</sup>) y TSA (5 ng/mL, 10 ng/mL y 50 ng/mL), de manera aislada o combinada, fueron testados (Figura 12).

Se observó que a 1,2 J/m<sup>2</sup> los porcentajes de sobrevida fueron entre el 75% y el 60% para AA8 y UV61, respectivamente, y para 4 J/m<sup>2</sup> fueron solo un poco más bajos entre el 65% y el 50% para AA8 y UV61, respectivamente, mientras que a 20 J/m<sup>2</sup> la sobrevida estuvo en el entorno del 20% para ambas líneas celulares. Los tratamientos con TSA mostraron una sobrevida superior para ambas líneas celulares, aunque siempre fue mayor la sobrevida en AA8 con respecto a UV61. El efecto de los tratamientos combinados disminuyó sensiblemente la sobrevida en ambas líneas celulares con respecto a los tratamientos aislados, aunque el aspecto más interesante del efecto combinado de los tratamientos fue la diferencia mínima (no significativa) de sobrevida observada entre AA8 y UV61, indicando que la combinación de los tratamientos afectó mayormente a las células proficientes en CSB o normales.

Con el fin de conocer de qué manera influye el mecanismo de muerte celular vía apoptosis en la sobrevida de ambas líneas celulares expuestas a UVC y/o TSA, se realizó un estudio morfológico de la frecuencia de células apoptóticas empleando colorantes fluorescentes para testar estos tratamientos.



**Figura 12.-** Porcentajes de supervivencia mediante ensayo clonogénico de ambas líneas celulares combinando 1,2 J/m<sup>2</sup> 4 J/m<sup>2</sup> y 20 J/m<sup>2</sup> con 5, 10 y 50 ng/mL de TSA. Resultados de dos experimentos independientes. El desvío estándar está indicado en la parte superior de las barras.

\* Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para línea celular UV61. Prueba de comparaciones multiple post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD) p<0.005.

\*\* Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para línea celular AA8. Prueba de comparaciones multiple post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD) p<0.005.

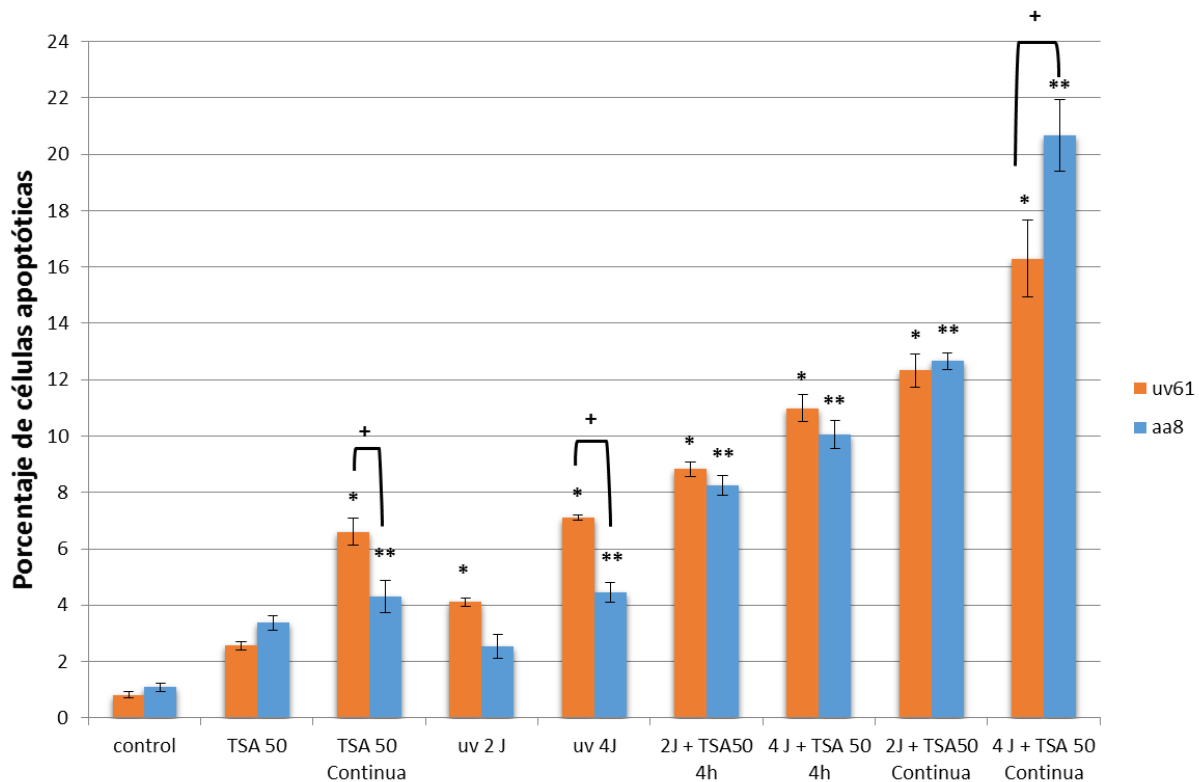
+ Diferencia estadísticamente significativa entre las dos líneas celulares a igual tratamiento. La diferencia de medias es significativa en el nivel p<0,005; ajuste para varias comparaciones: Bonferroni

### **6.3. Análisis morfológico de la frecuencia de células apoptóticas inducidas por UVC, TSA o UVC + TSA**

La combinación de la fluoresceína diacetato (FDA), el ioduro de propidio (IP) y el Hoechst 33342 (HO, colorante supravital) fueron empleados para identificar las células apoptóticas de las células viables, pudiendo reconocer la morfología apoptótica de condensación de la cromatina tanto en una fase temprana donde aún se mantiene la integridad de la membrana plasmática o una fase más tardía cuando el ioduro de propidio llega al núcleo el cual, manteniendo la morfología apoptótica, se tiñe de color rojo (IP) y azul (HO) y el citoplasma pierde la coloración amarillo-verdosa (FDA).

Un análisis comparativo de ambas líneas celulares tratadas con UVC (2 J/m<sup>2</sup> o 4 J/m<sup>2</sup>), TSA (50 ng/mL 4 hs previo a la irradiación UVC y continua) o de manera combinada se presenta en la Figura 13.

Como era de esperarse, las células UV61 (más sensibles a la irradiación UVC que AA8), mostraron una frecuencia mayor de células apoptóticas al igual que con el tratamiento continuo de TSA solo. Sin embargo, en los tratamientos combinados se pudo observar una frecuencia similar de células apoptóticas excepto con la dosis de 4 J/m<sup>2</sup> combinada con el tratamiento continuo de TSA donde, contrario a lo esperado, las células AA8 mostraron un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de células apoptóticas.



**Figura 13.-** Análisis morfológico de la frecuencia de células apoptóticas inducidas por UVC ( $2 \text{ J/m}^2$  o  $4 \text{ J/m}^2$ ), TSA ( $50 \text{ ng/mL}$   $4 \text{ hs}$  previo a la irradiación UVC y continua) o de manera combinada. Resultados de dos experimentos independientes.

\*Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para línea celular UV61. Ajuste para varias comparaciones Boferroni  $p < 0.0001$ .

\*\*Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para la línea celular AA8. Ajuste para varias comparaciones Boferroni  $p < 0.0001$ .

\*\*\* Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para la línea celular AA8. Ajuste para varias comparaciones Boferroni  $p < 0.05$ .

+ Diferencia estadísticamente significativa entre las dos líneas celulares a igual tratamiento. La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p < 0,05$ . Ajuste para varias comparaciones Bonferroni.

De modo de establecer si los fenotipos de daño celular observados en células AA8 y UV61 tratadas en forma aislada o combinada con UVC y/o TSA, presentados en los ítems 6.2 y 6.3, se correlacionan con los niveles de daño primario (dímeros de pirimidina o CPD) inducidos por UVC en presencia o ausencia de TSA, se realizaron ensayos de “inmunoslotblot” empleando anticuerpos anti-CPD.

#### **6.4. Cuantificación de CPD inducidos por UVC en presencia o ausencia de TSA**

La presencia de CPD a dos horas post-irradiación UVC ( $4 \text{ J/m}^2$  y  $8 \text{ J/m}^2$ ) en combinación con un tratamiento continuo de TSA (10 ng/mL o 50 ng/mL) fue evaluada mediante la técnica de “inmunoslotblot” empleando anticuerpos primarios anti-CPD y revelados con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Las señales de quimioluminiscencia fueron cuantificadas empleando el software “Image J”.

De modo de establecer la concentración adecuada de ADN extraída de células AA8 y UV61 tratadas con UVC y/o TSA que debía ser depositada en los pocillos del “inmunoslotblot” para poder observar una adecuada diferencia de intensidad en las bandas obtenidas de los diferentes tratamientos, se realizaron inicialmente dos ensayos con 100 ng, 200ng y 400 ng de ADN por muestra (Figura 14). La distribución de las diferentes muestras cargadas en el rack de “inmunoslotblot” se presenta en la Figura 18. Como puede observarse en la Figura 14, las marcas obtenidas con 100 ng (color verde) de ADN son de escasa intensidad y las de 400 ng (color celeste) se observan saturadas, mientras que las marcas obtenidas con una concentración de ADN de 200 ng (color amarillo) fue óptima para la cuantificación mediante análisis de imágenes.

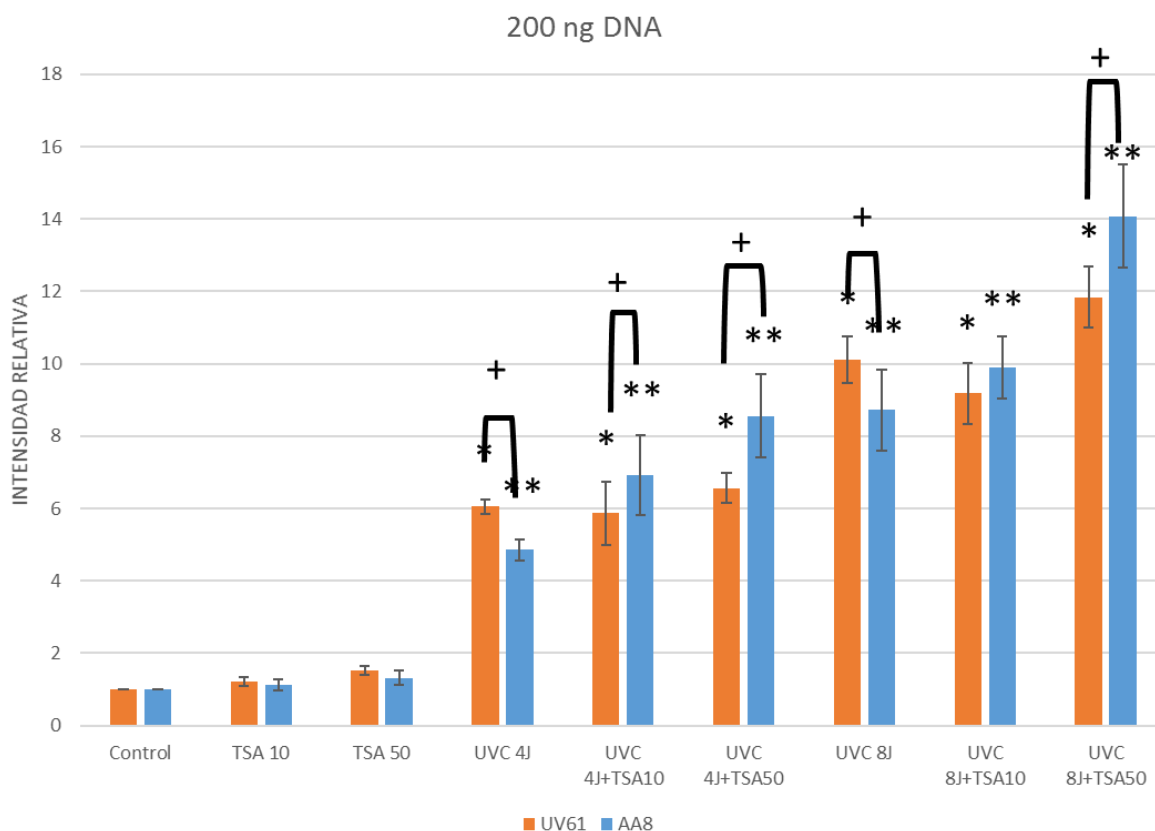


**Figura 14.-** Membrana de nitrocelulosa para inmunoblot empleando anticuerpos anti-CPD para reconocer las lesiones inducidos por UVC ( $4 \text{ J/m}^2$  o  $8 \text{ J/m}^2$ ) en células AA8 y UV61 en presencia o ausencia de TSA ( $10 \text{ ng/mL}$  o  $50 \text{ ng/mL}$ ). Diferentes cantidades de ADN ( $100 \text{ ng}$ ,  $200 \text{ ng}$  y  $400 \text{ ng}$  por “slot”) para cada punto experimental fue testado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>L 3</b>	8 J T10	8J- T10	8J- T50	8 J	8J- T10	8J- T50	8J- T10	8J- T50	8J- T10	8J- T50	8 J	8J- T10	8J- T50	8 J	8J- T10	8J- T50
<b>L 2</b>	4 J T10	4J- T10	4J- T50	4 J	4J- T10	4J- T50	4J- T10	4J- T50	4J- T10	4J- T50	4 J	4J- T10	4J- T50	4 J	4J- T10	4J- T50
<b>L 1</b>	C	T10	T50	C	T10	T50	T10	T50	T10	T50	C	T10	T50	C	T10	T50
	<b>AA8</b>			<b>UV61</b>			<b>AA8</b>		<b>UV61</b>		<b>AA8</b>			<b>UV61</b>		

**Figura 15.-** Representación esquemática de la distribución de cada punto experimental a lo largo de una membrana de nitrocelulosa. C: control; T10: TSA  $10 \text{ ng/mL}$ ; T50: TSA  $50 \text{ ng/mL}$ . Los puntos experimentales que están indicados con el color amarillo corresponden a las muestras de ADN de  $200 \text{ ng}$ , los de color verde a  $100 \text{ ng}$  y los de color celeste a  $400 \text{ ng}$  de ADN.

En la Figura 16 se presentan los datos promedio obtenidos de la cuantificación de los diferentes puntos experimentales que aparecen en color amarillo en la Figura 15 provenientes de 3 experimentos independientes.



**Figura 16.-** Valores promedio de la intensidad relativa de los CPD marcados en el ADN contenido en cada “slot” con respecto a la intensidad observada en el control respectivo para cada línea celular expuesta a UVC y/o TSA continuo recuperadas 2 hs post-irradiación UVC. Tres experimentos independientes por duplicado fueron realizados.

\*Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para línea celular UV61. Prueba de comparaciones multiple post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD)  $p < 0.005$ .

\*\*Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control para línea celular AA8. Prueba de comparaciones multiple post-hoc de mínima diferencia significativa (LSD)  $p < 0.005$ .

+Diferencia estadísticamente significativa entre las dos líneas celulares a igual tratamiento. La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p < 0,005$ ; comparaciones por parejas, ajuste para varias comparaciones: Bonferroni

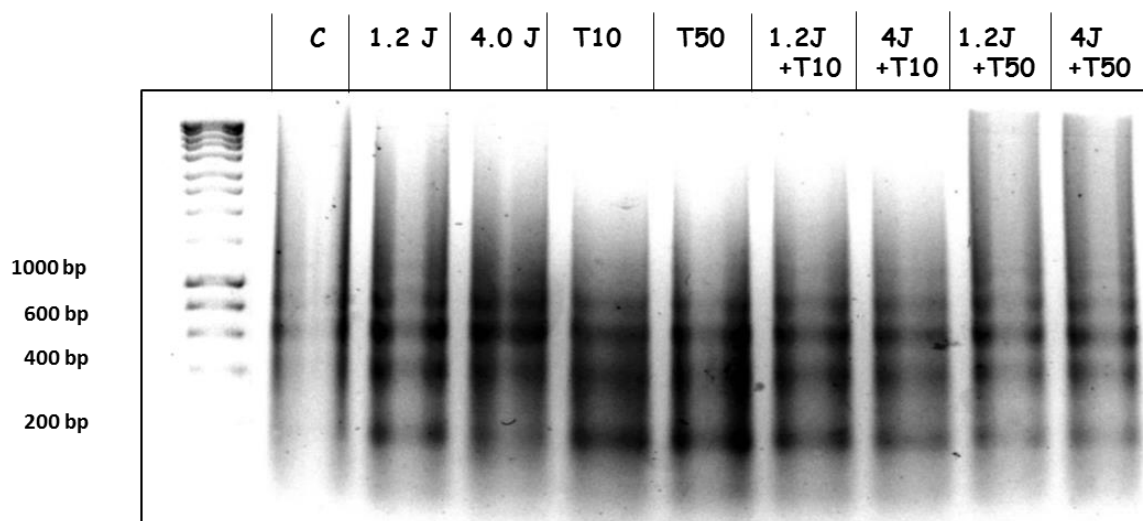
La irradiación con  $4 \text{ J/m}^2$  de UVC produjo un número de CPD estadísticamente significativo tanto en AA8 como en UV61, mostrando el recuento de los CPD que UV61 mantiene un mayor número estadísticamente significativo de CPD a las 2 hs post-irradiación para ambas dosis de UVC. Por el contrario, en presencia de TSA continua el



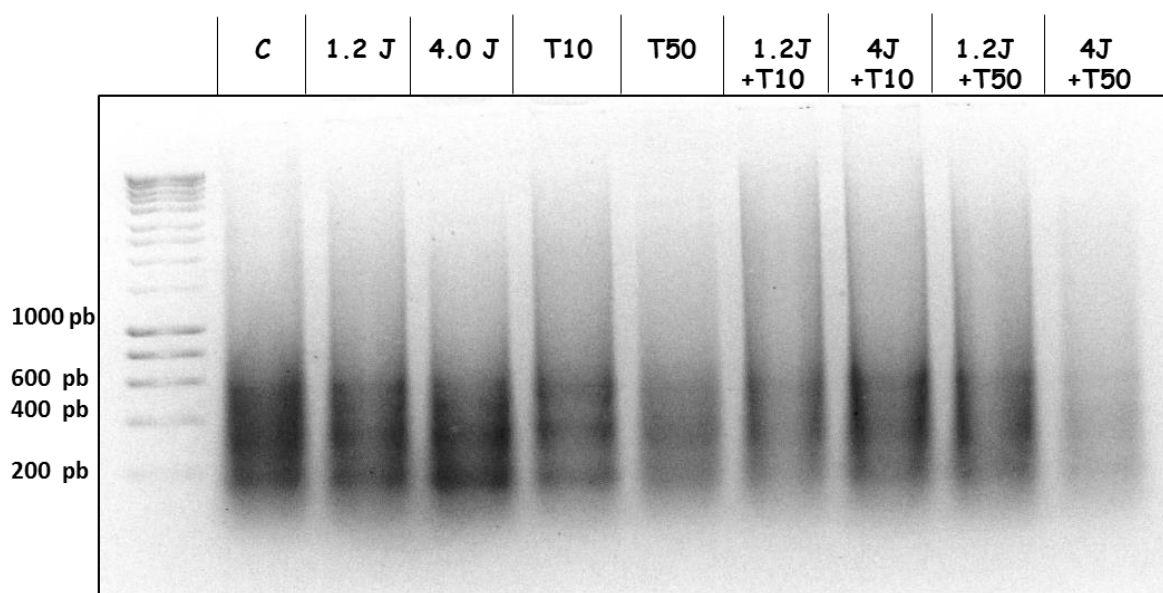
número de CPD que permanecen a las 2 hs post-irradiación en AA8 es significativamente mayor que en UV61 para ambas dosis de UVC aplicadas en presencia continua de TSA.

### **6.5. Digestión de ADN por la nucleasa micrococcal (MNasa) de células AA8 y UV61 expuestas a UVC en presencia o ausencia de TSA**

Basados en una de las primeras evidencias de la existencia de remodelación de la cromatina en células de mamífero expuestas a UVC empleando una nucleasa (Smerdon y Lieberman, 1978), se pretendió determinar el efecto de la irradiación UVC combinado con el tratamiento con TSA sobre el ordenamiento nucleosómico mediante un ensayo de digestión de ADN por la MNasa. Para tal fin, nucleoides aislados de células AA8 y UV61 irradiadas con UVC en presencia o ausencia de TSA y recuperadas a las 2 hs post-UVC (dado previos hallazgos obtenidos en nuestro Laboratorio en relación al tiempo post-UVC en el que se observa el mayor grado de remodelación de la cromatina, fueron expuestos a una solución conteniendo 0,6 unidades/ $\mu$ l de MNasa y el ADN digerido fue corrido en un gel de agarosa (Figuras 17 y 18).

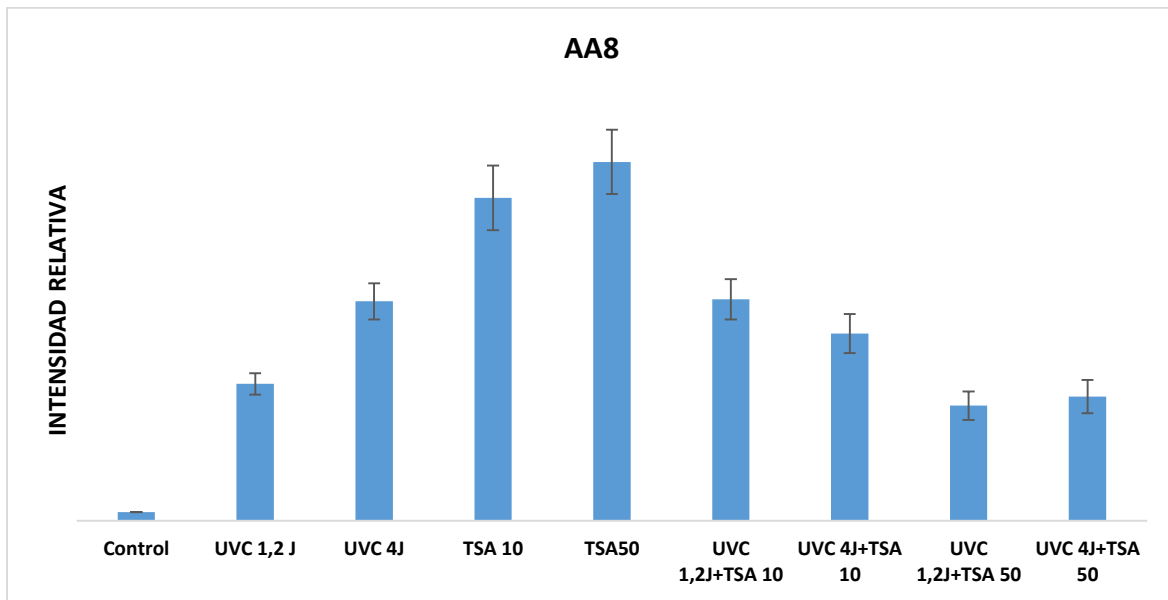


**Figura 17.-** Digestión por MNasa (0,6 unidades/ $\mu$ l) de nucleoides aislados de células AA8 irradiadas en presencia o ausencia de TSA. Los nucleoides fueron extraídos 2hs post-UVC. Nótese que las bandas correspondientes a 200 pb son menos intensas en los carriles con tratamientos combinados en presencia de TSA 50 ng/mL sugiriendo una menor digestión por la MNasa en estas muestras de ADN.

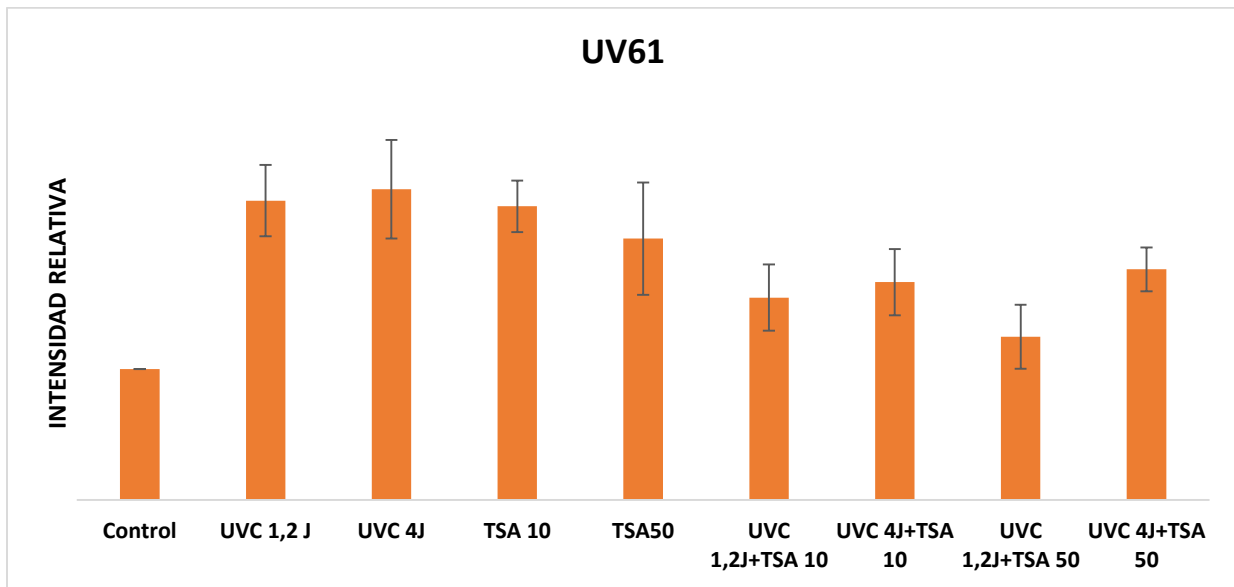


**Figura 18.-** Digestión por MNasa (0,6 unidades/ $\mu$ l) de nucleoides aislados de células UV61 irradiadas en presencia o ausencia de TSA. Los nucleoides fueron extraídos 2hs post-UVC. Nótese que las bandas correspondientes a 200 pb son menos intensas en los carriles con tratamientos combinados en presencia de TSA 50 ng/mL sugiriendo una menor digestión por la MNasa en estas muestras de ADN.

El análisis de las imágenes obtenidas mediante la comparación de las intensidades de las bandas de ADN ubicadas a nivel de los 200 pb (en relación a la longitud del total de ADN migrado) entre todos los puntos experimentales, permitió observar en AA8 una mayor digestión por la MNasa en los tratamientos aislados con UVC o TSA en comparación con el control, mientras que los tratamientos combinados UVC+TSA 50 ng/mL parecerían mostrar una menor digestión por la MNasa (Figura 19). Por otro lado, en UV61 no se observa una diferencia tan clara entre las muestras tratadas con UVC o TSA y el control, aunque parecería, al igual que en AA8, que los tratamientos combinados UVC+TSA 50 ng/mL, incluso UVC+TSA 10 ng/mL muestran una menor digestión por MNasa (Figura 20).



**Figura 19.-** Representación gráfica de la relación entre la intensidad de la banda ubicada a nivel de los 200 pb de ADN y la longitud del “smear” de ADN producido en cada punto experimental de células UV61 tratadas con UVC y/o TSA. Se presentan datos promediados de 4 imágenes con sus respectivos desvíos estándar.



**Figura 20.-** Representación gráfica de la relación entre la intensidad de la banda ubicada a nivel de los 200 pb de ADN y la longitud del “smear” de ADN producido en cada punto experimental de células UV61 tratadas con UVC y/o TSA. Se presentan datos promediados de 4 imágenes con sus respectivos desvíos estándar.

## 7. DISCUSIÓN

El sistema de reparación por escisión de nucleótidos o NER es un proceso enzimático en múltiples pasos, que reconoce y elimina un amplio espectro de lesiones que causan grandes distorsiones de la estructura del ADN, como las lesiones inducidas por UVC (CPD y 6-4PP) y aductos químicos voluminosos (Pfeifer, 1997; Wogan, Hecht, Felton, Conney, & Loeb, 2004). Los individuos con reducida actividad en el sistema NER pueden presentar los siguientes trastornos genéticos: a) Xeroderma Pigmentosum (XP); b) Síndrome de Cockayne (CS) y; c) Tricotodistrofia (TTD). Estos trastornos se caracterizan por una mayor sensibilidad a la radiación UV, elevada incidencia de cáncer (para XP y TTD), exacerbado envejecimiento y muerte celular (CS), así como defectos multi-sistema que pueden incluir alteraciones inmunológicas y neurológicas (J. E. Cleaver, E. T. Lam, & I. Revet, 2009). Esto demuestra la importancia del NER como un mecanismo fundamental para la protección de la integridad funcional y estabilidad del genoma humano (J. H. Hoeijmakers, 2001), proporcionando un apoyo importante para la teoría de la mutación somática del cáncer. La reparación del ADN juega un papel fundamental en el metabolismo del ADN ya que el mantenimiento de la estabilidad del genoma, contribuye al desarrollo normal del organismo, teniendo un papel fundamental durante la formación del sistema nervioso e inmunológico, a la vez que interviene en el proceso de envejecimiento y neurodegeneración. Particularmente, el sistema NER repara selectivamente regiones del genoma transcripcionalmente activas de forma más eficiente que las regiones no transcritas (Hanawalt, 2001). Las lesiones que bloquean la transcripción evitan la generación exacta del ARN mensajero y dan lugar a una expresión génica alterada.

Para llevar a cabo una correcta remoción de las lesiones inducidas por UVC mediante el NER, ha sido demostrado que un primer paso necesario es un adecuado proceso de remodelación de cromatina que incremente la accesibilidad de las proteínas del sistema de reparación mencionado.

Se considera que la alteración de la estructura de la cromatina en definitiva permite la entrada de los componentes de la maquinaria de reparación a los sitios de daño en el ADN en etapas posteriores de la reparación, y al hacerlo, permite la remoción eficiente de las lesiones (Hanawalt y Spivak, 2008). Esto ha llevado a considerar al modelo “acceder, reparar, restaurar” para la actividad del sistema NER en un entorno de cromatina complejo (Smerdon, 1991). Estos y otros estudios pioneros (Thoma, 1999; 2005) revelaron que la eliminación de la lesión se produce a un ritmo diferente en todo el genoma, a modo de ejemplo, las regiones transcripcionalmente activas son reparadas más rápidamente que las regiones inactivas (Hanawalt, 1991, 1995). Ensayos *in vitro* para evaluar la actividad del sistema NER, empleando como sustrato cromatina con lesiones bien definidas pasibles de ser removidas por el NER, han revelado que la reparación es lenta en el ADN nucleosomal con ningún movimiento o disrupción de los nucleosomas (Gaillard et al., 2003). Al medir la reparación de una lesión de ADN definida (por ejemplo, CPD o 6-4PPs) ubicada en dinucleosomas, se ha demostrado que la remodelación de cromatina ATP-dependiente podría mejorar los pasos previos y posteriores a la incisión del NER, ya que la doble incisión se ve facilitada por ACF, un factor de remodelación de la cromatina dependiente de ATP (Ura et al., 2001a).

Por otra parte, se ha observado que la incubación con el complejo de remodelación del nucleosoma ATP dependiente SWI/SNF, alteraba la conformación del ADN nucleosomal

y promovía una reparación más homogénea mediante el deslizamiento del nucleosoma, lo que aumentaba la accesibilidad al ADN (Gaillard et al., 2003; Hara y Sancar, 2003). De igual forma, los datos obtenidos por Yu y colaboradores, mediante ensayos *in vivo* en levaduras sugieren que SWI/SNF tiene un papel importante en la modulación de la accesibilidad a las fotolesiones inducidas por UVC, a la maquinaria de reparación del sistema NER, lo que mejoraba la remoción de las mismas (Yu, Teng, Liu, Reed, & Waters, 2005).

### **7.1. Niveles de acetilación de histonas en células símil Síndrome de Cockayne**

Los procesos de remodelación de la cromatina son el resultado de cambios a nivel nucleosomal para permitir que la maquinaria de reparación pueda acceder a las lesiones producidas en el ADN. La irradiación UVC induce la relajación de la cromatina dependiente de p53, operando a través de la acetiltransferasa P300, contribuyendo a la remoción de las lesiones inducidas por UVC (Rubbi y Milner, 2003). Más aún, Yu et al. (2005) han demostrado que la irradiación UVC activa un proceso de hiperacetilación a nivel de las histonas H3 y H4. El análisis de los niveles de acetilación de histonas inducidos por UVC en células proficientes (AA8) y deficientes en CSB (UV61) mostró, que a pesar de que estas células presentan p53 mutado, incrementan los niveles de acetilación de la histona H4 a las 2 hs y 4 hs post-irradiación UVC. Sin embargo, solo AA8 alcanzó niveles superiores de acetilación en las 4 lisinas de su extremo aminoterminal asociadas con perfiles de hiperacetilación, mientras que UV61 mostró un incremento de los niveles de acetilación estadísticamente significativos para H4K12ac a 4hs post-irradiación UVC (Figuras 8-11), indicando que la proteína CSB estaría involucrada con el proceso de acetilación global de histonas necesaria para una eficiente

remoción de los CPD inducidos por UVC. En este sentido, ha sido demostrado que CSB no es capaz de atraer a la acetiltransferasa P300 al sitio de la lesión inducida por UVC produciendo una hipoacetilación en la zona donde está ubicada la lesión (Fousteri et al., 2006). A su vez, Proietti De Santis et al. (2006) ha observado que el nivel de acetilación de la histona H4, en las histonas que rodean a los promotores de genes controlados por CSB, se encuentran hipoacetiladas confirmando que no sólo a nivel de la lesión inducida por UVC no ocurre el proceso de acetilación de histonas sino también a nivel de los promotores de los genes que son regulados por CSB. Nuestros datos muestran, por tanto, que existe una clara diferencia a nivel de la acetilación global entre células proficientes y deficientes en la proteína CSB (células símil Síndrome de Cockayne).

## **7.2. Análisis de sobrevivencia e inducción de apoptosis en células proficientes y deficientes en CSB tratadas en forma combinada con UVC y TSA**

Los resultados obtenidos con los ensayos clonogénicos han mostrado que los tratamientos con UVC o TSA en forma aislada afectan mayormente la sobrevivencia de las células deficientes en CSB. Sin embargo, los tratamientos combinados afectaron mucho más la sobrevivencia de las células normales, proficientes en CSB, que las células símil Síndrome de Cockayne (Figura 12) sugiriendo que la TSA produce un efecto sinérgico con la irradiación UVC que reduce la sobrevivencia de las células normales a un nivel similar al observado en las células deficientes en CSB, para lo cual probablemente exista otro mecanismo en la base de esta hipersensibilidad a UVC, más allá de la relajación de la cromatina producida por el efecto inhibitorio sobre las desacetilasas de histonas.

De modo de conocer si en la base de los resultados obtenidos en los ensayos de sobrevivencia se encontraba un incremento en la muerte celular vía apoptosis, ya que las



células deficientes en CSB se caracterizan por presentar un incremento significativo de células apoptóticas cuando son expuestas a UVC (Proietti De Santis et al., 2002), se llevó a cabo el estudio de la frecuencia de células apoptóticas inducidas por UVC pre-tratadas con TSA durante 4 hs o con un tratamiento continuo (4 hs preivas y 20 hs post-UVC hasta su recolección). Coincidiendo con los datos obtenidos en los ensayos de sobrevida, los tratamientos aislados de UVC o TSA produjeron un mayor nivel de muerte celular en UV61 con valores estadísticamente significativo. Sin embargo, los tratamientos combinados UVC+TSA continua mostraron un mayor incremento de las células apoptóticas en células proficientes en CSB en comparación con las células símil Síndrome de Cockayne, también con valores estadísticamente significativos, lo que estaría explicando el hecho que la sobrevida en AA8 se haya observado mayormente afectada durante los tratamientos combinados de UVC+TSA. Este hecho estaría indicando que tanto células que se caracterizan por presentar una hipoacetilación global al ser expuestas a UVC (como hemos observado en las células símil Síndrome de Cockayne en el presente trabajo de tesis), como células normales expuestas a UVC en presencia de altas dosis de TSA induciendo una hiperacetilación global, ven alterada su estabilidad genómica, lo que sugiere que un desbalance en el nivel de acetilación de histonas puede llevar a fenotipos de inestabilidad genómica como ha sido descrito para algunas patologías neurodegenerativas (Rouaux et al., 2004).

### **7.3. Remoción de CPD inducidos por UVC en presencia o ausencia de TSA en células proficientes y deficientes en CSB**

Debido a que las histonas son hiperacetiladas luego de la exposición a UVC para permitir un mayor acceso a las proteínas del sistema NER a las lesiones ubicadas en el ADN (Ramanathan y Smerdon, 1989), se esperaba que incrementos en los niveles de

acetilación de histonas producidos por la TSA, la que conduce a una decondensación de la cromatina por un mecanismo de inhibición de las desacetilasas de histonas, debería incrementarse también la tasa de remoción de CPD en nucleosomas hiperacetilados (Ura y Hayes, 2002). Sin embargo, los datos obtenidos mediante la técnica de inmunoblot empleando anticuerpos específicos anti-CPD mostraron una mayor acumulación de CPD a las 2 hs post-UVC en células deficientes en CSB como era de esperarse dada la mayor hipersensibilidad característica de células símil Síndrome de Cockayne, ya evidenciada en los ensayos previos para estos tratamientos con niveles estadísticamente significativos. Por otro lado, los tratamientos combinados UVC+TSA mostraron una mayor acumulación de CPD en células proficientes en CSB, también con niveles estadísticamente significativos, lo que reafirma el hecho de que en la base de la disminución en la sobrevivencia e incremento de la muerte celular vía apoptosis en presencia de los tratamientos combinados se encuentra una deficiencia en la remoción del daño primario inducido por UVC.

Aunque se desconocen el o los mecanismos moleculares subyacentes a este descenso en la remoción de las lesiones inducidas por UVC en presencia de TSA, es probable que cambios en la conformación de la cromatina jueguen un papel importante en la correcta interacción entre las proteínas involucradas en los sistemas de reparación del ADN y la organización nucleosómica subyacente que permita un correcto acceso a las lesiones producidas sobre el ADN (Stevnsner et al. 2008). Por tal motivo, se llevaron a cabo ensayos de digestión con nucleasa micrococcal para estudiar el efecto que tiene la deficiencia en CSB o la hiperacetilación inducida con TSA en la remodelación nucleosómica inducida por UVC.

#### **7.4. Remodelación nucleosómica inducida por UVC en presencia o ausencia de TSA en células proficientes y deficientes en CSB**

Dada la dificultad en la remoción de CPD inducidos por UVC observada tanto en células similar Síndrome de Cockayne como en células proficientes en CSB expuestas a TSA, hemos planteado que un estado de remodelación diferencial de la cromatina podría interferir en el adecuado proceso de reparación del ADN. El análisis de los datos obtenidos mediante la digestión con nucleasa micrococcal muestran que la presencia de TSA a una concentración de 50 ng/mL en combinación con UVC disminuye la digestión por nucleasa micrococcal, indicando que un ordenamiento nucleosómico diferente podría estar en la base de la interferencia con el sistema NER debido al hecho que las proteínas de reparación no tendrían un acceso adecuado a las lesiones inducidas por UVC sobre el ADN.

Finalmente, nos hemos planteado un posible mecanismo que pudiese explicar como un defecto en una proteína remodeladora de cromatina dependiente de ATP, involucrada en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, lleva a un incremento de la sensibilidad a la exposición a UVC, relacionado con la imposibilidad de realizar una adecuada remodelación de la cromatina para permitir que el sistema de reparación actúe de modo eficiente para remover las lesiones inducidas por UVC. Se plantea, por otro lado, conocer si en la base de la hipersensibilidad a UVC observada en células proficientes en CSB en presencia de TSA pudiera también estar ocurriendo un inadecuado remodelamiento de cromatina, ya que este fenotipo de hipersensibilidad al UVC es similar al encontrado en células deficientes en CSB, lo que se encuentra apoyado por el trabajo realizado por Newman et al. (2006) quienes han observado mediante

“microarray” que el patrón de expresión génica de células CSB es similar al encontrado en células pre-tratadas con TSA.

## 8. CONCLUSIONES

1. El proceso de relajación de la cromatina en células proficientes y deficientes en CSB está relacionado con el proceso de acetilación de histonas, y en células AA8 y UV61 es independiente de p53.
2. El inhibidor de deacetilasas de histonas, Tricostatina A o TSA, disminuye la proliferación y la supervivencia de células AA8 y UV61 cuando son expuestas a UVC, produciendo un efecto más significativo sobre células proficientes en CSB.
3. La Tricostatina A impide la correcta remoción de los dímeros de pirimidina (CPDs) inducidos por UVC en células proficientes y deficientes en CSB, siendo más intenso el efecto inhibitorio de la reparación del daño en el ADN de células normales irradiadas en presencia de Tricostatina A.
4. Los ensayos de digestión con nucleasa micrococcal sugieren que una remodelación diferencial de la cromatina ocurre cuando la célula es irradiada con UVC en presencia de Tricostatina A, lo que impide una correcta interacción entre las proteínas del sistema de reparación por escisión de nucleótidos y las lesiones producidas por UVC en el ADN.

Finalmente, varias evidencias experimentales así como los hallazgos obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis nos han permitido proponer que un desbalance en el proceso de acetilación de histonas podría estar en la base del descenso en la remoción de las lesiones inducidas por UVC tanto en células símil Síndrome de Cockayne como en células proficientes en CSB pre-tratadas con Tricostatina antes de la exposición a UVC, lo cual puede ser explicado por una reducción en la normal interacción

entre las proteínas del sistema de reparación por escisión de nucleótidos a nivel de los sitios de ADN dañados, debido a cambios en el conformación del estado de la cromatina.

Parece bastante claro que un remodelamiento nucleosómico diferencial juega un papel importante en la reparación del ADN, porque su alteración puede impedir el correcto acceso a las lesiones inducidas en el ADN por parte de las proteínas de los sistemas de reparación de ADN. Sin embargo, se necesitan más evidencias experimentales para confirmar nuestra hipótesis que establecía que un reordenamiento diferencial de cromatina podría estar en la base de la elevada sensibilidad a UVC que poseen las células símil Síndrome de Cockayne, deficientes en la proteína CSB.

## 9. PERSPECTIVAS

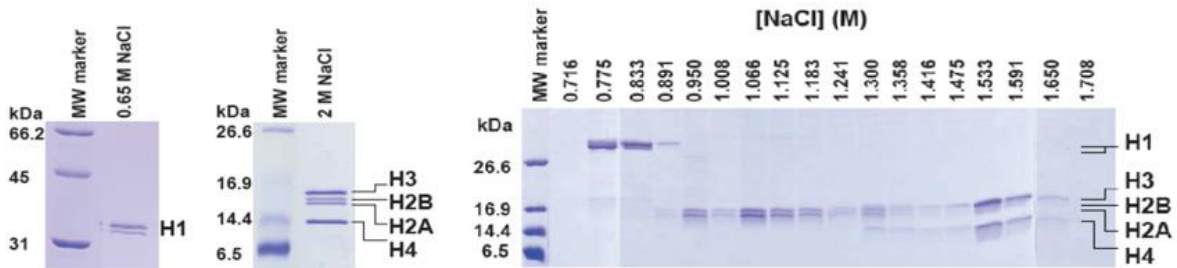
1) Las interacciones ADN-Histonas son muy estables, y las histonas sólo se liberan de la cromatina por concentraciones de NaCl mayores de 1,5 M (Kimura y Cook, 2001; Shechter et al., 2007; von Holt et al., 1989).

De acuerdo con lo anterior, se plantea la hipótesis de que si la estabilidad de la interacción ADN-Histonas (estabilidad nucleosómica) se ve reducida por una acetilación de histonas extensiva como respuesta a la presencia de daño en el ADN, debería presentarse, inmediatamente después de la inducción del daño, una alteración de la estructura de la cromatina en o cerca del sitio de daño y por lo tanto un incremento en la solubilidad de las histonas, por lo que sería posible su elución a bajas concentraciones de NaCl preferentemente de la cromatina dañada por medio de fraccionamiento bioquímico.

Se realizarán “Ensayos de Estabilidad Nucleosómica” empleando concentraciones crecientes de NaCl con el fin de extraer histonas que se hayan desensamblado del nucleosoma durante el normal proceso de remodelación de cromatina inducido por UVC, siguiendo el protocolo extraído de Rodríguez-Collazo et al. (2009) cuya descripción técnica se encuentra a continuación.

Las células serán recolectadas del cultivo y lavadas dos veces con PBS frío mediante centrifugación a 1000 rpm. El pellet se resuspenderá completamente en buffer A (20 mM Hepes, pH 7.9, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1.5 mM MgCl y 0.1% Triton X-100) conteniendo diferentes concentraciones de NaCl. Las células serán incubadas al menos 40 minutos a 4°C para cada concentración de NaCl, en agitación constante. Las

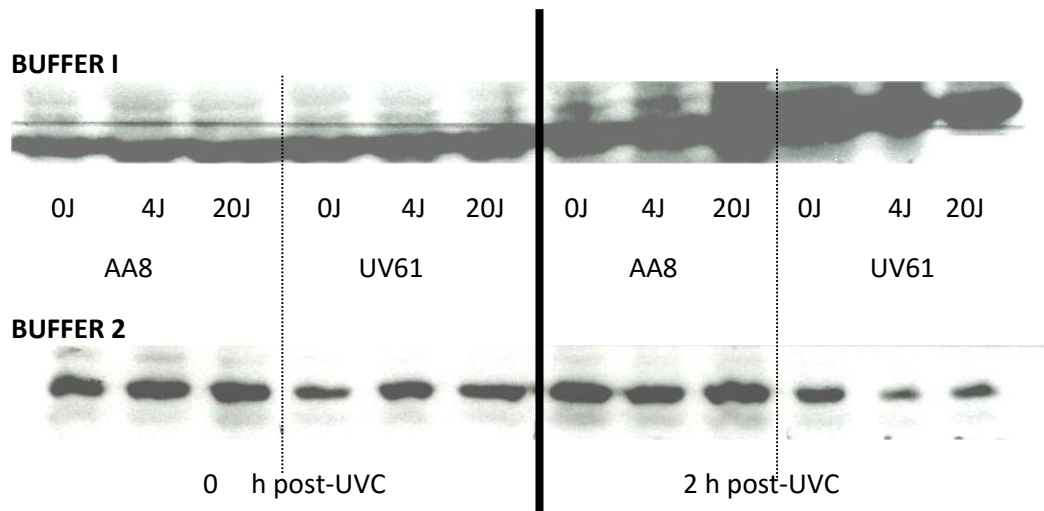
muestras serán luego centrifugadas a 10.000g por 20 minutos y los sobrenadantes obtenidos, conteniendo las histonas liberadas, serán guardados para su posterior análisis mediante SDS-PAGE. Concentraciones de NaCl:



Se observa como al aumentar la concentración de NaCl en el buffer de extracción, se van extrayendo de forma secuencial las histonas menos unidas al ADN. H1 entre 0.775M y 0.8891M de NaCl, posteriormente en mayor proporción H2B y H2A entre 0.950M y 1.300M de NaCl, y finalmente entre 1.553M y 1.650M de NaCl se extraen H3 y H4. Esto varía según la línea celular y ha sido realizado en condiciones normales sin ningún tipo de tratamiento.



2) Se realizarán “Ensayos de Unión a la Cromatina” (“Chromatin Bound Assay” - Balajee et al., 1998) empleando dos “buffer” de extracción de proteínas de manera secuencial con concentraciones crecientes de NaCl con el fin de extraer proteínas citoplásmicas y nucleares en la primera extracción y proteínas unidas a la cromatina durante la segunda extracción. A continuación, se muestra la foto de un western blot realizado con muestras de proteínas extraídas de AA8 y UV61 irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup> o 20 J/m<sup>2</sup>, y recuperadas a 0 hs y 2 hs post-UVC. Nótese que luego del segundo buffer de extracción, a las 2 hs post-UVC en UV61 casi no se obtiene marca de PCNA (una proteína que se une a la cromatina al final del proceso de reparación NER) ya que fue extraída con el primer buffer, indicando que PCNA no se ha unido a la cromatina luego de la irradiación UVC.



3) Confirmar en células derivadas de pacientes portadores de Síndrome de Cockayne los hallazgos experimentales obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis. Ya han sido incorporadas líneas de fibroblastos de estos pacientes, gentilmente donadas por el Prof. F. M. Menck del Laboratorio de Reparación de ADN de la Universidad de San Pablo (Brasil).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Allison S.J., Milner J., Loss of p53 has site-specific effects on histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy. *Cancer Res* (2003) 63: 6674-6679.
- Allison S.J., Milner J. Remodeling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis* (2004) 25: 1551-1557.
- Ahmad K., Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* (2002) 9: 1191-1200.
- Balajee A.S., May A., Dianova I., Bohr V.A. Efficient PCNA complex formation is dependent upon both transcription coupled repair and genome overall repair. *Mutat. Res.* (1998) 409: 135-46.
- Bao Y. Shen X. SnapShot: Chromatin remodeling: INO80 and SWR1. *Cell* (2011) 144: 158-158 e2.
- Basset A., Cooper S., Wu C., Travers A. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr Opin Genet Dev* (2009) 19: 159-165.
- Belmont, A.S., Dietzel, S., Nye, A.C., Strukov, Y.G., Tumber, T. Large-scale chromatin structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* (1999) 11: 307-311.
- Boyault C., Gilquin B., Zhang Y., Rybin V., Garman E. Meyer-Klaucke W., Matthias P., Müller C.W., Khochbin S. HDAC6p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J* (2006) 25: 3357-3366.
- Bronner C.E., Baker S.M., Morrison P.T., Warren G., Smith L.G., Lescoe M.K., Kane M., Earabino C., Lipfor J., Lindblom A., Tannergard P., Bollag R.J., Godwin A.R., Ward D.C., Nordenskjold M., Fishel R., Kolodner R., Liskay R.M. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposic colon cancer. *Nature* (1994) 368: 258-261.
- Buttinelli M., Panetta G., Rhodes D., Travers A. The role of histone H1 in chromatin condensation and transcriptional repression. *Genetica* (1999) 106: 117-124.
- Christmann M., Tomicic M.T., Ross W.P, Kaina B. Mechanism of human DNA repair: an update. *Toxicology* (2003) 193: 3-34.
- Citterio E., Van den Boom V., Schnitzler G., Kanaar, Bonte E., Kingston R.E., Hoeijmakers J.H.J., Vermeulen W. ATP-dependent Chromatin Remodeling by the Cockayne Syndrome B DNA Repair-Transcription-Coupling Factor. *Molecular and Cellular Biology* (2000) 20: 7643-7653.
- Cleaver J.E., Lam E.T., Revet. I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet* (2009) 10: 756-768.

- Condorelli F., Gnemmi I., Vallario A., Genazzani A.A., Canonico P.L. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* (2008) 153: 657-668.
- Costa R.M., Chigancas V., Galhardo Rda S., Carvalho H., Menck C.F.M. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* (2003) 85: 1083-99.
- Costanzi C., Pehrson J.R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* (1998) 393: 599-601.
- de Boer J., Hoeijmakers J.H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* (2000) 21: 453-460.
- Dinant C., Houtsmuller A., Vermeulen W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & Chromatin* (2008) 1: 9-22
- Ehrenhofer-Murray A.E. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *European Journal of Biochemistry* (2004) 271: 2335-2349.
- Eshleman J.R., Marcowitz S.D. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Current Opinion in Oncology* (1996) 7: 83-89.
- Eskeland R., Eberharter A., Imhof A., HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol* (2007) 27: 453-465.
- Espada J., Ballestar E., Fraga M.F., Villar-Garea A., Juarranz A., Stockert J.C., Robertson K.D., Fuks F., Esteller M. Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* (2004) 279: 37175-37184.
- Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* (1992) 355: 219-224.
- Folco H.D., Pidoux A.L., Urano T., Allshire R.C. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* (2008) 319: 94-97.
- Ford J.M. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *2005 Mutation Research* (2005) 577: 195-202.
- Fournel M., Bonfils C., Hou Y., Yan P.T., Trachy-Bourget M.C, Kalita A., Liu J., Lu A.H., Zhou N.Z., Robert M.F., Gillespie J., Wang J.J., Ste-Croix H., Rahil J., Lefebvre S., Moradei O., Delorme D., Macleod A.R., Besterman J.M., Li Z. MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* (2008) 7: 759-768.
- Fousteri M., Vermeulen W., vanZeeland A.A., Mullenders L.H.F. Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II *In Vivo*. *Molecular Cell* (2006) 23:471-482.
- Friedberg E., Walker G., Siede W. DNA Repair and Mutagenesis (1995) ASM Press, Washington DC.

- Friedberg E. How Nucleotide excision repair protects against Cancer. *Nature reviews in Cancer* (2001) 1: 22-23.
- Furuta T., Takemura H., Liao Z.Y., Aune G.J., Redon C. Sedelnikova O.A., Pilch D.R., Rogakou E.P., Celeste A., Chen H.T., Nussenzweig A., Aladjem M.I., Bonner W.M., Pommier Y. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* (2003) 278: 20303-20312.
- Gaillard H., Fitzgerald D.J., Smith C.L., Peterson C.L., Richmond T.J., Thoma F. Chromatin remodeling activities act on UV-damaged nucleosomes and modulate DNA damage accessibility to photolyase. *J Biol Chem* (2003) 278: 17655-17663.
- Green C.M., Almouzni G. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* (2002) 3: 28-33.
- Green C.M., Almouzni G. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair *in vivo*. *The EMBO Journal* (2003) 22: 5163-5174.
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* (1997) 389: 349-352.
- Gupta A., Sharma G.G., Young C.S., Agarwal M., Smith E.R. Paull TT, Lucchesi J.C., Khanna K.K., Ludwig T., Pandita T.K. Involvement of human MOF in ATM function. *Mol Cell Biol* (2005) 25: 5292-5305.
- Haber J. Partners and Pathways repairing a double-strand break. *Trends in Genetics* (2000) 16: 259-264.
- Hanawalt P.C. Heterogeneity of DNA repair at the gene level. *Mutat Res* (1991) 247: 203-211.
- Hanawalt P.C. DNA repair comes of age. *Mutat Res* (1995) 336: 101-113.
- Hanawalt P.C. DNA repair. The bases for Cockayne syndrome. *Nature* (2000) 405: 415-416.
- Hanawalt P.C. Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res* (2001) 485, 3-13.
- Hanawalt P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* (2002) 21: 8949-8956.
- Hanawalt P.C., Ford J.M., Lloyd D.R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutation Research* (2003) 544: 107-114.
- Hanawalt P.C., Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2008) 9: 958-970.
- Hang B. Base Excision Repair, in Wei Q. LL, and Chen D., (ed): DNA repair, genetic instability and cancer. London, World Science (2007) pp 23-64.
- Hara R., Sancar A. Effect of damage type on stimulation of human excision nuclease by SWI/SNF chromatin remodeling factor. *Mol Cell Biol* (2003) 23: 4121-4125.

- Hsieh P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research* (2001) 486: 71-87.
- Hoeijmakers J.H. TFHIIH: a key component in multiple DNA transactions. *Current Opinion in Genetics & Development* (1996) 6: 26-33.
- Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* (2001) 411: 366-374.
- Hsu T.C. Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin. *Exp Cell Res* (1962) 27: 332-334.
- Huang B.H., Labn M., Leung C.H., Lee L., Lee C.K. Salto-Tellez M., Raju G.C., Hooi S.C. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21<sup>Cip1</sup>/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* (2005a) 12: 395-404.
- Huang S., Litt M., Felsenfeld G. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes Dev* (2005b) 19: 1885-1893.
- Jenuwein T., Allis C.D. Translating the Histone Code. *Sciences* (2001) 293: 1074-1079.
- Jeppesen P. Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *Bioessays* (1997) 19: 67-74.
- Ju B.G., Rosenfeld M.G. A breaking strategy for topoisomerase II beta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle* (2006) 5: 2557-2560.
- Kaufmann W.K., Carson C.C., Omolo B., Filgo A.J., Sambade M.J., Simpson D.A., Shields J.M., Ibrahim J.G., Thomas, N.E. Mechanisms of chromosomal instability in melanoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2014) 55: 457-471.
- Kerzendorfer C., O'Driscoll M. Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA Repair* (2009) 8: 1139-52.
- Khan N., Jeffers M., Kumar S., Hackett C., Boldog F. Khramtsov N., Qian X., Mills E., Berghs S.C., Carey N., Finn P.W., Collins L.S., Tumber A., Ritchie J.W., Jensen P.B., Lichenstein H.S., Sehested M. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* (2008) 409: 581-589.
- Kim J., Park H., Im J.Y., Choi W.S., Kim H.S. Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* (2007b) 27: 3285-3292.
- Kingston R.E., Narlikar G.J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes & Development* (1999) 13: 2339-2352.
- Kolodner R. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics & Development* (1999) 9: 89-96.
- Korolev V. Chromatin and DNA damage repair. *Russian Journal of Genetics* (2011) 47: 394-403.

- Kothapalli N., Sarath G., Zemleni J. Biotinylation of K12 in histone H4 decreases in response to DNA double-strand breaks in human JAr choriocarcinoma cells. *J Nutr* (2005) 135: 2337-2342.
- Kottemann M.C., Bale A.E. Characterization of DNA damage-dependent cell cycle checkpoints in a menin-deficient model. *DNA Repair* (2009) 8: 944-952.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* (2007) 128: 693705.
- Laat WL, and Hoelijmakers J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes and development* (1999) 13: 768-785.
- Lane A.A., Chabner B.A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* (2009) 27: 5459-5468.
- Lazzaro F., Giannattasio M., Puddu F., Granata M., Pellicoli A., Plevani P., Muzi-Falconi M. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair* (2009) 8: 1055-1067.
- Lee D.Y., Teyssier C., Strahl B.D., Stallcup M.R. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* (2005) 26: 147-170.
- Li G. DNA Mismatch Repair: Biological functions and molecular mechanisms, in Wei Q, and Chen D, (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer*. London, World Scientific (2007a) pp 87-117
- Li L. Nucleotide Excision Repair, in Wei Q, Chen D (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer*. London, World Scientific (2007b) pp 63-85.
- Li L., Zhang G., Zhang Y., Tan J., Huang H. Huang B., Lu J. Sodium butyrate-induced upregulation of p18(INK4C) gene affects K562 cell G(0)/G(1) arrest and differentiation. *Mol Cell Biochem* (2008) 319: 9-15.
- Lindahl T. Quality control by DNA Repair. *Science* (1999) 286: 1897-1905.
- Lu A., Zougman A., Pudelko M., Bebenek M., Ziolkowski P. Mann M., Wiśniewski J.R. Mapping of lysine monomethylation of linker histones in human breast and its cancer. *J Proteome Res* (2009) 8: 4207-4215.
- Luger K., Mäder A., Richmond R., Sargent D., Richmond T. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* (1997) 389: 251-260.
- Marchion D.C., Bicaku E., Daud A.I., Sullivan D.M., Munster P.N. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* (2005) 65: 3815-3822.
- Margueron R., Trojer P., Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* (2005) 15: 163-176.
- Martínez-López, W., Marotta, E., Di Tomaso, M., Méndez-Acuña, L., y Palitti, F. Distribution of UVC-induced chromosome aberrations along the X chromosome of TCR deficient and proficient Chinese hamster

- cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (2010) 701: 98-102.
- Martínez-López W., Méndez-Acuña L., Bervejillo V., Valencia-Payan J., Moreno-Ortega D. Chromatin Remodeling in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *DNA Repair - New Research Directions*. Intech Open. (2013).
- Matsuoka S., Huang M., Elledge S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* (1998) 282: 1893-1897.
- Méndez-Acuña L., Di Tomaso M.V., Palitti F., Martínez-López W. Histone post-translational modifications in DNA damage response. *Cytogenetic and Genome Research* (2010) 128: 28-36.
- Meschini R., Morucci E., Berni A., Martínez-López W., Palitti F. Role of chromatin structure modulation by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on the radio-sensitivity of ataxia telangiectasia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2015) 777: 52-59.
- Mohrmann L., Verrijzer C.P. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1681: 59-73.
- Mimitou E.P., Symington L.S. DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair* (2009) 8: 983-95.
- Modrich P. Strand-specific mismatch Repair in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry* (1997) 272: 24727-24730.
- Minucci S., Pelicci P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* (2006) 6: 38-51.
- Munshi A., Shafi G., Aliya N., Jyothy A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* (2009) 36: 75-88.
- Napper A. D., Hixon J., Mcdonagh T., Keavey K., Pons J.F., Barker J., Yau W.T., Amouzegh P., Flegg A., Hamelin E. Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem* (2005) 48: 8045-8054.
- Narlikar G.J., Fan H.-Y., Kingston R.E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* (2002) 108: 475-487.
- Nathan D., Ingvarsdottir K., Sterner D.E., Bylebyl G.R., Dokmanovic M. Dorsey J.A., Whelan K.A., Krsmanovic M., Lane W.S., Meluh P.B., Johnson E.S., Berger S.L. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* (2006) 20: 966-976.
- New M., Olzscha H., La Thangue N.B. HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Molecular oncology* (2012) 6: 637-656.

- Newman J.C., Bailey A.D., Weiner A.M. Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proceedings of National Academy of Sciences* (2006) 103: 9613-9618.
- Nioi P., Nguyen T., Sherratt P.J., PICKETT C.B. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* (2005) 25: 10895-10906.
- Ng H.H., Feng Q., Wang H., Erdjument-Bromage H., Tempst P. Zhang Y., Struhl K. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* (2002) 16: 1518-1527.
- Ng, H.H., Robert F., Young R.A., Struhl K. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* (2003) 11: 709-719.
- Orren D.K., Dianov G.L., Bohr V.A. The human CSB (ERCC6) gene corrects the transcription-coupled repair defect in the CHO cell mutant UV61. *Nucleic Acid Research*, (1996) 24: 3317-3322.
- Osley M.A., Tsukuda T., Nickoloff J.A. ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factors and DNA Damage Repair. *Mutat. Res.* (2007) 618: 65–80.
- Overmeer R. M., Moser J., Volker M., Kool H., Tomkinson A.E., van Zeeland A.A., Mullenders L.H.F., Fousteri M. Replication protein A safeguards genome integrity by controlling NER incision events. *The Journal of Cell Biology* (2011) 192: 401-415.
- Pennisi E. Behind the Scenes of Gene Expression. *Science* (2001) 293: 1064-1067.
- Peters D.M., Griffin J.B., Stanley J.S., Beck M.M., Zemleni J. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2002) 283: C878-884.
- Peterson C.L., Workman J.L. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Current Opinion in Genetics & Development* (2000) 10: 187-192.
- Pfeifer G.P. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and Photobiology* (1997) 65: 270-283.
- Proietti De Santis L., Garcia C.L., Balajee A.S., Calvo G.T.B., Bassi L., Palitti, F.. Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UV61 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B. *Mutation Research/DNA Repair* (2001) 485: 121-132.
- Proietti De Santis L., Garcia C.L., Balajee A.S., Latini P., Pichierri P., Nikaido O., Stefanini M., Palitti F. Transcription coupled repair efficiency determines the cell cycle progression and apoptosis after UV exposure in hamster cells. *DNA Repair* (2002) 28: 209-23.
- Proietti De Santis L., Drane P., Egly J.M. Cockayne Syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO Journal* (2006) 25:1915-1923.



- Ramamathan B., Smerdon M.J. Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 11026-11034.
- Rangasamy D., Berven L., Ridgway P., Tremethick D.J. Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *Embo J* (2003) 22: 1599-1607.
- Rastogi R.P., Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids* (2010) 2010: 592-980.
- Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* (2000) 406: 593-599.
- Robertson K.D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T., Wade P.A., Jones P.L. Wolffe A.P. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F- responsive promoters. *Nat Genet* (2000) 25: 338-342.
- Rodriguez-Collazo P., Leuba S.H., Zlatanova J. Robust methods for purification of histones from cultured mammalian cells with the preservation of their native modifications. *Nucleic Acids Research* (2009) 37, e81.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* (1999) 146: 905-916.
- Rouaux C., Loeffler J.P., Boutillier A.L. Targeting CREB-binding (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochemical Pharmacology* (2004) 68:1157-1164.
- Rubbi C.P., Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO Journal* (2003) 22: 975-986.
- Sanders S.L., Portoso M., Mata J., Bahler J., Allshire R.C., Kouzarides T. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* (2004) 119: 603-614.
- Selby C.P., Sancar A. Human transcriptio-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry* (1997) 272: 1885-1890.
- Shen Z., Nickoloff J. Mammalian homologous recombination repair and cancer intervention. In Wei Q, Chen D (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer* London, World Scientific (2007) pp 119-156.
- Shimada K., Oma Y., Schleker T., Kugou K., Ohta K., Harata M., Gasser, S.M. Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol* (2008) 18: 566-575.
- Slingerland M., Guchelaar H.-J., Gelderblom H. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anti-Cancer Drugs* (2014) 25: 140-149.

- Smerdon M.J., Lieberman M.W. Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1978) 75: 4238-41.
- Smerdon M.J. DNA repair and the role of chromatin structure. *Current opinion in cell biology* (1991) 3: 422-428.
- Sonoda E., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA repair* (2006) 5: 1021-1029.
- Steger D.J., Lefterova M.I., Ying L., Stonestrom A.J., Schupp M., Zhuo D., Vakoc A.L., Kim J.E., Chen J., Lazar M.A., Blobel G.A., Vakoc C.R. DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* (2008) 28: 2825-2839.
- Stevnsner T., Muftuoglu M., Aamann M.D., Bohr V.A. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech. Ageing Dev.* (2008) 129: 441-448.
- Sudarsanam P., Winston F. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* (2000) 16: 345-351.
- Thoma F. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. [EMBO Journal](#) (1999) 18: 6585-6598.
- Thoma F. Repair of UV lesions in nucleosomes--intrinsic properties and remodeling. *DNA Repair* (2005) 4: 855-69.
- Thompson L.H., Mitchell D.L., Regan J.D., Bouffler S.D., Stewart S.A., Carrier W.L., Nairn R.S., Johnson R.T. CHO mutant UV61 removes (6-4) photoproducts but not cyclobutane dimers. *Mutagenesis* (1989) 4: 140-146.
- Thompson L.H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2012) 751: 158-246.
- Tóth K.F., Knoch T.A., Wachsmuth M., Frank-Stöhr M., Stöhr M., Bacher C.P., Müller G., Rippe K. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *Journal of Cell Science* (2004) 117: 4277-4287.
- Ura K., Araki M., Saeki H., Masutani C., Ito T., Iwai S., Mizukoshi T., Kaneda Y., Hanaoka F. ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes. *EMBO J* (2001) 20: 2004-2014.
- Ura K., Hayes J.J. Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur. J. Biochem.* (2002) 269, 2288-2293.
- Venkatesh S., Workman J. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature reviews Molecular Cell Biology* (2015) 16: 178-189.

- Verreault A., Kaufman P.D., Kobayashi R., Stillman B. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* (1998) 8: 96-108.
- Vettese-Dadey M., Grant P., Hebbes T., Crane-Robinson C., Allis C., Workman J. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *The EMBO Journal* (1996) 15: 2508-2518.
- Wang H.P., Long X.H., Sun Z.Z., Rigaud O., Xu Q.Z., Huang Y.C., Sui J.L., Bai B., Zhou P.K. Identification of differentially transcribed genes in human lymphoblastoid cells irradiated with 0.5 Gy of gamma-ray and the involvement of low dose radiation inducible CHD6 gene in cell proliferation and radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* (2006a) 82:181-90.
- Wang H., Zhai L., Xu J., Joo H.-Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y. Histone H3 and H4 Ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 Ubiquitin Ligase Facilitates Cellular Response to DNA Damage. *Molecular Cell* (2006b) 22: 383-394.
- Whitehouse I., Rando O.J., Delrow J., Tsukiyama T. Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* (2007) 450: 1031-1035.
- Winston F., Carlson M. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* (1992) 8: 387-391.
- Witt O., Deubzer H.E., Milde T., Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* (2009) 277: 8-21.
- Wogan G.N., Hecht S.S., Felton J.S., Conney A.H., Loeb L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* (2004) 14: 473-486.
- Wolffe A.P. *Chromatin. Structure and Function (Third Edition)*. (1998) Academic Press.
- Wood R.D., Sgouros J., Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* (2001) 291: 1284-1289.
- Yang X., Zaurin R., Beato M., Peterson C.L. Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol* (2007) 14: 540-507.
- Yu Y., Teng Y., Liu H., Reed S.H., Waters R. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proceedings of National Academy of Sciences* (2005) 102: 8650–8655.
- Zhang Y., Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* (2001) 15: 2343-2360.
- Zhang H., Roberts D.N., Cairns B.R. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* (2005) 123: 219-31.
- Zhao W., Kruse J.P., Tang Y., Jung S.Y., Qin J., Gu W. Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* (2008) 451: 587-590.

Zhou B., Elledge S. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* (2000) 408: 433-439.

Zhu Q., Wani G., Arab H.H., El-Mahdy M.A., Ray A., Wani A.A. Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA Repair* (2009) 8: 262-273.

## 11. ANEXO

Wilner Martínez-López, Leticia Méndez-Acuña, Verónica Bervejillo, **Jonatan Valencia-Payan** and Dayana Moreno-Ortega (2013) Chromatin Remodeling in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. DNA Repair - New Research Directions. Intech Open. 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/54709>

---

# Chromatin Remodeling in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells

---

Wilner Martínez-López, Leticia Méndez-Acuña,  
Verónica Bervejillo, Jonatan Valencia-Payan and  
Dayana Moreno-Ortega

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/54709>

---

## 1. Introduction

The chromatin basic structure named nucleosome contains 147 DNA base pairs wound 1.65 times around an octamer of histone proteins which consist of two copies of H2A, H2B, H3, and H4, separated by linker regions of 20-110 nucleotides. Nucleosome assembly in the nucleus proceeds in two stages. At first, hetero-tetramer H3/H4 integrates into the DNA and at the second stage the heterodimer H2A/H2B is added. Nucleosomes are further condensed into 30 nm fibers through the incorporation of histone H1, located in the linker regions, achieving an additional 250-fold structural compaction in metaphase chromosomes. Nucleosome packaging restricts protein binding and obstructs DNA-templated reactions. Therefore, local modulation of DNA accessibility is necessary for the fundamental processes of transcription, replication and DNA repair to occur. In this sense, chromatin structure is not static but subject to changes at every level of its hierarchy. Nucleosomes are considered dynamic and instructive particles that are involved in practically all chromosomal processes, being subjected to highly ordered changes considered as epigenetic information, which modulates DNA accessibility [1, 2]. Nucleosomes exhibit three dynamic properties: a) covalent histone post-translational modifications, b) change of composition due to removal of histones and c) movement along DNA. The latter two are carried out by ATP-dependent chromatin remodeling complexes [3]. Histone post-translational modifications (PTMs) such as the addition of acetyl, methyl, phosphate, ubiquitin, and sumo groups change the properties of histones, modifying histone-DNA or histone-histone interactions [4]. Modifying complexes add or remove covalent modifications on particular residues of the N- and C-terminal domains of histone pro-

teins, altering the structure of chromatin and creating “flags” which can be recognized by different regulatory proteins. Many chromatin-associated proteins contain protein domains that bind these moieties such as the bromodomain that recognizes acetylated residues and chromodomains, Tudor, Plant Homeo Domain (PHD) fingers, Malignant brain tumor (MBT) domains that bind to methylated lysines or arginines [5].

In the regulation of gene expression a “code of histones” has been determined, where different PTMs allow the recruitment of different factors specifying determined functions on chromatin [2]. Certain histone modifications can even induce or inhibit the appearance of other modifications in adjacent aminoacidic residues [6]. ATP-dependent chromatin remodeling factors use ATP hydrolysis to slide or unwrap DNA. These multi-subunit complexes can also catalyze eviction of histone octamers to promote histone variant replacement [7]. Eukaryotic cells also contain alternative versions of the canonical histones, differing in the aminoacidic sequences. One of these isoforms is histone H2AX, which differs from the canonical H2A histone by the presence of a short C-terminal tail. Nucleosomes containing canonical histones are formed during replication, and non-canonical histones replace canonical ones in the course of DNA metabolic processes not associated with replication, such as transcription and repair. Other protein complexes participating in the process of nucleosome assembly/disassembly such as histones chaperones like the chromatin assembly factor 1 (CAF-1), composed by three subunits: p150, p60 and p48, which has been suggested to play a pivotal role in chromatin assembly after DNA replication and repair [8]. During DNA replication, CAF-1 complex binds to newly synthesized histone H3 and H4 and deposits the histone tetramers onto replicating DNA to form the chromatin precursor in a PCNA-dependent manner. The replicated precursor then serves as the template for deposition of either old or new histone H2A and H2B.

In response to both DNA damage and replication stress, a signal transduction cascade known as the checkpoint response is activated. This phenomenon is also referred to as the DNA damage response. It is becoming clear that DNA damage sensors can recognize the chromatin-associated signals of DNA damage. This information is then transmitted via signal transducers, including diffusible protein kinases, to effector molecules such as the checkpoint kinases that mediate the physiological response of the cell to DNA damage, which ultimately promotes efficient repair and cell survival. The primary target of this pathway is the arrest or slowing of the cell cycle, providing time for DNA repair to take place. Depending on the type of DNA damage induced, different repair mechanisms can be activated, such as non-homologous end joining and homologous recombination in case of double strand breaks induction and excision repair mechanisms in case of nucleotide or base damage. As for DNA transcription, a regulatory role of the epigenetic code in DNA repair has been proposed [3, 4, 9, 10]. Chromatin remodeling processes not only influence access to DNA but also serves as a docking site for repair and signaling proteins [7, 10-12]. Chromatin plays a pivotal role in regulating DNA-associated processes and it is itself subject of regulation by the DNA-damage response. In this chapter, we summarize the current knowledge on the involvement of chromatin remodeling processes in nucleotide excision repair in mammalian cells.

## 2. Chromatin structure after UVC-induced DNA damage

Endogenous and exogenous DNA damaging agents modify DNA. One of the most common environmental stresses that produce lesions in DNA is UV light. UVC irradiation induces cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts (6-4PP) which result in an abnormal DNA structure that signals the lesion [7], [13-15]. However, they can be distributed differently along the chromatin structure. CPDs are mainly found in the minor groove of DNA facing away from the histone surface and 6-4PPs are preferentially formed in linker DNA but can also be seen throughout the histone core region. This indicates that nucleosomes can actually confer partial protection against this type of DNA damage. Moreover, an *in vitro* study in specific sites with mono-nucleosomes showed that elimination of UVC-induced lesions is highly inhibited by nucleosomes [16, 17]. Chromatin plays a role not only in the spectrum of DNA damage formation but also in the repair of these lesions. In this respect, it has been shown that chromatin structure has an inhibitory effect on the repair of both CPDs and 6-4PPs [18]. For instance, excision activity in the nucleosome core center is nearly sevenfold lower than that in free DNA [15].

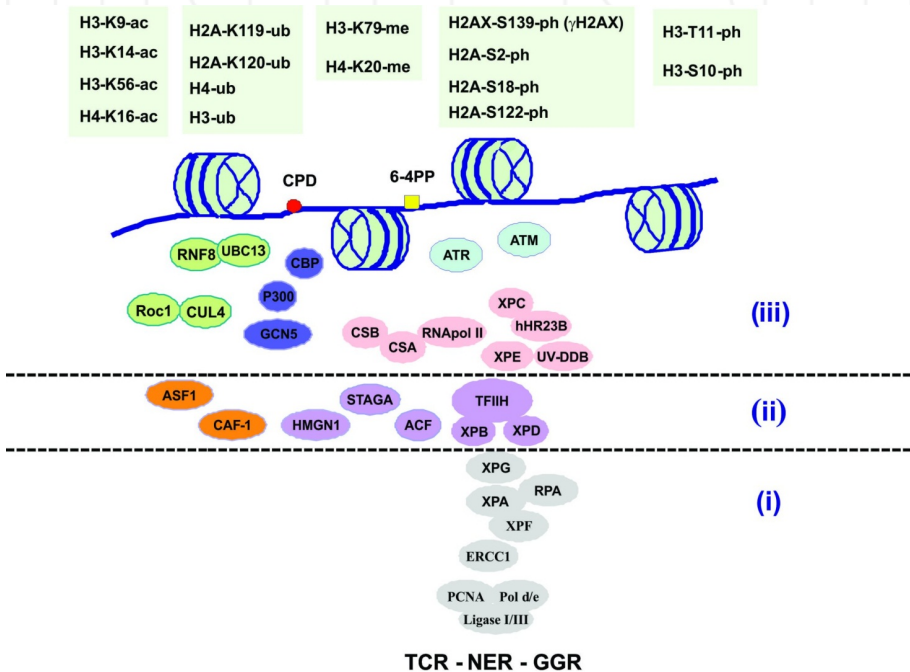
Access to these lesions in chromatin can be achieved mainly by the action of ATP-dependent chromatin remodeling factors and the addition of post-translational modifications on histones [19], which could facilitate their removal. However, like DNA repair enzymes, both chromatin remodeling proteins and histone modification factors require initial localization to damaged sites, but the mechanism by which UVC-damaged DNA in chromatin is recognized by these factors and how damaged from undamaged chromatin can be distinguished remain unclear. A recent study using reconstituted nucleosomes containing DNA with CPDs or 6-4PPs showed that the presence of these lesions does not affect the reconstitution of nucleosomes *in vitro*, but the dynamic equilibrium of DNA unwrapping-rewrapping around the nucleosome switches toward the unwrapped state. These *in vitro* experiments suggest that intrinsic nucleosome dynamics, specially increased unwrapping of the DNA around damaged nucleosomes, facilitate the access of factors involved in recognizing damage and/or those involved in chromatin remodeling. Therefore, once remodeling factors are recruited to the damaged nucleosomes, disruption of local chromatin structure could initiate the recruitment of the multiple repair proteins [14]. Nevertheless, it is important to take into account that *in vivo*, in the context of all chromatin factors, the recognition step of the photolesions may be more complex. Apart from the DNA distortion, other factors also actively contribute to reveal and mark lesion sites for recruitment of the repair machinery.

## 3. Nucleotide excision repair in chromatin

Nucleotide excision repair (NER) system is more efficient in naked DNA than in chromatin and it is inhibited by the presence of nucleosomes and heterochromatin, which limit the access of repair proteins to DNA [20]. Thus, for NER to recognize, excise and repair DNA damage efficiently, chromatin needs to be adapted [21]. Therefore, a chromatin rearrangement is a



necessary step in the access of repair proteins to DNA damage sites and led to the “access, repair, restore” model of NER in chromatin. This model suggests that early chromatin remodeling steps and/or intrinsic dynamic changes in chromatin may allow the access of repair complexes to damaged sites, followed by restoration of the original nucleosomal organization after DNA repair [1, 22]. In NER, lesions that are located in linker regions are more accessible for binding by the recognizing proteins. A plausible scenario for DNA repair implies that the lesion is recognized and eliminated in the most accessible sites for repair proteins. Therefore, nucleosome modification and initiation of chromatin relaxation around the repair site start at considerable distances from the initiation point of DNA repair. As a result, other lesions, particularly those in the core of nucleosomes, become more accessible. Thus, proteins responsible for recognizing UVC-induced DNA lesions can recognize and bind them even if they are located in the core of the nucleosome [23, 24].



**Figure 1.** Nucleotide excision repair in the chromatin context. Nucleotide damage induced by UVC (CPDs and 6-4-PPs) is represented on a 11 nm chromatin fiber. Main proteins acting during the cellular response to UVC-induced damage are presented: (i) key proteins implicated in nucleotide excision repair (NER) (TCR and GGR) in mammalian cells (grey); (ii) chromatin assembly or remodeling factors recruited by chromatin modifications (violet) and histone chaperons involved in NER (orange); (iii) sensor proteins belonging to TCR (CSA, CSB, RNApolII) or GGR (XPC-HHR23B, XPE-UV-DDB) (pink); and histone modifying enzymes responsible for post-translational covalent modifications (PTMs): histone acetyl transferases (HATs) (blue), enzymes that conjugate ubiquitin moieties (green) and kinases (light-blue). Known PTMs appearing in response to UVC-induced damage are highlighted in green on top of the figure. See text for more details concerning the activities of every protein. Ac: acetylation, Ph: Phosphorylation, Ub: ubiquitylation, K: lysine, S: serine, T: threonine.

NER removes a wide range of bulky DNA adducts that distort the double helix of DNA, including those induced by UVC. NER system can be divided into two pathways: transcriptional coupled repair (TCR) pathway, that repairs lesions that occur in transcriptionally active genes and global genome repair (GGR) that acts into lesions in non transcribed DNA [1, 25, 26]. Both pathways involves the action of about 20-30 proteins (Figure 1) in a “cut-and-paste-like” mechanism [26, 27] divided in five steps: a) lesion detection; b) recruitment of TFIIH-XPB-XPB complex, which directs DNA unwinding around the damaged nucleotide; c) recruitment of ERCC1- XPF, XPG, XPA and RPA that induce 5' and 3' breaks around the lesion and remove the damaged nucleotide; d) DNA synthesis directed by DNA polymerase  $\delta/\epsilon$ , PCNA and other accessory factors and e) strand ligation (ligase I/III) [1, 26]. Both pathways use the same cellular machinery in all steps except from lesion recognition. At this initial step, in TCR CSA and CSB direct the basic repair machinery to RNA polymerase II stalled at the lesion [28]. On the other hand, in GGR damage site recognition is carried out by XPC-hHR23B and UV-DDB/XPE complexes [13, 25, 29-31]. The defect in one of the NER proteins is the consequence of three rare recessive syndromes: Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and the photosensitive brittle hair disorder trichothiodystrophy (TTD) [26, 31, 32].

Apart from ATP-dependent chromatin remodeling factors and histone modifications, repair factors themselves could cause chromatin rearrangements. Particularly good candidates for this type of function in the NER system are the transcription-coupled repair factor CSB, which has homology to SWI/SNF chromatin remodeling proteins, and the TFIIH complex that contains the helicase subunits XPD and XPB [33]. However, a non-mutually exclusive suggestion is that global chromatin relaxation increases accessibility over the whole genome in response to damage in order to expose the individual damage sites for recognition [34]. After removal of the DNA lesion and completion of new DNA synthesis by DNA polymerase and DNA ligase, the original structure of chromatin is restored by the action of CAF-1 [22, 31]. The recruitment of mammalian CAF-1 is restricted to damaged sites and depends on NER, binding concomitantly with repair synthesis [8]. Chromatin restoration does not simply recycle histones, but also incorporate new histones and histones with distinct post-translational modifications into chromatin. For example, new histone H3.1, deposited during DNA replication, is incorporated into chromatin as a marker of sites of UVC-induced DNA damage repaired by NER [35].

#### 4. Histone covalent modifications in NER

One of the most important chromatin remodeling processes that occur during NER is histone covalent modification, which constitutes a reversible process. The most frequent histone tail modification is the histone acetylation/deacetylation process, which is controlled by histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC), determining either gene activation or inactivation, respectively. Meanwhile, histone methylation is carried out by histone methyl-transferases (HMT) and histone demethylases (HDM) are used for the reverse reaction.

Finally, kinases like ATR are responsible for histone phosphorylation, and histone ubiquitination is driven by histone ubiquitin ligases.

#### 4.1. Histone acetylation

The acetylation of the  $\epsilon$ -amino group of lysine (K) side chains is a major histone modification involved in numerous cellular processes, such as transcription and DNA repair. Acetylation neutralizes the lysines positive charge and this action may consequently weaken the electrostatic interactions between histones and DNA. Thus, acetylated histones could enhance chromatin accessibility by reducing the attractive force between the nucleosome core and negatively charged DNA. For this reason, histone acetylation is often associated with a more "open" chromatin conformation. UVC irradiation induces global and local changes in chromatin structure in order to increase accessibility for repair proteins and hence a proper NER occurs [34]. Early studies demonstrated that acetylated nucleosomes enhance NER efficiency [36]. In this respect, UVC-induced acetylation of H3 K9 and H4 K16 has been observed [37, 38]. H3 K9 acetylation after UVC irradiation requires the recruitment of the transcription factor E2F1, which interacts with the HAT GCN5. In fact, inactivation of GCN5 in human cells decreases recruitment of NER factors to damaged sites, which demonstrates that GCN5 is important for a timely and efficient NER [38]. Besides, UV-DDB complex (DDB1–DDB2) recruits two HATs, such as CBP/p300 and STAGA (a SAGA-like complex containing GCN5L) [39, 40], whose activities induce chromatin remodeling to allow recruitment of the repair complexes at the UVC-induced damage sites. By the same token, it has also been observed that p33ING2, a member of the inhibitor of growth (ING) family proteins, enhances NER in a p53-dependent manner by inducing chromatin relaxation following UVC irradiation, increased acetylation of histone H4 and recruitment of NER factors to sites of damage [41]. Actually, it has also been observed that CBP/p300 is recruited to UVC damaged sites in a p53-dependent manner via its interaction with CSB, accompanied by an increase in H3 acetylation [34, 42]. Hence, increased histone acetylation at the NER site is likely to contribute to the p53-induced chromatin relaxation that is induced by DNA damage, suggesting that the function of UVC-induced histone acetylation is to promote opening up on the chromatin to facilitate repair. However, employing the *in situ* nick translation technique, we have observed that chromatin decondensation is also induced in p53 mutant Chinese hamster (CHO) cell lines, either proficient or deficient in TCR (simile Cockayne's Syndrome B or CSB cells), and that this chromatin decondensation process is related to histone acetylation (data not published yet). Actually, it seems that the extent and type of histone acetylation may vary depending on the structure of chromatin associated with repair sites and the type of NER pathway (GGR or TCR). On the other hand, we have demonstrated in Chinese hamster chromosomes that acetylated histone H4 regions are preferred sites for radiation- and endonucleases-induced chromosome lesions [43, 44]. Altogether, these results could indicate that certain chromatin modifications can take place independently of NER, acting as a signal for the recruitment of chromatin remodeling factors. Moreover, it has been proposed that H3 K56 deacetylation is an early event triggered by DNA damage upon UVC irradiation in mammalian cells [45]. According to this, DNA damage results in the prompt deacetylation of H3 K56, which contribute to the recruitment of different factors including chromatin remodelers to relax the chromatin structure for

allowing easy access to the NER complex and cell cycle checkpoints. Upon successful completion of DNA repair, the histone chaperone anti-silencing function1A (ASF1A) is recruited in an ATM-dependent manner, facilitating the recruitment of HATs needed for the restoration of native H3 K56 acetylation status, but the molecular mechanism of ASF1A recruitment is not clear yet [45]. Finally, High mobility group protein B1 (HMGB1), a multifunctional protein that, influences chromatin structure and remodeling by binding to the internucleosomal linker regions in chromatin [46] and facilitating nucleosome sliding [47], has been shown to affect DNA damage-induced chromatin remodeling. It was observed that after UVC irradiation of the HMGB1 knockout MEFs cells, their ability to remove UVC-induced DNA damage and the increasing of histone acetylation was significantly affected [48]. This distortion may assist the NER system in recognizing the damage [49] and facilitating repair of the lesion. HMGB1 also affects chromatin remodeling after DNA damage, so its binding to the lesion could increase the accessibility of repair factors to the site of DNA damage.

#### **4.2. Histone phosphorylation**

The phosphorylation of serine (S), threonine (T), and tyrosine (Y) residues has been documented on all core and most variant histones. Phosphorylation alters the charge of the protein, affecting its ionic properties and influencing the overall structure and function of the local chromatin environment [50]. Although there is no evidence that PI3K enzymes could be activated by DNA lesions repaired by NER, when DNA replication fork is stalled, NER protein foci are formed, creating single strand breaks (SSBs) which can be covered by RPA/ATRIP and activate the kinase activity of ATR [51]. However, these NER intermediates (SSBs arising from excised lesions) can activate ATR, even outside S-phase [52]. Several histone phosphorylation changes after UVC irradiation have been observed, such as H2AX histone variant which is phosphorylated at S139 (named gamma-H2AX) [52]. H2AX phosphorylation upon UVC in non-S-phase cells depends on ATR and active processing of the lesion by the NER machinery [53], suggesting that NER-intermediates trigger this response. The notion that gamma-H2AX formation occurs in response to NER and that NER is proficient in H2AX-deficient cells, suggests that this modification mainly plays a role in checkpoint activation during the repair of UVC lesion. Besides, S2, S18 and S122 H2A residues play important roles in survival following UVC exposure [54]. Two aminoacidic residues of histone H3, S10 and T11, appear to be a target of differential phosphorylation during NER. H3 S10 and H3 T11 in mouse are dephosphorylated by UVC irradiation and rephosphorylated after DNA damage repair. Hypophosphorylation of H3 S10 and H3 T11 are associated with transcription repression, and this histone modification might be one of the mechanisms that cells employ to inhibit transcription at UVC-damaged sites [25].

#### **4.3. Histone methylation**

Histone methylation is carried out by a group of enzymes called histone methyltransferases HMT, which covalently modify the lysine and arginine (R) residues of histones by transferring one, two or three methyl groups to the  $\epsilon$ -amino group of lysine residues or to the guanidino group of arginine residues [6]. Methylation, unlike acetylation and phosphorylation, does not

alter the overall charge of histones. Histone methylation in combination with acetylation creates specific modification signatures which can influence transcription [55, 56]. Lysine methylation has a different impact on transcription, depending on the positions and degree of methylation (mono-, di-, tri-methylation). Methylation of H3 lysine (H3 K4 and 36) is associated with transcribed domains, whereas methylation of H3 K9, H3 K27 and H4 K20 appears to correlate with transcriptional repression. Human Chd1 binds to methylated H3 K4 through its tandem chromodomains, linking the recognition of histone modifications to non-covalent chromatin remodeling [57]. In contrast, methylated H3 K9 and H3 K27 are recognized by heterochromatin protein 1 (HP1) and polycomb repressive complexes (PRC). Different from histone acetylation, which has been known to be implicated in NER for a long time, histone methylation was found to be implicated in NER recently [58, 59]. The knockdown of the best known methyltransferase of histone H3 K79 (called Dot1 in yeast or DOT1L in mammals), results in complete loss of methylation on this site either in yeast [60], flies [61] or mice [62]. In mammalian cells, several enzymes target histone H4 K20 methylation. Mouse cells lacking the Suv4-20h histone methyltransferase have only mono-methylated but essentially no di- and tri-methylated H4 K20. These mutant mouse cells are sensitive to DNA damaging agents, including UV and defective in repair of DSBs [63]. However, if methylation of histone H4 K20 also plays a role in NER is unknown. Moreover, there is not much knowledge about its role in DNA repair in mammalian cells. Finally, it has not been determined yet if global histone methylation levels change in response to DNA damage, although it is well known that they affect cell cycle checkpoints through interactions with checkpoint components.

#### 4.4. Histone ubiquitination

All of the previously described histone modifications result in relatively small molecular changes in the amino acid side chains. In contrast, ubiquitination results in a much larger covalent modification. Ubiquitin itself is a 76-amino acid polypeptide that is attached to histone lysines via the sequential action of three enzymes, E1-activating, E2-conjugating and E3-ligating enzymes [6]. Histones H2B, H3 and H4 are constitutively ubiquitinated, but at very low levels (0.3% of the total H3, 0.1% for H4) [64]. In an effort to purify and characterize histone ubiquitin ligases, it was found an ubiquitin ligase activity capable of ubiquitinating all histones *in vitro* [65]. The ligase was later characterized as CUL4–DDB–ROC1 complex, an enzyme that is known for ubiquitinating DDB2 and XPC at UVC damaged sites [66, 67]. A small fraction of histone H3 and H4 (0.3% and 0.1%, respectively) is found ubiquitinated *in vivo* and siRNA mediated knockdown of CUL4A, B and DDB1 decreases the H3 and H4 ubiquitination levels. In addition, the dynamics of CUL4–DDB–ROC1-mediated H3 and H4 ubiquitination is similar to that of XPC. Actually, further biochemical studies indicate that the H3 and H4 ubiquitination weakens the interaction between histones and DNA, and facilitates the recruitment of XPC repair factor to damaged DNA [65]. These studies point out the role of H3 and H4 ubiquitination in chromatin disassembly at the sites of UVC lesions. However Takedachi et al. [68] found that ubiquitination of H3 and H2B by the CUL4A complex was not sufficient to destabilize the nucleosome and proposed that ubiquitination around damaged sites functions as a signal that enhances the recruitment of XPA repair protein to lesions. Moreover, as well as H2B, H3 and H4, H2A displays some constitutive ubiquitination being the primary targets

K119 and K120. H2A ubiquitination by UBC13/RNF8 ubiquitin ligase complex also occurs at the sites of UVC-induced DNA damage [69]. Depletion of these enzymes causes UVC hypersensitivity, without affecting NER, suggesting that UBC13 and RNF8 are involved in the UVC-induced DNA damage response. It has also been reported the recruitment of uH2A to sites of DNA damage as a post-excision repair event, in which transiently disrupted chromatin is restored through repair synthesis-coupled chromatin assembly [31], showing that the formation of uH2A foci do not involve pre-incision events mediated by Cul4A-DDB ubiquitin ligase, but require successful NER through either GGR or TCR subpathway. In this respect, it was recently shown that monoubiquitination of H2A K119 and K120 by DDB1-CUL4B<sup>DDB2</sup> is critical for destabilization of the photolesion-containing nucleosomes, leading to eviction of H2A from the nucleosome, and that the partial eviction of H3 from the nucleosomes also depends on ubiquitinated H2A K119/K120. Furthermore, nucleosomal structure has consequences for the binding of E3 ligase complex; polyubiquitinated DDB2 is only released from the destabilized nucleosome, presumably releasing space around the lesion to load the NER pre-incision complex and proceed with repair. These results reveal how post-translational modification of H2A at the site of a photolesion initiates the repair process, which affects the stability of the genome [70].

## 5. ATP-dependent chromatin remodeling during NER

Chromatin remodeling complexes (CRCs) in contrast to PTMs utilize the energy of ATP to disrupt nucleosome DNA contacts, move nucleosomes along DNA and remove or exchange nucleosomes [71]. Thus, they make DNA/chromatin available to proteins that need to access DNA or histones during cellular processes [72]. A large array of different chromatin-remodeling complexes has been identified, which play important roles in controlling gene expression by regulating recruitment and access of transcription factors [73]. ATP-dependent chromatin remodelers belong to the SWI2/SNF2 (switching/sucrose non fermenting) superfamily and can be divided into several subfamilies on the basis of their ATPase domain structure and protein motifs outside the ATPase domain [74]. Among the different complexes identified in different species, four structurally related families have been described: SWI/SNF (switching defective/sucrose non fermenting), INO80 (inositol requiring 80), CHD (chromodomain, helicase, DNA binding) and ISWI (imitation SWI). Each family is defined by its characteristic catalytic ATPase core enzyme from the SWI2/SNF2 [5]. The essential role of these enzymes is reflected in the fact that many of them are required for diverse but specific aspects of embryonic development including pluripotency, cardiac development, dendritic morphogenesis and self-renewal of neural stem cells. However, in adults, deletion or mutation of these proteins often leads to apoptosis or tumorigenesis as a consequence of dysregulated cell cycle control. In recent years, it has become clear that ATP-dependent chromatin remodeling factors not only are involved in transcription regulation, but also play an important role in a number of DNA repair pathways including double strand break repair, base excision repair as well as nucleotide excision repair (NER) [71]. UVC damage itself enhances unwrapping of nucleosomes, which normally exist in a dynamic equilibrium between wrapping and unwrapping [75]. This

enhanced “DNA breathing” may assist the repair of lesions in chromatin by increasing the time window for repair factor access and their binding to lesions might further unwrap the DNA [14]. ATP-dependent chromatin remodeling may play a role in opening the chromatin structure for access during DNA damage repair, facilitating the early step of NER in the recognition of the damage [76]. In this respect, three SWI2/SNF2 subfamilies have been implicated in the cell response to UVC radiation as it is shown in Table 1 [71, 77]. Several factors have been implicated on stimulating the repair of UVC-induced DNA damage by increasing chromatin accessibility. Numerous studies showed that there is an association between histone hyperacetylation and chromatin relaxation in response to UVC-irradiation that enhances NER [76]. GCN5-mediated acetylation of histone H3 contribute to the recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex via the bromodomains of BRG1 or hBRM [38]. CSB/ERCC6, one of the major TCR proteins, contains a SWI2/SNF2 ATPase domain, which is essential for recruitment of the protein to chromatin [78]. CSB is able to remodel chromatin *in vitro* in an ATP-dependent manner and is required for the recruitment of NER factors to sites of TCR [42, 79], suggesting that repair enzymes and remodeling complexes may work in concert to allow access of DNA lesions to the repair machinery.

FAMILY	COMPLEX	ATPase	ROLE IN NER
SWI/SNF	BAF	SMARCA4/BRG1, SMARCA2/BRM	Stimulates the removal of 6–4PPs and CPDs in a UVC-dependent histone H3 hyperacetylation manner [71]
	PBAF	SMARCA4/BRG1, SMARCA2/BRM	
INO80	INO80	INO80	Promotes the removal of UVC lesions (CPDs,6–4PPs) by NER in not transcribed regions [71]
	TRRAP/Tip601	EP400/p400	
ISWI	ACF	SMARCA5/hSNF2H	Not fully understood [71]
	CHRAC	SMARCA5/hSNF2H	
	WICH	SMARCA5/hSNF2H	
	NURF	SMARCA1/hSNF2L	
OTHER	ERCC6/CSB		Remodels chromatin <i>in vitro</i> in an ATP-dependent manner. Required for the recruitment of NER factors to sites of TCR [73]

**Table 1.** Mammalian ATP-dependent chromatin remodeling complexes identified as taking part in nucleotide excision repair.

## 5.1. SWI/SNF

The SWI/SNF chromatin-remodeling complex plays essential roles in a variety of cellular processes including differentiation, proliferation and DNA repair. Loss of SWI/SNF subunits has been reported in a number of malignant cell lines and tumors, and a large number of experimental observations suggest that this complex functions as a tumor suppressor [80]. Interestingly, inactivation of the SWI/SNF-like BRG1/BRM-associated factors (BAF) complexes renders human cells sensitive to DNA damaging agents, such as UVC and ionizing radiation [81]. The mammalian SWI/SNF complexes contain either of two ATPase subunits, BRM (brahma) or BRG1 (Brahma Related Gene). Both of them form a discrete complex by interacting with other BAFs and may have distinct roles in cellular processes [65, 81].

Several studies have indicated that the SWI/SNF complex plays an essential role in the removal of UVC-damage by NER [82]. In mammals, the SWI/SNF ATPase subunit BRG1/SMARCA4 stimulates efficient repair of CPDs but not of 6-4PPs. For Example, BRG1 interacts with XPC and it is recruited to an UVC lesion in a DDB2 [83] and XPC [76] dependent manner. BRG1, in turn, modulates UVC-induced chromatin remodeling and XPC stability and subsequently promotes damage excision and repair synthesis by facilitating the recruitment of XPG and PCNA to the damage site [76], suggesting the essential role of Brg1 in prompt elimination of UVC-induced DNA damage by NER in mammalian cells. Finally, BRG1 may also transcriptionally regulate the UVC-induced G1/S checkpoint, as loss of BRG1 leads to increased UVC-induced apoptosis [81]. Besides BRG1, the mammalian SWI/SNF subunit SNF5/SMARCB1 also interacts with XPC. Inactivation of SNF5 causes UVC hypersensitivity and inefficient CPD removal [82]. Intriguingly, BRG1/BRM, but none of the other subunits, is also important to the UVC response in germ cells, suggesting that the involvement of individual SWI/SNF subunits may differ between cell types. Interestingly, UVC hypersensitivity resulting from BRG1 inactivation depends on the presence of the checkpoint protein TP53, extending the complexity of the involvement of BRG1 in UVC-induced DNA damage response [83]. Several lines of evidence suggest that recruitment of factors like SWI/SNF and their functional participation help to recruit downstream factors for processing DNA damage.

## 5.2. INO80

The INO80 family of CRCs function in a diverse array of cellular processes, including DNA repair, cell cycle checkpoint and telomeric stability [84, 85]. The INO80 complex also contains three actin-related proteins (ARPs). ARP5 and ARP8 are specific to the INO80 complex. Deletion of either INO80-specific ARP compromises the ATPase activity of the remaining complex and gives rise to DNA-damage-sensitive phenotypes indistinguishable to the INO80 null mutant [86]. Purification of human INO80 revealed a complex with virtually identical core components and a role in transcription [87, 88], indicating that the INO80 complex is highly conserved within eukaryotes [89]. The role for various remodeling activities is likely to promote the timely repair of lesions, rather than being an essential component for lesion removal. For example, some observations suggest that loss of remodeling activity leads to attenuation of photolesion repair, but not a complete impairment. Thus, it supports the idea that INO80 carry out an important chromatin remodeling activity for an efficient NER [74].



The link between INO80 and NER function may reflect the underlying mechanism for the UVC hypersensitivity of INO80 mutant cells and the broadening connections between chromatin remodeling and DNA repair in general [89]. The mammalian INO80 complex functions during earlier NER steps facilitating the recruitment of early NER factors such as XPC and XPA and, in contrast to yeast, it localizes to DNA damage independently of XPC [89]. Furthermore, INO80 facilitates efficient 6-4PPs and CPDs removal and together with the Arp5/ ACTR5 subunit, interacts with the NER initiation factor DDB1, but not with XPC. These discrepancies may reflect interspecies differences, but may also point out multiple functions of INO80 chromatin remodeling during NER that are experimentally difficult to dissect. INO80 may function to facilitate damage detection as well as to restore chromatin after damage has been repaired [5]. A recent study shows that the INO80 complex plays an important role in facilitating NER by providing access to lesion processing factors, suggesting a functional connection between INO80-dependent chromatin remodeling and NER [89].

### 5.3. ISWI

ISWI complexes are a second major category of ATP-dependent chromatin remodeling complexes. In mammals, two ISWI-homologs, named SNF2H and SNF2L, have been described. While most of the complexes contain SNFH; up to now, SNF2L has only been found in the human NURF complex [90, 91]. Subunits related to ACF1 are similar to these ISWI-containing remodeling complexes, which contain PHD and bromodomains [92]. Snf2h is a gene essential for the early development of mammalian embryos, suggesting that ISWI complexes [93] may be required for cell proliferation [94]. Besides, ISWI cooperates with histone chaperones in the assembly and remodeling of chromatin [95]. These complexes accumulate at sites of heterochromatin concomitant with their replication, suggesting a role for ISWI chromatin remodeling functions in replication of DNA in highly condensed chromatin [96]. ISWI complexes also may have a role in facilitating repair and recombination of DNA in chromatin. Several experiments have suggested that ISWI-mediated chromatin remodeling also functions to regulate NER, although its precise role remains unknown [5]. Moreover, SNF2H interacts with CSB [97], and the ACF1 subunit is recruited to UVC-induced DNA damage [98]. Knockdown of the mammalian ISWI ATPase SNF2H/SMARCA5 or its auxiliary factor ACF1/BAZ1A also leads to mild UVC sensitivity [99]. However, further experimental evidence is required to understand how ISWI chromatin remodeling functions in the UVC-DNA damage response.

## 6. Discussion and perspectives

When DNA is damaged, the chromatin, far from acting as an inhibitory barrier to lesion removal, can actively signal its presence, promoting the overall physiological response of the cell to damage, which stimulates the removal of the DNA damage itself. By the same token, the most challenging step in NER is the recognition of DNA lesions in their chromatin context. Nucleosomes on damaged DNA inhibit efficient NER and a functional connection between chromatin remodeling and the initiation steps of NER has been described [18].

In this respect, the relevance of the histone acetylation balance and some ATP-dependent chromatin remodeling complexes to facilitate the early damage-recognition step of NER has been demonstrated, since changes in chromatin conformation could interfere with the correct interactions between repair proteins and DNA lesions which are immersed in a dynamic chromatin structure [38, 76, 100]. Besides, neuronal survival has been related to the balance between HAT and HDAC activities [101]. For example, it has been shown that in the presence of histone deacetylase inhibitors, normal neuron cells increase the frequency of apoptosis. Moreover, in transgenic mice, carrying neurodegeneration diseases characterized by histone hypoacetylation, their neurodegeneration phenotypes can be diminished in the presence of HDAC inhibitors [102, 103]. By the same token, alterations in the acetylation/deacetylation balance by changes in HATs or HDACs activities have been associated with the development of different cancers [104].

Another interesting issue in favor of the relevance of chromatin remodeling is the fact that transcription coupled repair (TCR) seems not to be responsible for the higher UVC sensitivity evidenced through the increased frequency of chromosomal aberrations observed in Cockayne's Syndrome (CS) simile cells exposed to UVC [105]. In this respect, we have found that chromosome breakpoints were distributed more random in CS simile cells than in normal ones instead of being concentrated on the transcribed chromosome regions as expected [106]. Since DNA accessibility for DNA repair proteins is limited in nucleosomes [16, 75], different chromatin organization after UVC exposure in CS simile cells could influence the distribution of CPDs in eu- and heterochromatic regions as well as their removal by TCR, leading to increased frequencies of chromosomal aberrations in these cells.

Although many of the chromatin remodeling factors observed in yeast have also been found in mammals, different functions have been attributed to some of them (i.e. H3K56 acetylation and INO80 mentioned previously), indicating that in spite of being quite well evolutionary conserved, they could have another function in mammals. Moreover, due to the multifunctional role of chromatin remodeling complexes become still very difficult to arise questions such as by which mechanism the damage is sensed or how the cell is able to choose a particular repair pathway, by which mechanisms chromatin remodelers are directed to a specific repair pathway or by which mechanisms chromatin reassembly takes place. Therefore, it is clear that we just begin to understand the DNA repair in the context of chromatin and, therefore, further work it is needed to elucidate either the individual functions or the coordinated activities of chromatin remodeling in all DNA repair pathways.

## Abbreviations and acronyms

6-4PP	Pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts
ARPs	Actin-related proteins
ASF1A	Histone chaperone anti-silencing function1A
ATM	Ataxia telangiectasia mutated

ATR	Ataxia-telangiectasia Rad3-related
ATRIP	ATR interacting protein
BAF	BRG1/BRM-associated factors
BRG1	Brahma Related Gene
BRM	Brahma
CAF-1	Chromatin assembly factor 1
CBP	Creb-binding protein
CPDs	Cyclobutane pyrimidine dimers
CRCs	Chromatin remodeling complexes
CS	Cockayne syndrome
CSB	Cockayne syndrome group B protein
CUL4-DDB-ROC1	Culin 4- DNA damage-binding protein- RING finger protein
CHD	Chromodomain
CHO	Chinese hamster cell lines
E2F1	Transcription factor
ERCC1	Excision repair cross complementing 1
ERCC6	Excision repair cross complementing 6
GCN5	General control non-derepressible 5
GGR	Global genome repair
HAT	Histone acetyltransferases
HDAC	Histone deacetylases
HDM	Histone demethylases
hHR23B	Human homologue of the yeast protein RAD23
HMGB1	High mobility group protein B1
HMT	Histone methyl-transferases
HP1	Heterochromatin protein 1
ING	Inhibitor of growth
INO80	Inositol requiring 80
ISWI	Imitation SWI
K	Lysine
MBT	Malignant brain tumor
NER	Nucleotide excision repair
NURF	Nucleosome remodeling factor
p300	Histone acetyltransferase named p300
p53	Tumor suppressor p53 gene
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PHD	Plant Homeo Domain
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PTMs	Histone post-translational modifications
R	Arginine
RNF8	Ring finger protein 8
RPA	Replication protein A
S	Serine
SMARCA4	Transcription activator BRG1

SNF2H and SNF2L	ISWI-homologs
SNF5/SMARCB1	Mammalian SWI/SNF subunit
SSBs	Single strand breaks
STAGA	SAGA-like complex containing GCN5L
SWI/SNF	Switching defective/sucrose non fermenting
SWI2/SNF2	Switching/sucrose non fermenting
T	Threonine
TCR	Transcriptional coupled repair
TFIIH	Transcription factor II H
TP53	Tumor suppressor protein 53
TTD	Trichothiodystrophy
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme
UVC	Ultraviolet light C
UV-DDB	UV-damaged DNA binding protein consisting of two subunits (DDB1 and DDB2)
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA	Xeroderma Pigmentosum group A
XPB	Xeroderma Pigmentosum group B
XPC	Xeroderma Pigmentosum group C
XPD	Xeroderma Pigmentosum group D
XPE	Xeroderma Pigmentosum group E
XPF	Xeroderma Pigmentosum group F
XPG	Xeroderma Pigmentosum group G
Y	Tyrosine

## Acknowledgements

This work was partially supported by the Program of Development of the Basic Sciences (PEDECIBA) from Uruguay. W M-L was supported by a Marie Curie Fellowship from the Frame Program Seven (EC-FP7) of the European Community. L M-A was supported by a Post-graduate fellowship of the National Agency of Research and Innovation (ANII) from Uruguay.

## Author details

Wilner Martínez-López\*, Leticia Méndez-Acuña, Verónica Bervejillo,  
Jonatan Valencia-Payan and Dayana Moreno-Ortega

\*Address all correspondence to: [wlopez@iibce.edu.uy](mailto:wlopez@iibce.edu.uy)

Epigenetics and Genomics Instability Laboratory, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay

## References

- [1] Nag R, Smerdon MJ. Altering the chromatin landscape for nucleotide excision repair. *Mutation research* 2009; 682(1):13-20.
- [2] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403(6765):41-45.
- [3] Hassa PO, Hottiger MO. An epigenetic code for DNA damage repair pathways? *Biochemistry and cell biology* 2005; 83(3):270-285.
- [4] Loizou JI, Murr R, Finkbeiner MG, Sawan C, Wang ZQ, Hecceg Z. Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair. *Cell Cycle* 2006; 5(7):696-701.
- [5] Lans H, Marteijn JA, Vermeulen W. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & chromatin* 2012; 5:4.
- [6] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 2011; 21(3):381-395.
- [7] Ataian Y, Krebs JE. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochemistry and cell biology* 2006; 84(4):490-494.
- [8] Green CM, Almouzni G. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *The EMBO journal* 2003; 22(19):5163-5174.
- [9] Karagiannis TC, El-Osta A. Chromatin modifications and DNA double-strand breaks: the current state of play. *Leukemia* 2007; 21(2):195-200.
- [10] Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen AK, Henriques JA. What histone code for DNA repair? *Mutation research* 2008; 658(3):259-270.
- [11] Méndez-Acuña L, Di Tomaso M, Palitti F, Martínez-López W. Histone post-translational modifications in DNA damage response. *Cytogenetic and genome research* 2010; 128(1-3):28-36.
- [12] Tjeertes JV, Miller KM, Jackson SP. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *The EMBO journal* 2009; 28(13):1878-1889.
- [13] Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin Structure Following UV-Induced DNA Damage-Repair or Death? *Int J Mol Sci* 2011; 12(11):8063-8085.
- [14] Duan MR, Smerdon MJ. UV damage in DNA promotes nucleosome unwrapping. *J Biol Chem* 2010; 285(34):26295-26303.
- [15] Korolev V. Chromatin and DNA damage repair. *Russian Journal of Genetics* 2011; 47(4): 394-403.
- [16] Thoma F. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J* 1999; 18(23):6585-6598.

- [17] Hara R, Mo J, Sancar A. DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol Cell Biol* 2000; 20(24):9173-9181.
- [18] Ura K, Araki M, Saeki H, Masutani C, Ito T, Iwai S, Mizukoshi T, Kaneda Y, Hanaoka F. ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes. *EMBO J* 2001; 20(8):2004-2014.
- [19] Allis CD. Epigenetics. Cold Spring Harbor, N. Y.: CSHL Press; 2007.
- [20] Gong F, Kwon Y, Smerdon MJ. Nucleotide excision repair in chromatin and the right of entry. *DNA Repair (Amst)* 2005; 4(8):884-896.
- [21] Reed SH. Nucleotide excision repair in chromatin: damage removal at the drop of a HAT. *DNA Repair (Amst)* 2011; 10(7):734-742.
- [22] Green CM, Almouzni G. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO reports* 2002; 3(1):28-33.
- [23] Ura K, Hayes JJ. Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem* 2002; 269(9):2288-2293.
- [24] Gong F, Fahy D, Smerdon MJ. Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(10):902-907.
- [25] Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & chromatin* 2008; 1(1):9.
- [26] de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):453-460.
- [27] Nouspikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009; 66(6):994-1009.
- [28] Mitchell JR, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(2):232-240.
- [29] Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LHF. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Molecular cell* 2001; 8(1):213-224.
- [30] Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(1):a000745.
- [31] Zhu Q, Wani G, Arab HH, El-Mahdy MA, Ray A, Wani AA. Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA repair* 2009; 8(2):262-273.
- [32] Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Reviews Genetics* 2009; 10(11):756-768.
- [33] Moné MJ, Bernas T, Dinant C, Goedvree FA, Manders EMM, Volker M, Houtsmuller AB, Hoeijmakers JHJ, Vermeulen W, Van Driel R. In vivo dynamics of chromatin-

- associated complex formation in mammalian nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(45):15933.
- [34] Rubbi CP, Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 2003; 22(4):975-986.
- [35] Polo SE, Roche D, Almouzni G. New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 2006; 127(3):481-493.
- [36] Ramanathan B, Smerdon MJ. Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *The Journal of biological chemistry* 1989; 264(19):11026-11034.
- [37] Yu Y, Teng Y, Liu H, Reed SH, Waters R. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(24):8650-8655.
- [38] Guo R, Chen J, Mitchell DL, Johnson DG. GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(4):1390-1397.
- [39] Datta A, Bagchi S, Nag A, Shiyanov P, Adami GR, Yoon T, Raychaudhuri P. The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutation Research/DNA Repair* 2001; 486(2):89-97.
- [40] Martinez E, Palhan VB, Tjernberg A, Lyman ES, Gamper AM, Kundu TK, Chait BT, Roeder RG. Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Molecular and cellular biology* 2001; 21(20):6782-6795.
- [41] Wang J, Chin MY, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer research* 2006; 66(4):1906-1911.
- [42] Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* 2006; 23(4):471-482.
- [43] Martínez-López W, Folle G, Obe G, Jeppesen P. Chromosome regions enriched in hyperacetylated histone H4 are preferred sites for endonuclease- and radiation-induced breakpoints. *Chromosome Research* 2001; 9(1):69-75.
- [44] Martínez-López W, Di Tomaso M. Chromatin remodelling and chromosome damage distribution. *Human & experimental toxicology* 2006; 25(9):539-545.
- [45] Battu A, Ray A, Wani AA. ASF1A and ATM regulate H3K56-mediated cell-cycle checkpoint recovery in response to UV irradiation. *Nucleic Acids Research* 2011; 39(18):7931-7945.
- [46] Nightingale K, Dimitrov S, Reeves R, Wolffe AP. Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *The EMBO journal* 1996; 15(3):548-561.

- [47] Bonaldi T, Längst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *The EMBO journal* 2002; 21(24): 6865-6873.
- [48] Lange SS, Mitchell DL, Vasquez KM. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105(30):10320-10325.
- [49] Reddy MC, Christensen J, Vasquez KM. Interplay between human high mobility group protein 1 and replication protein A on psoralen-cross-linked DNA. *Biochemistry* 2005; 44(11):4188-4195.
- [50] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150(1):12-27.
- [51] Jeggo P, Lobrich M. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiation protection dosimetry* 2006; 122(1-4):124-127.
- [52] Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 2007; 28(11):2298-2304.
- [53] Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(26):9891-9896.
- [54] Moore JD, Yazgan O, Ataian Y, Krebs JE. Diverse roles for histone H2A modifications in DNA damage response pathways in yeast. *Genetics* 2007; 176(1):15-25.
- [55] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128(4):693-705.
- [56] Ehrenhofer-Murray AE. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* 2004; 271(12):2335-2349.
- [57] Sims III RJ, Chen CF, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg D. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(51):41789-41792.
- [58] Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes & development* 2011; 25(13):1345-1358.
- [59] Li S. Implication of Posttranslational Histone Modifications in Nucleotide Excision Repair. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13(10):12461-12486.
- [60] van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 2002; 109(6):745-756.
- [61] Shanower GA, Muller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P. Characterization of the grappa gene, the *Drosophila* histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics* 2005; 169(1):173-184.



- [62] Jones B, Su H, Bhat A, Lei H, Bajko J, Hevi S, Baltus GA, Kadam S, Zhai H, Valdez R *et al.* The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. *PLoS genetics* 2008; 4(9):e1000190.
- [63] Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callen E, Celeste A, Pagani M, Opravil S, De La Rosa-Velazquez IA *et al.* A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes & development* 2008; 22(15):2048-2061.
- [64] Nospikel T. Multiple roles of ubiquitination in the control of nucleotide excision repair. *Mechanisms of ageing and development* 2011; 132(8-9):355-365.
- [65] Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 2006; 22(3):383-394.
- [66] Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Hanaoka F. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 2005; 121(3):387-400.
- [67] El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Praetorius-Ibba M, Wani AA. Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(19):13404-13411.
- [68] Takedachi A, Saijo M, Tanaka K. DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku and contributes to the recruitment of XPA. *Molecular and cellular biology* 2010; 30(11):2708-2723.
- [69] Marteiijn JA, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lans H, Schwertman P, Gourdin AM, Dantuma NP, Lukas J, Vermeulen W. Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *The Journal of cell biology* 2009; 186(6):835-847.
- [70] Lan L, Nakajima S, Kapetanaki MG, Hsieh CL, Fagerburg M, Thickman K, Rodriguez-Collazo P, Leuba SH, Levine AS, Rapic-Otrin V. Monoubiquitinated histone H2A destabilizes photolesion-containing nucleosomes with concomitant release of UV-damaged DNA-binding protein E3 ligase. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287(15):12036-12049.
- [71] Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell research* 2011; 21(3):396-420.
- [72] Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 2009; 78:273-304.
- [73] Bell O, Tiwari VK, Thoma NH, Schubeler D. Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nature reviews Genetics* 2011; 12(8):554-564.
- [74] Udugama M, Sabri A, Bartholomew B. The INO80 ATP-dependent chromatin remodeling complex is a nucleosome spacing factor. *Mol Cell Biol* 2011; 31(4):662-673.

- [75] Thoma F. Repair of UV lesions in nucleosomes--intrinsic properties and remodeling. *DNA Repair (Amst)* 2005; 4(8):855-869.
- [76] Zhao Q, Wang QE, Ray A, Wani G, Han C, Milum K, Wani AA. Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex. *J Biol Chem* 2009; 284(44):30424-30432.
- [77] Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 2000; 20(6):1899-1910.
- [78] Lake RJ, Geyko A, Hemashettar G, Zhao Y, Fan HY. UV-induced association of the CSB remodeling protein with chromatin requires ATP-dependent relief of N-terminal autorepression. *Molecular cell* 2010; 37(2):235-246.
- [79] Citterio E, Van Den Boom V, Schnitzler G, Kanaar R, Bonte E, Kingston RE, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol* 2000; 20(20):7643-7653.
- [80] Reisman D, Glaros S, Thompson E. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 2009; 28(14):1653-1668.
- [81] Gong F, Fahy D, Liu H, Wang W, Smerdon MJ. Role of the mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complex in the cellular response to UV damage. *Cell Cycle* 2008; 7(8):1067-1074.
- [82] Ray A, Mir SN, Wani G, Zhao Q, Battu A, Zhu Q, Wang QE, Wani AA. Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2009; 29(23):6206-6219.
- [83] Zhang L, Zhang Q, Jones K, Patel M, Gong F. The chromatin remodeling factor BRG1 stimulates nucleotide excision repair by facilitating recruitment of XPC to sites of DNA damage. *Cell Cycle* 2009; 8(23):3953-3959.
- [84] Vincent JA, Kwong TJ, Tsukiyama T. ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(5):477-484.
- [85] Pisano S, Leoni D, Galati A, Rhodes D, Savino M, Cacchione S. The human telomeric protein hTRF1 induces telomere-specific nucleosome mobility. *Nucleic Acids Research* 2010; 38(7):2247-2255.
- [86] Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Molecular cell* 2003; 12(1):147-155.
- [87] Cai Y, Jin J, Yao T, Gottschalk AJ, Swanson SK, Wu S, Shi Y, Washburn MP, Florens L, Conaway RC. YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nature structural & molecular biology* 2007; 14(9):872-874.
- [88] Jin J, Cai Y, Yao T, Gottschalk AJ, Florens L, Swanson SK, Gutiérrez JL, Coleman MK, Workman JL, Mushegian A. A mammalian chromatin remodeling complex with

- similarities to the yeast INO80 complex. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(50): 41207-41212.
- [89] Jiang Y, Wang X, Bao S, Guo R, Johnson DG, Shen X, Li L. INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(40):17274-17279.
- [90] Barak O, Lazzaro MA, Lane WS, Speicher DW, Picketts DJ, Shiekhattar R. Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *The EMBO journal* 2003; 22(22): 6089-6100.
- [91] Bozhenok L, Wade PA, Varga-Weisz P. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *The EMBO journal* 2002; 21(9):2231-2241.
- [92] Längst G, Becker PB. Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *Journal of cell science* 2001; 114(14):2561.
- [93] Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Längst G, Grummt I. NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO journal* 2001; 20(17):4892-4900.
- [94] Stopka T, Skoultchi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100(24):14097.
- [95] Emelyanov AV, Vershilova E, Ignatyeva MA, Pokrovsky DK, Lu X, Konev AY, Fyodorov DV. Identification and characterization of ToRC, a novel ISWI-containing ATP-dependent chromatin assembly complex. *Genes & development* 2012; 26(6):603-614.
- [96] Eberharter A, Becker PB. ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 17):3707-3711.
- [97] Cavellan E, Asp P, Percipalle P, Farrants AK. The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *J Biol Chem* 2006; 281(24):16264-16271.
- [98] Luijsterburg MS, Dinant C, Lans H, Stap J, Wiernasz E, Lagerwerf S, Warmerdam DO, Lindh M, Brink MC, Dobrucki JW *et al.* Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *The Journal of cell biology* 2009; 185(4):577-586.
- [99] Sanchez-Molina S, Mortusewicz O, Bieber B, Auer S, Eckey M, Leonhardt H, Friedl AA, Becker PB. Role for hACF1 in the G2/M damage checkpoint. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(19):8445-8456.
- [100] Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research* 2008; 18(1): 73-84.
- [101] Rouaux C, Loeffler JP, Boutillier AL. Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochemical pharmacology* 2004; 68(6):1157-1164.

- [102] Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G. Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Human molecular genetics* 2004; 13(11):1183-1192.
- [103] Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH, Dangond F, Cormier KA, Cudkowicz ME, H Brown Jr R. Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of neurochemistry* 2005; 93(5):1087-1098.
- [104] Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Méndez-Acuña L, Martínez-López W. Chromatin-remodelling mechanisms in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2008; 658(3):191-214.
- [105] De Santis LP, Garcia CL, Balajee AS, Brea Calvo GT, Bassi L, Palitti F. Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UV61 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B. *Mutation Research/DNA Repair* 2001; 485(2):121-132.
- [106] Martínez-López W, Marotta E, Di Tomaso M, Méndez-Acuña L, Palitti F. Distribution of UVC-induced chromosome aberrations along the X chromosome of TCR deficient and proficient Chinese hamster cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2010; 701(1):98-102.

INTECH

