# PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BASICAS (PEDECIBA)

# MAESTRÍA EN CIENCAS BIOLÓGICAS.

# OPCIÓN GENÉTICA

# INFLUENCIA DE LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA EN LA REMOCIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR UVC EN CÉLULAS DEFICIENTES EN LA REPARACIÓN ACOPLADA A LA TRANSCRIPCIÓN

PEDECIBA BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Maestría Ciencias Biológicas

Área Genética

Montevideo- Uruguay

2016

# INFLUENCIA DE LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA EN LA REMOCIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR UVC EN CÉLULAS DEFICIENTES EN LA REPARACIÓN ACOPLADA A LA TRANSCRIPCIÓN

Aspirante a Título de Maestría:

Bióloga. YOLY DAYANA MORENO ORTEGA

Tutor: Dr. WILNER MARTÍNEZ LÓPEZ

Tribunal: Dr. GUSTAVO A. FOLLE Dr. RUBEN PÉREZ Dra. YANINA PANZERA

Defensa: Montevideo, Junio 14, 2016

## PEDECIBA BIOLOGÍA

## 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 y hermanos por su apoyo y especialmente a Jonatan Valencia Payan 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 mis evaluadores por su tiempo y buenos aportes para culminar con éxito esta meta.

# INDICE

	Página	
RESUMEN	8	
1. INTRODUCCIÓN	10	
1.1 Integridad del ADN	10	
1.2 Sistemas de reparación	11	
1.3 Sistema de reparación por escisión de nucleótidos	13	
1.4 Estructura de la cromatina	15	
1.5 Modificaciones post-traduccionales de las histonas	17	
1.6 El código de histonas y la remodelación de la cromatina	18	
1.7 Mecanismo de acetilación de histonas	21	
1.8 Respuesta celular al daño, remodelación de la cromatina y NER	22	
1.9 Inducción de aberraciones cromosómicas estructurales (AC)	27	
1.10 Líneas celulares empleadas como modelo para el estudio de reparación TCR.	29	
2. HIPÓTESIS	31	
3. OBJETIVOS	31	
3.1 Objetivo general	31	
3.2 Objetivos específicos	31	
4. METODOLOGÍA	32	
4.1 Origen y características cariotípicas de la líneas celulares CHO	32	
4.2 Líneas celulares (AA8 - UV61) y condiciones de cultivo	33	
4.3 Inducción de AC por la incorporación de la ADNasI empleando electroporación	33	
4.4 Test de In situ nick translation	34	
4.4.1 Sincronización de células	34	
4.4.2 Tratamiento con UVC	35	
4.4.3 In situ nick translation sobre núcleos fijados	35	
4.4.4 Análisis de las imágenes obtenidas mediante in situ nick translation	35	
4.4.5 Análisis estadístico de los parámetros obtenidos mediante in situ nick translatio	on 36	
4.5 Inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-histona H3 acetilada Lys9		

4.6 Tratamientos con Tricostatina A (TSA) e irradiación UVC	37
4.7 Inducción de AC con UVC	39
4.8 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	39
4.9 Inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-CPD	40
4.9.1 Análisis estadístico del recuento de CPD a 2 h y 4 h post-irradiación UVC	41
5. RESULTADOS	42
5.1 Remodelación de la cromatina inducida por UVC	42
5.2 Efecto de los iHDAC (TSA) sobre la remoción del daño inducido por UVC	47
6. DISCUSIÓN	60
6.1 Remodelación de la cromatina inducida por UVC	60
6.2 Efecto de los iHDAC (TSA) sobre la remoción del daño inducido por UVC	64
7. CONCLUSIONES	67
8. PERSPECTIVAS	68
9. BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXO I -INFORME DE PASANTIA	77
ANEXO II - Martínez-López, W., Méndez-Acuña, L., Bervejillo, V., Valencia-Payan, J.,	
& Moreno-Ortega, D. (2013). Chapter 6: Chromatin Remodeling in Nucleotide Excision	
Repair in Mammalian Cells. "New Research Directions in DNA Repair", book edited by	
Clark Chen, ISBN 978-953-51-1114-6.	85

# ABREVIATURAS

6-4 PP	6-4 fotoproductos
ACs	Aberraciones cromosómicas
BER	Reparación por escisión de bases
СНО	Células de Ovario de hámster chino
CPD	Dímeros de pirimidina
CS	Síndrome de Cockayne
CSA	Cokayne Syndrome A
CSB	Cockayne Syndrome B
DSB	Rupturas de doble cadena del ADN
GGR	Reparación genómica global
НАТ	Acetiltransferasas de histonas
HDAC	Desacetilasas de histonas
iHDAC	Inhibidores de desacetilasas de histonas
НМТ	Metiltransferasas de histonas
HR	Recombinación homóloga
K	Lisina

NER	Reparación por escisión de nucleótidos
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TSA	Tricostatina A
UV	Ultravioleta
UVC	Ultravioleta C

#### RESUMEN

La irradiación UVC induce principalmente dos tipos de lesiones en el ADN llamadas dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos, las que son removidas exclusivamente por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, el cual está dividido en dos sub-vías denominadas reparación genómica global y reparación acoplada a la transcripción. Las líneas celulares AA8 y UV61 son líneas celulares isogénicas de hámster chino derivadas de CHOK1, las cuales presentan una mutación en p53 y son deficientes en la reparación genómica global. Las células UV61 (células símil Síndrome de Cockayne), se diferencian de las células AA8 por la presencia de una mutación en la proteína CSB ("Cockayne Syndrome B"), proteína de reconocimiento de las lesiones en el sistema de reparación acoplado a la transcripción que forma parte de un complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP. Puesto que es limitada en los nucleosomas, se puede especular que la organización de la cromatina después de la exposición a UVC en las células símil Síndrome de Cockayne podría influir en la remoción de los dímeros de pirimidina. En tal sentido, hemos evaluado en células CHO competentes y deficientes en CSB el proceso de relajación de la cromatina inducido por UVC, habiendo encontrado el mayor grado de decondensación a las 2 h en ambas líneas celulares (aunque en menor grado en las células deficientes en CSB). Con el fin de incrementar la remoción del daño inducido por UVC en células deficientes en CSB, se empleó un inhibidor de desacetilasas de histonas denominado Tricostatina A, el cual al incrementar los niveles de acetilación de histonas lleva a la relajación de la cromatina y permite que los mecanismos de reparación de ADN sean más eficientes. Contrario a lo esperado, el aumento en la relajación de la cromatina producido por la Tricostatina A llevó a un incremento en la inducción de las aberraciones cromosómicas por UVC, afectando mayormente a células competentes que a deficientes en la proteína CSB. Este hecho se correlacionó con una tendencia a la disminución en la remoción de los dímeros de pirimidina inducidos por UVC en presencia de este inhibidor de desacetilasas de histonas en células competentes, mientras que en el caso de las células deficientes en la proteína CSB se observó una tendencia a favorecer la remoción de los dímeros de pirimidina, sugiriendo que el incremento en el nivel de acetilación de histonas pudiera mejorar la accesibilidad a las proteínas del sistema de reparación acoplada a la transcripción. Finalmente, el hecho más relevante ha sido el hallazgo que el nivel de daño inducido por UVC en presencia de la Tricostatina A en células competentes es similar al observado en células deficientes en CSB expuestas a UVC, indicando que la inducción de tanto un incremento en el nivel de acetilación de histonas inducido como la disminución en el patrón de acetilación de histonas como ocurre en células deficientes en CSB, ofrece un fenotipo similar de sensibilidad al daño inducido por UVC. En este mismo sentido, ha sido demostrado que la expresión de genes regulados por CSB coincide con el nivel de expresión génica de células tratadas con la Tricostatina A. Estas evidencias en combinación con nuestros hallazgos, nos permiten plantear que el desequilibrio 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 deficientes en CSB como en células competentes tratadas con la Tricostatina A, posiblemente debido a cambios en las interacciones entre las proteínas de los sistemas de reparación y las lesiones sobre el ADN debido a cambios en la conformación de la cromatina.

#### 1. INTRODUCCION

#### 1.1 Integridad del ADN

Durante la evolución, las células eucariotas superiores han desarrollado una maquinaria genética y molecular cada vez más compleja para preservar la integridad del genoma. La integridad del genoma es desafiada continuamente por agentes endógeno y exógenos que generan un amplio espectro de distintas lesiones, las cuales puede conducir a la pérdida de los controles de proliferación y/o muerte celular, (Lazzaro et al., 2009).

El mantenimiento de la continuidad y la estabilidad de cada molécula de ADN es de fundamental importancia en la prevención de reordenamientos cromosómicos que pueden conducir al cáncer a través de la expresión de genes alterados (Thompson, 2012). Las células han desarrollado un conjunto complejo de vigilancia y mecanismos de reparación del ADN, que impiden que el ADN dañado se transforme en una mutación, de modo de garantizar la transmisión de la información genética sea precisa (de Boer y Hoeijmakers, 2000).

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 (de Boer y Hoeijmakers, 2000). Alteraciones como los rupturas 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 (<u>C</u>yclobutane

<u>Pyrimidine Dimers, CPD) y 6-4 fotoproductos (pyrimidine-(6-4) pyrimidone photoproducts, 6-</u>4PP) en la cadena de ADN inducidos por la exposición a la luz UV (principalmente UVC), puede generar aberraciones cromosómicas a través del procesamiento de estas lesiones (Thompson, 2012). Por tanto, 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).

Para preservar la integridad genómica frente a la acción de agentes genotóxicos como la irradiación UV, las células han desarrollado un conjunto interrelacionado 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 (Hoeijmakers, 2001; Costa et al., 2003; Dinant et al. 2008; Overmeer et al., 2011).

#### 1.2 Sistemas de reparación

Las lesiones en el ADN pueden ser de diferente naturaleza: rupturas de simple y doble cadena (inducidas por rayos X), *crosslinks* inter- e intra-catenarios (a causa de agentes químicos) y diferentes tipos de modificaciones de las bases nitrogenadas. El daño en el ADN tiene consecuencias tanto a nivel celular dificultando 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. 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).

Los genes de la reparación del ADN pueden agruparse dentro de dos subgrupos: uno asociado con la señalización y la regulación de la reparación del ADN y el otro asociado con los genes de los diferentes mecanismos de reparación como reparación mismatch (MisMatch Repair - MMR), reparación por escisión de bases (Base Excision Repair - BER), reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair - NER), reversión directa del daño (Direct Damage <u>R</u>eversal - DDR) y reparación de rupturas de doble cadena del ADN (DNA <u>D</u>ouble-<u>S</u>trand <u>B</u>reak (DSB) repair). Las DSB inducidas por la radiación ionizante generalmente causan rearreglos en la cromatina, iniciados por la fosforilación de la histona modificada H2AX dependiente de ATM. Esta fosforilación dispara la acumulación de diferentes moléculas de reparación de DSB y de señalización del daño en el ADN, concentrando proteínas de reparación en un IRIF (Ionizing Radiation-Induced Foci). Las dos vías principales de reparación de las DSB son la recombinación homóloga (HR) y el proceso de unión no homóloga (Non-Homologous End-Joining - NHEJ), principal proceso en las células de mamíferos. Para llevar a cabo la recombinación homóloga se necesita una segunda molécula que tenga homología con la región que va a ser reparada para actuar como molde para la reparación. Por el contrario, NHEJ no necesita homología, realiza pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de las DSB. El uso de HR y NHEJ depende de la fase del ciclo celular. NHEJ ocurre principalmente en G0/G1, mientras que HR ocurre durante la fase S tardía y la fase G2 (Dinant et al., 2008).

La reparación por escisión involucra la remoción de la porción del ADN dañada. Este tipo de reparación comprende 3 mecanismos diferentes: BER, NER y MMR. El mecanismo de reparación BER es el responsable de la remoción de las bases dañadas por hidrólisis, especies reactivas del oxígeno u otros metabolitos intracelulares, las cuales son previamente reconocidas por enzimas específicas llamadas ADN glicosilasas. Las principales lesiones atacadas por BER son las bases oxidadas y las alquilaciones del ADN. El sistema de reparación MMR es el responsable de la remoción de las bases mal apareadas que son consecuencia de las desaminaciones de bases inducidas y espontáneas, la oxidación, la metilación y los errores de replicación. Los blancos principales del MMR son los apareamientos erróneos G/G, G/T, A/C y C/C (Chistmann et al., 2003). El mecanismo del NER está compuesto por una serie de etapas enzimáticas que incluyen: a) reconocimiento de la lesión; b) introducción de cortes en la hebra dañada a ambos lados de la lesión; c) remoción de los oligonucleótidos que contienen la lesión; d) síntesis de la secuencia nucleotídica usando la hebra de ADN complementaria como molde y; e) unión del tramo recientemente sintetizado a la hebra preexistente (Hanawalt, 2002).

#### 1.3 Sistema de reparación por escisión de nucleótidos

Los sustratos más relevantes del NER son los dímeros de pirimidina (CPD) y los 6-4 fotoproductos (6-4PP). Ambos están formados por pirimidinas adyacentes y son las dos clases principales de lesiones inducidas por la luz ultravioleta. El NER está compuesto por dos vías diferentes llamadas reparación acoplada a la transcripción (TCR) y reparación genómica global (GGR). La TCR refiere a la reparación de las hebras transcriptas de los genes activos y la GGR a la reparación a lo largo

el genoma, incluyendo las hebras no transcriptas de los genes activos (Figura 1) (Christmann et al., 2003).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.- Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos. (Marteijn, et al., 2014).

Debido a su naturaleza física, la estructura de la cromatina constituye un obstáculo considerable 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 (Green y 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, el cual, 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).

#### 1.4 Estructura de la cromatina

La cromatina, definida por Flemming en 1882 como la sustancia que forma parte del núcleo interfásico y que representa determinadas propiedades tintoriales, fue clasificada inicialmente en dos categorías según su reacción a la coloración. La cromatina que constituye el componente mayoritario del núcleo se la denomina eucromatina y aquella que presenta un patrón tintorial diferente se le denomina heterocromatina. No obstante, del punto de vista químico, tanto la eucromatina como la heterocromatina poseen los mismos componentes básicos (Wolffe, 1998).

El componente cromatínico proteico mayoritario asociado al ADN está constituido por las histonas, una familia de proteínas básicas. Los 5 grupos principales son: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las cadenas laterales de los aminoácidos de las histonas son modificadas luego de la traducción mediante la adición de un grupo fosfato, metilo, acetilo, ubiquitina, SUMO o ADP-ribosa. Las

secuencias de aminoácidos de las cuatro histonas que forman el nucleosoma se han conservado a lo largo de la evolución; en cambio la histona H1 varía de una especie a otra y, en algunos casos, es sustituida por otra histona (por ejemplo, en las aves es sustituido por la histona H5) (Luger, *et al.*, 1997). El enrollamiento del ADN en los nucleosomas compacta 7 veces su longitud original. A su vez, el posterior ordenamiento de los nucleosomas a nivel de la fibra de cromatina (30 nm), permite una compactación del ADN en un orden similar. La organización de la fibra de cromatina que forma los cromosomas metafásicos origina una compactación total del ADN de 250 veces (Earnshaw, 1988; Felsenfeld, 1992; Wolffe, 1998).

La compactación del ADN en el núcleo de las células eucarióticas se puede analizar a diferentes niveles estructurales (Figura 2) (Grunstein, 1997). El nucleosoma, esta consiste en 146 pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de histonas, el cual contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, conformando una fibras de 10 nm que se pliegan de forma helicolidal en fibras de 30 nm de cromatina, y, a su vez, estas fibras crea bucles organizados radialmente para constituir los cromosomas que se visualizan en su grado máximo de compactación durante la metafase (Luger et al., 1997).

Alrededor de 160 a 200 pares de bases (pb) de ADN rodean al nucleosoma, pero solamente 140 pb son los que se hallan en íntimo contacto con esta estructura (Belmont et al., 1999). Se sabe desde hace mucho tiempo que este empaquetamiento del genoma eucariota en cromatina, es esencial para que el ADN pueda ensamblarse en el núcleo. Además, la estructura de la cromatina regula fuertemente los procesos que ocurren en el ADN, incluyendo la reparación, la replicación

y la transcripción, característica de fundamental importancia para el desarrollo y la diferenciación celular (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.



Fuente:http://www.mundogenetica.com.mx/2015/06/13/bases-moleculares-de-la-herencia-estructura-yorganizaci%C3%B3n-de-los-cromosomas-humanos/

Figura 2.- Niveles estructurales de la cromatina

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

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", 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

y sumoilación, 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). El código de histonas influye en las estructuras cromatínicas de orden superior afectando las interacciones entre diferentes histonas, y entre histonas y el ADN, ejerciendo un rol importante en la regulación de procesos nucleares, como la replicación, transcripción, recombinación, reparación del ADN y condensación cromosómica (Rea et al., 2000).

#### 1.6 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 de 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 temporaria o permanente. Las histonas no acetiladas se encuentran frecuentemente metiladas; esta adición de grupos metilo estaría 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.

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 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 desacetilación de Lys14 en la histona H3 ocurre para facilitar la subsecuente metilación de Lys9. El epítope 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 mediante 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 (Workman y Kingston, 1998; 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 estrechamente 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 en serían utilizados en primera instancia, para modificar la estructura de la cromatina y que posteriormente procesos como la acetilación o desacetilación 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 cromatina 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 desacetilación, permitirían posteriormente fijar a los genes en un estado activo o reprimido (Kingston y Narlikar, 1999). Los procesos de modificación de las histonas daría 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.

#### 1.7 Mecanismo de acetilación de histonas

La acetilación de histonas es un proceso altamente dinámico y reversible. Las principales enzimas que participan en este proceso son dos enzimas con actividades opuestas llamadas acetiltransferasas de histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC) cuya acción combinada determina el patrón de acetilación de las histonas en las diferentes regiones del ADN. El equilibrio entre la acetilación y la desacetilación está involucrado en la regulación de diferentes procesos nucleares, como la transcripción, la replicación y la reparación del ADN (Villar-Garea, 2005).

La histona H3 tiene cuatro residuos potenciales de modificación: 9, 14, 18 y 23. En el caso de la histona H4, los residuos 5, 8, 12 y 16 son los sitios de lisinas que pueden acetilarse. Finalmente para las histonas H2A los sitios de acetilación son los residuos 5 y 9, así como para la histona H2B son el 5, 12, 15 y 20. Las HAT están divididas en cinco familias. Estas incluyen: acetiltransferasas relacionadas con Gcn5 (General control non derepressible 5) (GNATs), MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60), p300/CBP HATs, factores generales de transcripción con función HAT, que incluyen la subunidad TAF250 (<u>TBP-A</u>ssociated <u>Factor 250</u>) del TFIID, y el coactivador nuclear relacionado con HATs SRC1 (<u>Steroid Receptor Coactivator 1</u>) y ACTR (<u>ACT</u>ivato<u>r R</u>etinoid receptor). Además de estos grupos principales, existen más de una docena de otras proteínas que han mostrado poseer actividad acetiltransferasa (Adcock et al., 2006). Las HDAC juegan un rol principal en revertir la hiperacetilación de las histonas. La acetilación de la lisina es reversible y es controlada mediante la acción opuesta de las HATs y de las HDACs *in vivo*. Las HDAC están divididas en cuatro clases: I (HDAC1, -2, -3, y -8), II (HDAC4, -5, -6, -7, -9 y -10), III (sirt1, -2,

-3, -4, -5, -6 y -7) y IV (HDAC11). Algunas de ellas desacetilan varias proteínas no histónicas, como p53 y E2F (Adcock et al., 2006).

Los inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDAC) son un grupo de pequeñas moléculas que actúan sobre las HDAC inhibiendo su actividad. Los iHDAC se han empleado extensamente en neurología y psiquiatría (como antiepilépticos y estabilizadores del estado de ánimo). 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 (New et al., 2012; Slingerland et al., 2014). La Tricostatina A (TSA), fue aislada originalmente como un antibiótico fungistático de *Streptomyces platensis*, siendo el primer inhibidor natural específico de HDAC descrito (Lane y Chabner, 2009; Hou et al., 2011; Venkatesh y Workman, 2015). 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 et al., 2015). De acuerdo con múltiples estudios, el tratamiento con TSA provoca un aumento global en el nivel de la acetilación de histonas, causando una decondensación reversible de las regiones eucromáticas (Tóth et al., 2004).

#### 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 directa de lesiones al ADN, la detención del ciclo celular y transcripción de genes, e incluso la activación del mecanismo apoptótico cuando el daño es irremediable (Figura 3) (Zhou y Elledge, 2000; Kottemann y Bale, 2009). 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, factor importante para prevenir la entrada en mitosis cuando el ADN está dañado (Matsuoka et al., 1998).



Figura 3.- Vías de respuesta al daño genético. (Zhou & Elledge.2000)

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). La proteína 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)  $\rightarrow$  relajación global de la cromatina  $\rightarrow$  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 del 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 4) (Allison y Milner, 2004).

La relación entre la conformación de la cromatina y la acetilación de histonas es compleja, 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



**Figura 4.-** Relajación global de la cromatina inducida por p53 en respuesta a la irradiación UV (Allison y Milner, 2004).

La relación entre la conformación de la cromatina y la acetilación de histonas es compleja, 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 el 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 h) de las histonas H3 y H4 que desestabiliza el nucleosoma (Wang et al., 2006). 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 TCR 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 TCR 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 del ATP. Una característica de las células que poseen alterada la proteína CSB (<u>C</u>ockayne <u>S</u>yndrome <u>B</u>), 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 (Citterio et al., 2000).

#### 1.9 Inducción de aberraciones cromosómicas estructurales (AC)

En las AC inducidas, la acción del agente mutagénico o clastogénico puede provocar daño genético variable de acuerdo al tipo y cantidad de lesiones inducidas en el ADN. El ulterior procesamiento de estas lesiones por los mecanismos de reparación originará las siguientes consecuencias: a) restitución de la estructura original del ADN; b) reparación errónea del daño inducido generando nuevas estructuras evidenciables a nivel molecular o cromosómico; y c) ausencia de reparación con permanencia de las lesiones originales.

Los agentes clastogénicos difieren en su acción a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (G1, S, G2) ya sea en forma cuantitativa o cualitativa. *S-independientes*, una minoría de compuestos químicos actúa como las radiaciones ionizantes (agentes radiomiméticos), produciendo AC en todas las etapas del ciclo celular relacionadas con el estado de duplicación cromosómica (ej. Bleomicina y algunos antibióticos). *S-dependientes*, las lesiones en el ADN son producidas en cualquiera de las etapas del ciclo celular pero para visualizar las AC se requiere que la cromatina atraviese una fase de replicación normal para convertir aquellas lesiones en

aberraciones (exclusivamente) de tipo cromátida. Las células que se encontraban en G2, por tanto, no presentarán aberraciones en la primera división mitótica (M1) post-tratamiento y, las células que estaban en G1, sólo presentarán aberraciones tipo cromátida en la M1. Algunos ejemplos lo constituyen la mostaza nitrogenada y otros agentes alquilantes así como la luz ultravioleta.

Las aberraciones tipo cromosoma y las aberraciones tipo cromátida pueden subdividirse en discontinuidades y en reordenamientos (Figura 5a y b). Estos últimos pueden a su vez ser clasificados como intracambios, o sea reordenamientos dentro de un cromosoma; o intercambios, correspondientes a reordenamientos entre dos o más cromosomas diferentes (Savage, 1976).



Figura 5a.- Aberraciones tipo cromosoma estructurales.



Figura 5b.- Aberraciones tipo cromátida estructurales.

#### 1.10 Líneas celulares empleadas como modelo para el estudio del sistema TCR.

Las líneas celulares AA8 y UV61 son líneas celulares CHO isogénicas. Ambas presentan una mutación en el codón 211 de p53 y son deficientes en la sub-vía de reparación NER denominada reparación genómica global o GGR (Hwang et al., 1999). La línea celular denominada AA8 es una línea celular derivada de fibroblastos de ovario de hámster Chino competente en la reparación de ADN, la línea celular denominada UV61 derivada de AA8 que posee una mutación en el gen que codifica para 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, exhibe un fenotipo competente para la remoción de 6-4PP pero son deficientes en la remoción de CPD

mediante la sub-vía de la reparación acoplada a la transcripción o TCR (Thompson et al., 1989; Orren et al., 1996).

El hecho que las células AA8 y UV61 no presentan una activa reparación genómica global debido a una alteración en la proteína de reconocimiento de daño denominada DDB2 (Hwang et al., 1999), torna a estas células un modelo interesante para evaluar el efecto de la remodelación de la cromatina en la remoción de CPD en las zonas de mayor actividad transcripcional del genoma mediante el sistema TCR.

## 2. HIPÓTESIS

Los cambios en la remodelación de la cromatina a través de una modificación en el patrón de acetilación de histonas facilitan la remoción de lesiones inducidas por la irradiación UVC en células deficientes en la reparación acoplada a la transcripción o TCR del sistema de reparación por escisión de nucleótidos.

#### 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de la remodelación de la cromatina en la remoción del daño inducido por UVC en celulares CHO competentes y deficientes en TCR.

## 3.2 Objetivos específicos

- Estudiar el grado de decondensación de la cromatina en células CHO competentes y deficientes en la TCR a diferentes tiempos post-irradiación UVC.
- Comparar las frecuencias de AC inducidas por UVC en células CHO competentes y deficientes en la TCR, irradiadas con UVC tanto en presencia como ausencia de un inhibidor de desacetilasas de histonas (Tricostatina A o TSA).
- Analizar la frecuencia de los CPD inducidos por UVC en cromosomas de líneas celulares CHO competentes y deficientes en la TCR, en presencia o ausencia de un inhibidor de desacetilasas de histonas (Tricostatina A o TSA).

## 4. METODOLOGÍA

#### 4.1 Origen y características cariotípicas de la líneas celulares CHO

Las líneas celulares del hámster Chino son ampliamente utilizadas en mutagénesis experimental por su escaso número de cromosomas, la ausencia casi total de pares cromosómicos y un tiempo de duplicación celular corto, lo cual, sumado a las propiedades que ofrece una línea celular de crecimiento continuo, la convierten en un material de elección para el estudio de las AC inducidas. Las líneas celulares CHO (Chinese <u>H</u>amster <u>O</u>vary cells) utilizada en los experimentos, es una subclona de un cultivo de ovario hámster chino iniciado por Puck y cols. (1958) que posee un número modal de 21 cromosomas incluyendo un X (Figura 6) (Kao y Puck, 1969; Siciliano y cols., 1985; Ray y Mohandas, 1976)



**Figura6.-** Metafase de una línea celular CHO con bandas G donde se distinguen los diferentes cromosomas reordenados.

#### 4.2 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). 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 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/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>.

#### 4.3 Inducción de AC por la incorporación de la ADNasI empleando electroporación

Las células confluentes se trataron con tripsina y  $2x10^6$  células se resuspendieron en 700 µL de buffer sacarosa. Concentraciones crecientes de ADNasaI (500, 1000 o 2000 unidades, Roche) y se resuspendieron en 100 µL de buffer sacarosa. Se adicionó a cubetas de electroporación de 0,4 cm de distancia del electrodo las células en suspensión así como la ADNasaI (volumen total 800 µL). Las células se sometieron a una electroporación utilizando un equipo Gene Pulser (BioRad) a 400 V y 25 µF de capacitancia. Después de la electroporación, las células se sembraron en placas de petri de plástico (60 mm) utilizando medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 5-bromodesoxiuridina (BrdU; Serva; concentración final  $2x10^{-5}$ M). Las células se dejaron recuperar a  $37^{\circ}$ C en una estufa de cultivo con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 4 h, incluyendo un tratamiento de 2 h con Colcemid (0,08 µg/mL). Las células se fijaron luego con metanol:acido acético (3:1) y las preparaciones fueron realizadas siguiendo un protocolo de rutina. Las mismas fueron teñidas con el colorante de Giemsa por 5 min, previa realización de la técnica de diferenciación de cromátidas hermanas. Solamente fueron empleadas para el recuento de la frecuencia de AC las primeras metafases post-tratamiento teñidas de manera uniforme . Se realizaron 3 experimentos por duplicado.

#### 4.4 Test de In situ nick translation

#### 4.4.1 Sincronización de células

Se sembraron 1 x 10<sup>6</sup> células AA8 o UV61 en placas de Petri de plástico de 60x20 mm y se dejaron crecer durante 48h hasta que las células alcanzaron la confluencia (Carvalho et al., 2003). La sincronización de células en G1 se comprobó estimando el contenido de ADN de la población celular (tinción con yoduro de propidio) mediante un citómetro de flujo FACSVantage (Becton Dickinson) (Figura 9).



**Figura 9.-** Análisis de ADN por citometría de flujo de células AA8 y UV61 mantenidas en confluencia previo a la irradiación con UVC ( $4 \text{ J/m}^2$ ).

#### 4.4.2 Tratamiento con UVC

Se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con solución salina PBS 1X. Las dosis de irradiación UVC empleadas fueron 4 J/m<sup>2</sup>. Inmediatamente luego de la irradiación, las células fueron fijadas (tiempo: 0 h) o incubadas a 37°C en una estufa con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 h o 4 h.

#### 4.4.3 In situ nick translation sobre núcleos fijados

Se realizaron dos experimentos por duplicado irradiando células AA8 y UV61 sólo con 4 J/m<sup>2</sup> de UVC. Posteriormente a la irradiación, las células fueron fijadas (tiempo: 0 h, 2 h o 4 h) en metanol al 100% y mantenidas a -20°C. El metanol fue posteriormente cambiado por metanol:acido acético (3:1) antes de la realización de los extendidos de células en los slides. Los extendidos de núcleos fijados provenientes de células AA8 y UV61 sincronizadas en G1 (Figura 7), irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup> de UV-C y recuperadas a diferentes tiempos post-irradiación (0 h, 2 h y 4 h) fueron expuestas a una mezcla conteniendo diferentes dosis de la ADNasaI (0.015, 0.03 and 0.06 U/mL), nucleótidos marcados con digoxigenina y ADN polimerasa I. Los nucleótidos marcados fueron revelados utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado con FITC. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (Marañon et al., 2004).

#### 4.4.4 Análisis de las imágenes obtenidas mediante in situ nick translation

Se capturaron 100 imágenes al azar de núcleos en los canales verde y azul de fluorescencia empleando el Software Autocapt de MetSystems (GmbH) provenientes de dos experimentos realizados. Luego se tomaron 50 núcleos al azar que tuvieran un buen foco, los cuales fueron analizados con el software denominado ISIS para la cuantificación de la señal fluorescente (MetaSystems, GmbH). La fluorescencia de color verde representa la incorporación de los nucleótidos marcados con Digoxigenina y revelados con un anticuerpo secundario conjugado con FITC. La fluorescencia de color azul corresponde a la contratinción con DAPI. Por tanto, se tomaron medidas de las intensidades de las fluorescencias en verde y en azul así como las áreas de los núcleos empleando el software ISIS (MetaSystems, GmbH).

#### 4.4.5 Análisis estadístico de los parámetros obtenidos mediante in situ nick translation

Se estimó el error estándar de la media (EEM) para los siguientes parámetros: área, intensidad de la fluorescencia en azul. La prueba estadística *t* de Student fue realizada para comparar los valores promedio del índice de relajación definido como:

#### IR = FITC x AREA / DAPI

para cada tratamiento en relación a los controles respectivos.

#### 4.5 Inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-histona H3 acetilada Lys9

Las células se fijaron con paraformaldehido al 4% a las 2 h post-irradiación UVC y luego fueron permeabilizadas con Tritón 0,1% para incubarlas a 37°C durante 12 h en cámara húmeda con un anticuerpo anti-histona H3 acetilada en una lisina en posición 9 (Lys9) (Cell Signalling). Posteriormente se realizaron 2 lavados con una solución salina PBS con un 0.5% de Tween 20 de 5 minutos de duración cada uno. Se incubó luego con un anticuerpo secundario anti-rabbit
conjugado con FITC. Finalmente se tiñó con una solución de ioduro de propidio (1 mg/mL) como contratinción. La observaciones y captura de imágenes se realizaron empleando el software ISIS (MetaSystems GmbH).

### 4.6 Tratamientos con Tricostatina A (TSA) e irradiación UVC

Para el tratamiento con TSA, se estableció una concentración de trabajo de 50ng/mL, ya que a esta concentración no supera el 10% de inducción de apoptosis en células de mamíferos (Figura 7) (Tóth et al., 2004).



Figura 7.- Dependencia de la concentración en la apoptosis inducida por la TSA. La TSA provoca un aumento en la inducción de apoptosis de manera dependiente a la concentración después de la incubación durante 24 h según lo observado mediante citometría de flujo (tomado de Tóth et al., 2004).

Se realizaron dos protocolos de tratamiento con TSA: a) agregando a cada cultivo 50 ng/mL de TSA 4 h previas a la irradiación con UVC y restitución de los cultivos celulares con medio de cultivo nuevo suplementado con un 10% de suero bovino fetal (TSA 4 h); y; b) agregando TSA 4 h previas a la irradiación y continuando luego de la misma hasta la recolección del cultivo (TSA cont.) (Figura 8).



**Figura 8.- Protocolo de tratamientos UVC y TSA (50 ng/mL).** A) Esquema de tratamiento para cultivos irradiados sin TSA. B) Esquema para cultivos irradiados con pre-tratamiento de TSA y restituidos con medio de cultivo nuevo (TSA 4 h). C) Esquema de tratamiento para cultivos irradiados con pre-tratamiento de TSA y restituidos con medio de cultivo previamente recolectado pre-irradiación (TSA cont.).

El tratamiento con UVC, se realizó 4 h después del tratamiento con el TSA; para esto, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con solución salina PBS 1X. Las dosis de irradiación UVC empleadas fueron 4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>. Los tiempos de cosecha o recolección de las células para análisis del efecto de los tratamientos depende de los test que se describen a continuación. Se realizaron 5 experimentos por duplicado cada uno tanto para recuento de AC como para análisis de la inducción de CPD.

### 4.7 Inducción de AC con UVC

Se sembraron 1 x  $10^6$  células en placas de Petri de 60x20 mm. Las células fueron sometidas a los tratamientos mencionados anteriormente al segundo día de establecido los cultivos ( Ver Figura 8). Los cultivos se recolectaron 20 h post-irradiación, 2 h previas a la recolección celular se agregó colcemid (0,08 µg/mL). Se centrifugaron las céll as para eliminar el medio de cultivo (800-1.000 rpm durante 5 min), se agregó una solución hipotónica (0,075 M de KCl) a 37°C durante 4 minutos y se realizó la prefijación de las células con 1 mL de solución de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1). Posteriormente se realizaron 2 fijaciones con 5 mL dicha solución de Carnoy. Se realizó la dispersión cromosómica sobre portaobjetos fríos que se dejaron secar al aire. Se tiñeron con una solución de Giemsa al 5% por 5 min. De acuerdo con Obe y Winkel (1985), se analizaron 100 células en metafases completas (18 a 21 cromosomas) por tratamiento para cada experimento realizado. Las alteraciones cromosómicas de tipo estructural observadas fueron fracturas de cromátida y cromosómicas así como reordenamientos de tipo cromátida o cromosómicos El recuento de las aberraciones cromosómicas fue realizado empleando un microscopio AXIOPLAN ZEISS a un aumento de 100X.

## 4.8 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Se sembraron 1 x 10<sup>6</sup> células en placas de Petri de 60x20 mm. Las células fueron sometidas a los tratamientos mencionados anteriormente llevado a cabo en dos experimentos por duplicado cada uno. Los cultivos se recolectaron 20 h post-irradiación, se centrifugaron a 800-1.000 rpm durante 5 min, el pellet celular fue resuspendido con 3 mL de PBS 1X y fue agregado a 7 mL de etanol frio al 70%. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su análisis por citometría de flujo.

Para el análisis, las muestras se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min para eliminar el etanol y luego de resuspender el pellet con 1 mL de PBS 1X, las muestras fueron filtradas e incubadas por 15 min a temperatura ambiente con 25  $\mu$ L de RNAsa (50 mg/mL) y 25  $\mu$ L de ioduro de propidio (1 mg/mL), para ser analizadas por el citómetro de flujo FACSVantage (Becton Dickinson) equipado con un laser 488nm. La señal de ioduro de propidio fue analizada empleando el parámetro FL2A. Se capturaron 10.000 eventos y el porcentaje de células en etapa G1 (M1 = marker 1) and S/G2 (M2 = marker 2) fueron establecidos empleando el software CellQuest de Becton Dickinson.

### 4.9 Inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-CPD

Las células en metafase se recolectaron a 2 h y 4 h post-irradiación UVC y los extendidos cromosómicos se prepararon siguiendo los procedimientos citogenéticos convencionales. Las metafases obtenidas fueron desnaturalizadas en HCl 2 M por 15 min a temperatura ambiente, lavadas (5x) con PBS, bloqueados los sitios inespecíficos con BSA 1 % + Glicina (30 mM) por 30 min (agitación) y finalmente lavadas nuevamente con PBS para proceder con la incubación de los anticuerpos por 30 min a 37°C. La concentración empleada del anticuerpo primario α-CPD (Cosmo Bio, USA) fue de 1:1500 y del anticuerpo secundario *Goat anti-mouse IgG FITC* fue de 1:500. Al terminar la incubación con cada anticuerpo los preparados fueron lavados con PBS y montados con Vectashield (Vector) con DAPI 1,5mg/mL. Se capturaron 100 metafases por preparado empleando el sistema de análisis microscópico automatizado Metafer4 (MetaSystems, GmbH). Para el análisis y cuantificación de la intensidad de fluorescencia verde emitida por FITC (marcación de CPD) en extendidos cromosómicos se utilizó el software Image J (NIH, USA).

### 4.9.1 Análisis estadístico del recuento de CPD a 2 h y 4 h post-irradiación UVC

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 y error estándar de la media). Estas pruebas son necesarias para determinar el tipo de pruebas estadísticas a emplear. Los gráficos fueron realizados 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, 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. Los resultados son expresados como media  $\pm$  SD.

### 5. RESULTADOS

### 5.1 Remodelación de la cromatina inducida por UVC

La primera evidencia que la remodelación de la cromatina ocurre durante la remoción de CPD proviene de las observaciones realizadas estudiando la accesibilidad al ADN de una nucleasa en células de mamífero irradiadas con UVC (Smerdon y Lieberman, 1978). Por lo tanto, para conocer si existía *a priori* algún estado de condensación diferencial de la cromatina en las células deficientes en la proteína CSB (UV61) con respecto a su contraparte normal (AA8), se analizó la frecuencia de AC inducidas por la nucleasa ADNasaI (Figura 10). El hecho que se observara una frecuencia similar de AC inducida por ADNasI en ambas líneas celulares, indica que no existe una diferencia en la estructura basal de la cromatina entre AA8 y UV61, lo cual fue confirmado mediante *in situ nick translation* (ISNT) aplicada sobre núcleos fijados de células AA8 o UV61 no expuestas a UVC.



**Figura 10.-** Porcentaje de células dañadas inducidas por 500, 1000 y 2000 unidades de ADNasaI electroporadas en células AA8 o UV61.

En la Figura 11 se muestra un panel de ISNT producido empleando dosis crecientes de ADNasaI (0,015 U/mL; 0,030 U/mL y 0,060 U/mL) en núcleos fijados de células confluentes de AA8 y UV61 irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup> de UVC y recuperadas a 0 h, 2 h y 4 h post-irradiación UVC. A las 2 h post-irradiación UVC se puede observar una mayor marcación fluorescente de color verde indicando la producción de un mayor número de cortes producidos por la ADNasaI tanto en células AA8 como en UV61 con una disminución de la contratinción con DAPI producto de la remoción de los fragmentos de ADN producido por la acción de la ADNasaI y los sucesivos lavados previo a la coloración con DAPI.



**Figura 11.-** Panel de *in situ nick translation* de núcleos fijados de células AA8 y UV61 detenidas mayormente en la etapa G1 del ciclo celular por confluencia (véase Figura 9), que fueron irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup> de UVC y recuperadas a 0 h, 2 h y 4 h post-irradiación, expuestos a 0,030 U/mL de ADNasaI. La fluorescencia verde corresponde a la incorporación de nucleótidos marcados en los sitios de corte de la ADNasaI, revelados luego con FITC. La fluorescencia azul representa la contratinción con DAPI.

En la Figura 12 se presenta el análisis cuantitativo promedio de la señal fluorescente verde así como la señal fluorescente azul de 50 núcleos expuestos a 0,030 U/mL de ADNasaI tomados al azar de dos experimentos realizados. En la Figura 13 se observa el análisis cuantitativo del área

promedio de los núcleos analizados en la Figura 12. La intensidad en la fluorescencia de color verde (Figura 12) así como el incremento en el área de los núcleos (Figura 13) están relacionadas con un mayor grado de decondensación de la cromatina producida por la irradiación UVC. Por otro lado, una disminución en la intensidad de la fluorescencia del color azul, que representa un incremento en la remoción de fragmentos de ADN producido durante los lavados post-exposición a la ADNasaI, estaría también relacionada con el incremento de la decondensación de la cromatina.



INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DEL DAPI Y EL FITC

**Figura 12.-** Representación gráfica del valor promedio de la intensidad de fluorescencia del DAPI (barras azules) y el FITC (barras verdes) por pixel (DAPI/AREA o FITC/AREA) medido en 50 núcleos fijados expuestos a 0,03 U/mL de ADNasaI provenientes de células AA8 y UV61 irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup>. (El error estándar de la media o EEM está indicado en la parte superior de las barras).

Por tanto, hemos podido observar a las 2 h post-irradiación UVC un incremento significativo de la decondensación de la cromatina tanto en AA8 como en UV61, evidenciado por el incremento de la fluorescencia en color verde y del área de los núcleos así como una disminución en la

intensidad de la fluorescencia del azul; la cual comienza a disminuir luego de las 4 h postirradiación UVC. En tal sentido, ha sido establecido un índice de relajación (IR) que correlaciona los parámetros antes mencionados del siguiente modo:

$$IR = FITC x AREA / DAPI$$



**Figura 13.-** Representación gráfica del promedio de las áreas de 50 núcleos teñidos con DAPI expuestos a 0,03 U/mL de ADNasaI provenientes de cultivos celulares de AA8 y UV61 confluentes tratados con 4 J/m<sup>2</sup> (El EEM está indicado en la parte superior de las barras).

En la Figura 14 se representa el IR obtenido del análisis de los datos cuantitativos de las intensidades de fluorescencia del DAPI y el FITC así como del área de 50 núcleos fijados expuestos a 0,03 U/ml de ADNasaI provenientes de células AA8 y UV61 confluentes tratadas con  $4 \text{ J/m}^2$  de UVC.



**Figura 14.-** Representación gráfica del índice de relajación (IR) empleando los valores obtenidos de las medidas de las intensidades de fluorescencias verde y azul así como el área en pixeles de 50 núcleos fijados expuestos a 0,03 U/mL de ADNasaI provenientes de células AA8 y UV61 tratadas con 4 J/m<sup>2</sup> de UVC. (\*) Representa una probabilidad de p<0,001 (Prueba estadística *t* de Student). El análisis comparativo del IR a 2 h post-irradiación entre AA8 y UV61 mostró una diferencia estadísticamente significativa: p<0,005 (Prueba estadística *t* de Student para muestras independientes).

El IR estimado a partir de los datos obtenidos al realizar la ISNT mostró un aumento significativo de la decondensación de la cromatina a las 2 h post-irradiación en ambas líneas celulares. A su vez, se pudo observar que la misma es un 30% inferior en UV61 con respecto a AA8 (diferencia estadísticamente significativa con una p<0,005), indicando una posible pérdida de eficiencia en dicho proceso en células que tienen alterada la proteína CSB. Por otro lado, a las 4 h post-irradiación se observó una recondensación de la cromatina según el IR estimado.

Con el fin de conocer si dicho proceso de relajación de cromatina está relacionada con un incremento en el nivel de acetilación de histonas, se llevó a cabo una inmunomarcación sobre núcleos de células AA8 y UV61 fijados con paraformaldehido empleando un anticuerpo antihistona H3 acetilada en posición lisina 9 (Lys9), lo que permite reconocer un estado de hiperacetilación en la histona H3 (Jeppesen et al., 1997). En la Figura 15 se muestra el resultado de una inmunomarcación de células AA8 y UV61 irradiadas con 4 J/m2, recuperadas a las 2 h post-irradiación, con un anticuerpo anti-histona H3 Lys 9 acetilada (AcK9H3), la cual evidencia un incremento en el patrón de acetilación de histonas en ambas líneas celulares, indicando que el proceso de relajación de cromatina está asociado a un incremento en el nivel de acetilación de histonas.



**Figura 15.-** Inmunomarcación empleando un anticuerpo anti-histona H3 Lys9 acetilada (AcK9H3) sobre núcleos de células AA8 y UV61 irradiadas con 4 J/m<sup>2</sup> y recuperadas a las 2 h post-irradiación UVC.

## 5.2 Efecto de los iHDAC (TSA) sobre la remoción del daño inducido por UVC

Dado el conocimiento que la inhibición de las desacetilasas de histonas por iHDAC produce un incremento en la tasa de reparación en los nucleosomas hiperacetilados en células de mamiferos

(Ura y Hayes, 2002; Dinant et al., 2008), hemos estudiado en células CHO competentes y deficientes en el sistema TCR de qué modo un iHDAC como la TSA afecta la remoción de los CPDs inducidos por UVC.

En primer lugar, para descartar un efecto de la TSA sobre el ciclo celular en AA8 y UV61, que pudiera afectar el correcto análisis del daño inducido por UVC, se analizaron los patrones de contenido de ADN mediante citometría de flujo. En la Tabla 2 y la Figura 16 se presenta la proporción de células en cada una de las etapas del ciclo celular (G1, S/G2-M) obtenidas mediante citometría de flujo, lo cual revelo que la TSA no produce una detención del ciclo celular de manera significativa.

Debido a que la irradiación UVC pertenece al grupo de agentes clastogénicos fase S dependientes, sólo aberraciones cromosómicas de tipo cromátida fueron observadas durante el análisis de las lesiones cromosómicas inducidas por 4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup> de UVC en presencia o ausencia de 50 ng/mL de TSA como se observa en los datos obtenidos del análisis de la frecuencia de las AC inducidas por UVC resumidos en la Tabla 3. En este sentido, en las Figuras 17 y 18 se representan en forma gráfica el porcentaje de células dañas o el total de AC observadas en 100 metafases, respectivamente, obtenidas luego de los tratamientos combinados antes mencionados. La presencia de la TSA llevo a un incremento de la frecuencia AC inducidas por UVC tanto en células competentes (AA8) como deficientes (UV61) en la proteína CSB. Es de destacar, que contrariamente a lo esperado en nuestra hipótesis de trabajo, la presencia de la TSA no solo no

favoreció la remoción del daño inducido por UVC evidenciado a través del recuento de las AC inducidas, sino que llevó a un incremento en ambas líneas celulares.

**Tabla 2.-** Análisis del ciclo celular de líneas celulares de Hámster Chino competentes y deficientes en la TCR, expuestas a UVC ( $4 \text{ J/m}^2 \text{ y } 8 \text{ J/m}^2$ ) en presencia de TSA (50 ng/mL) durante 4 h o en tratamiento continuo de 24 h analizado por citometría de flujo.

TRATAMIENTO		LINEA CELULAR						
TSA	Dosis UV (J/m²)	AA	48	UV61				
(50 ng)		G1	S/G2-M	G1	S/G2-M			
-	0	66,8± 3,34	33,2±3,34	65,0±4,71	35,1±4,70			
	4	59,2±4,57	40,8±4,58	46,3±4,28	53,7±4,28			
	8	51,3±1,22	48,7±1,21	45,2±1,25	54,8±1,24			
4 h	0	64,1±0,18	35,9±0,19	69,6±0,10	30,4±0,12			
	4	71,2±1,74	28,8±1,74	49,5±0,38	50,5±0,38			
	8	75,4±2,09	24,6±2,1	46±0,27	54,1±0,27			
Continuo	0	81,3±2,1	18,7±2,1	70,2±0,10	29,8±0,10			
	4	67,9±0,44	32,1±0,44	55,4±0,15	44,6±0,14			
	8	60,9±0,85	39,1±0,84	52±1,13	48,1±1,13			



b) % de Células Viables en la linea celular AA8









Figura 16.- Efecto de la TSA (50 ng/mL) y la irradiación con UVC (4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>) sobre el ciclo celular de líneas celulares de Hamster Chino competentes y deficientes en TCR analizado por citometría de flujo. Líneas celulares AA8 (b, d y f) y UV61 (a, c y e).

% de Células Viables en la linea celular UV61 c)

**Tabla 3.-** Total de aberraciones cromosómicas (ACs) en células CHO competentes y deficientes en la TCR, inducidas por UVC (4  $J/m^2$  y 8  $J/m^2$ ) en presencia de TSA (50 ng/mL) con pretratamiento 4 h o tratamiento continuo.

Línea celular	Tratamiento		Porcentaje de	Aberraciones tipo cromátida		Aberraciones tipo cromosoma			Total AC
	TSA 50 ng	UVC (J/m <sup>2</sup> )	células aberrantes	B´	EX	B″	EX	HDC	$(\overline{\mathbf{X}} \pm \mathbf{S}.\mathbf{D})^*$
		0	12	11,5	0	3	0	0	14,5±4,9
		4	44	50,5	1,5	3,5	0	0	55,5±14,4+
AA8		8	57	83	6	9	0	2	98,0±19,8+
	4 h	0	35	37,5	0	6,5	0	0	44±14,8
		4	48,5	59,5	0	7	0	0,5	66,5±16,2
		8	64	112	16,5	24	0	0,5	152,5±21,9+
	Cont.	0	45,5	54	0	13	0	0,5	67±21,9
		4	54	113,5	2	11	0	2,5	126,5±4,9+
		8	75,5	188	8,5	23	0	1,5	119,5±14,1+
UV61		0	16,5	18	0	0,5	0	0	18,5±0,7
		4	28,5	136,5	6,5	15	0	2,5	160±17,7+
		8	38,5	184,5	9	22,5	0	8,5	216±32,5+
	4 h	0	67,5	29	0	8,5	0	0	37,5±17,6
		4	66,5	136	9	22	0	2	166±1,4+
		8	78,5	276	19,5	46	0	8,5	341,5±32+
	Cont.	0	76	43	0,5	14,5	0	0	58±7,7
		4	88	184	7	27,5	0	0,5	218,5±31,1+
		8	94,5	531,5	2,5	72	0	4,5	606±24,7+

\* Promedio de alteraciones cromosómicas totales ± desviación estándar, resultado de 5 experimentos.

+ Estadísticamente significativo p<0,05 (Comparaciones múltiples Bonferroni).



**Figura 17.-** Porcentaje de células AA8 y UV61 dañadas por UVC (4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>), en presencia (pre-tratamiento de 4 h o continuo) o ausencia de TSA. El EEM está indicado en la parte superior de las barras.



## **PROMEDIO DE AC TOTALES**

**Figura 18.-** Promedio de aberraciones cromosómicas totales en células AA8 y UV61 expuestas a UVC (4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>), en presencia (pre-tratamiento de 4 h o continuo) o ausencia de TSA. El EEM está indicado en la parte superior de las barras.

A modo de conocer si el incremento de las ACs inducido por UVC observado en células competentes y deficientes en la TCR se debe a una mayor inducción de CPD debido al proceso de decondensación de cromatina inducido por la presencia de la TSA, se analizó la distribución de CPD inducidos por UVC (4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>) en presencia (pre-tratamiento de 4 h y continuo) o ausencia de TSA sobre metafases de AA8 y UV61 recuperadas a 2 h y 4 h post-irradiación, dado el proceso de decondensación observado en estas líneas celulares luego de la exposición a UVC.

Por tanto, en las Figuras 19 y 20 se presentan los paneles de inmunomarcación empleando anticuerpos anti-CPD sobre metafases fijadas de células AA8 provenientes de los tratamientos antes mencionados y recuperadas a las 2 h y 4 h post-irradiación, respectivamente. Del mismo modo en las Figuras 21 y 22 se presentan los paneles de inmunomarcación empleando anticuerpos anti-CPD sobre metafases fijadas de células UV61.

En las Figuras 23 y 24 se han graficado los datos cuantitativos de la intensidad de fluorescencia en verde (FITC) que representa la identificación de los CPD inducidos por UVC a 2 h y 4 h postirradiación en presencia o ausencia de TSA (tratamiento previo de 4 h o continuo). La remoción de CPDs parecería ser más eficiente con el pre-tratamiento de 4 h de TSA en células UV61, obteniendo un resultado estadísticamente significativo al comparar el nivel de CPDs a las 2 h y 4 h post-irradiación UVC, pudiendo indicar un efecto favorecedor en la remoción de los CPDs en estas células deficientes en la proteína CSB con la inhibición de desacetilasas de histonas previo a la irradiación UVC con de manera continua tiene un efecto contrario, impidiendo la correcta remoción de las lesiones inducidas por UVC, obteniéndose un dato estadísticamente significativo con el pre-tratamiento con TSA en este sentido.



**Figura 19.-** Inmunomarcación de CPDs en extendidos cromosómicos de AA8 obtenidos 2 h postirradiación UVC (4  $J/m^2$  y 8  $J/m^2$ ) en presencia de TSA (50 ng/mL) (4 h pre-irradiación UVC o tratamiento continuo).



**Figura 20.-** Inmunomarcación de CPDs en extendidos cromosómicos de AA8 obtenidos 4 h postirradiación UVC (4  $J/m^2$  y 8  $J/m^2$ ) en presencia de TSA (50 ng/mL) (4 h pre-irradiación UVC o tratamiento continuo).



**Figura 21.-** Inmunomarcación de CPDs en extendidos cromosómicos de UV61 obtenidos 2 h post-irradiación UVC ( $4 \text{ J/m}^2 \text{ y } 8 \text{ J/m}^2$ ) en presencia de TSA (50 ng/mL) (4 h pre-irradiación UVC o tratamiento continuo).



**Figura 22.-** Inmunomarcación de CPDs en extendidos cromosómicos de UV61 obtenidos 4 h postirradiación UVC (4  $J/m^2$  y 8  $J/m^2$ ) en presencia de TSA (50 ng/mL) (4 h pre-irradiación UVC o tratamiento continuo).



**Figura 23.-** Representación gráfica de la Intensidad de fluorescencia de FITC correspondiente a la inmunomarcación de CPD sobre extendidos cromosómicos de células AA8 obtenidos 2 h y 4 h post-irradiación UVC (4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>) en presencia de TSA (50 ng/mL) (4 h pre-irradiación UVC o tratamiento continuo). Todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Test de ANOVA Univariado; *p*<0,05). \* Diferencia estadísticamente significativa con un *p*<0,001 (Comparaciones múltiples *Bonferroni*).



**Figura 24.-** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de FITC correspondiente a la inmunomarcación de CPD sobre extendidos cromosómicos de células UV61 obtenidos 2 h y 4 h post-irradiación UVC (4 J/m<sup>2</sup> y 8 J/m<sup>2</sup>) en presencia de TSA (50 ng/mL) (4 h pre-irradiación UVC o tratamiento continuo). Todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Test de ANOVA Univariado; *p*<0,05). \* Diferencia estadísticamente significativa con un *p*<0,0001 (Comparaciones múltiples *Bonferroni*).

# 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Remodelación de la cromatina inducida por UVC

La irradiación UVC induce dos tipos de lesiones en el ADN: a) en un 80% dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y; b) en el 20% restante pirimidina-pirimidina 6-4 fotoproductos (6-4 PP). La reparación por NER es un mecanismo que remueve lesiones voluminosas producidas sobre el ADN como los CPD (Ford, 2005; Friedberg et al., 1995; Rastogi et al., 2010), el cual requiere de una adecuada remodelación de la cromatina para llevar a cabo la remoción de los mismos (Korolev, 2011). Como fuera mencionado previamente, el sistema NER cuenta con dos vías alternativas de reparación, una denominada GGR que remueve los CPD en todo el genoma menos en las zonas transcriptas y otra TCR que remueve estas lesiones en las zonas transcriptas y por tanto requiere de un sistema de remodelación de cromatina que permita hacer más eficiente la remoción de los CPD por parte del sistema NER en estas zonas del genoma. Por tanto, TCR es responsable por la acelerada remoción de las lesiones en el ADN de la hebra en transcripción portadora de genes activos, lo que constituye aproximadamente del 5% al 8% del genoma eucariótico. Las lesiones que son reparadas por TCR serían mínimas en comparación con las lesiones ocurridas en todo el resto del genoma. Por tal motivo, se esperaría sólo un leve incremento tanto en la inducción de apoptosis como de AC en las células UV61 deficientes en TCR en comparación con la línea celular parental AA8 (De Santis et al., 2001). Sin embargo, ha sido observado un incremento de 3 veces en la frecuencia de AC y células apoptóticas inducidas por UVC (De Santis et al., 2001; 2002). El hecho que la proteína involucrada en la falla del TCR, denominada CSB, forma parte de un sistema de remodelación de cromatina dependiente de ATP, siendo CSB una ATPasa remodeladora de cromatina (Selby 1997, Citterio 2000), nos ha llevado a pensar en la existencia de un cambio en la estructura basal de la cromatina que le permitiera un mayor acúmulo de lesiones inducidas por UVC. Sin embargo, los datos obtenidos mediante el análisis de la frecuencia de AC inducidas por la electroporación de la nucleasa ADNasaI en células AA8 y UV61 no reveló una sensibilidad diferente entre ambas líneas celulares mantenidas en cultivo (Figura 10). A su vez, nuestro grupo de investigación ha observado que la falla en TCR podría no ser la responsable del incremento en la frecuencia de AC observadas en células símil Síndrome de Cockayne expuestas a UVC, puesto que los sitios de fractura cromosómica se distribuyen al azar en las células UV61, en lugar de concentrarse en las regiones cromosómicas transcriptas como era esperado (Martínez-López et al., 2010).

Por otro lado, ha sido demostrado que la capacidad de remodelación de la cromatina previo a la remoción de las lesiones producidas por UVC es inducida por la proteína p53 en células de mamífero, la cual, a su vez, es capaz de atraer proteínas de tipo acetiltransferasas para incrementar los niveles de acetilación de histonas (Rubbi y Milner, 2003; Yu et al., 2005). Dado que las líneas celulares CHO empleadas en el presente trabajo poseen mutado P53, se ha podido confirmar que estas células transformadas aún mantienen un mecanismo de remodelación de la cromatina al ser expuestas a UVC (Figuras 11, 12, 13 y 14), y que este mecanismo se encuentra ligado a un proceso de acetilación de histonas (Figura 15). A su vez, ha sido posible determinar que las células UV61 poseen una menor capacidad para remodelar la cromatina al ser expuestas a UVC (Figura 14). El menor índice de relajación observado en células UV61 expuestas a UVC en relación a su línea parental AA8, sugiere que la proteína CSB está involucrada directa o indirectamente en la remodelación de la cromatina *in vivo*. En tal sentido, ha sido evidenciado por Fousteri et al. (2006) que en células derivadas de un individuo portador de Síndrome de Cockayne, la presencia de una

proteína CSB mutada no permite el adecuado reclutamiento de la proteína p300, una acetiltransferasa de histonas, involucrada en el proceso de remodelación de la cromatina inducido por UVC. Este hecho podría explicar la diferencia observada en nuestro modelo experimental de células de hámster Chino AA8 y UV61, en cuanto a la capacidad de remodelar la cromatina luego de la exposición a UVC.

Si bien es desconocido aún el mecanismo por el cual ocurre una disminución en la remoción de las lesiones inducidas en el ADN, es muy probable que los cambios en la conformación de la cromatina jueguen un papel importante en la interacción entre las proteínas de los sistemas de reparación de ADN y las regiones de cromatina donde se encuentran estas lesiones (Stevnsner et al., 2008). Proietti De Santis et al. (2006) han observado que existe hipoacetilación a nivel de las histonas relacionadas con los promotores de los genes regulados por CSB.

Si bien existe una contradicción aparente entre los datos observados empleando TSA (que induce hiperacetilación de histonas) y el fenotipo del Síndrome de Cockayne (caracterizado por hipoacetilación de histonas), ha sido evidenciado a través del empleo de micoarrays, que la expresión de genes regulados por CSB coincide con el nivel de expresión génica de células expuestas a TSA (Newman et al. 2006) (Figura 25).



**Figura 25.-** Muchos de los genes regulados por CSB son tambien afectados por inhibidores de desacetilasas de histonas como la Tricostatina A (Newman et al., 2006).

Estos datos publicados están acorde con los hallazgos obtenidos mediante el análisis de la frecuencia de AC inducidas por UVC en presencia de TSA en células competentes en CSB, las cuales mostraron una incremento del daño cromosómico similar al observado en células deficientes en CSB expuestas a UVC.

### 6.2 Efecto de los iHDAC (TSA) sobre la remoción del daño inducido por UVC

La cromatina no sólo juega un rol importante en la formación del daño (Martínez-López et al., 2000; 2001; 2004) sino también en la reparación de estas lesiones (Martínez-López et al., 2007;

Méndez-Acuña et al., 2010; Martínez-López et al., 2013). Por ejemplo, la actividad de escisión del sistema NER en el centro del core nucleosómico es aproximadamente 7 veces más lenta que en el ADN libre (Osley et al., 2007; Korolev, 2011). En tal sentido, ha sido demostrado que las histonas son hiperacetiladas luego de la exposición a UVC de modo de permitir una reparación más eficiente (Ramanathan y Smerdon, 1989). A su vez, ha sido evidenciado que un inhibidor de desacetilasas de histonas, como la TSA, induce un aumento global del nivel de acetilación, el cual provoca un estado cromatínico decondensado y aumenta en al menos dos veces la tasa de reparación en los nucleosomas hiperacetilados en células de mamíferos (Ura y Hayes, 2002). Debido a que la accesibilidad al ADN por parte de las proteínas de reparación se encuentra limitada por la presencia de los nucleosomas (Thoma 1999, 2005), se ha especulado que la organización de la cromatina en células símil Síndrome de Cockayne no es la adecuada para permitir la correcta remoción de lesiones en el ADN cuando son expuestas a UVC mediante TCR, conduciendo a un incremento en la frecuencia de AC inducidas por este agente. La disminución en la remodelación de la cromatina observada en UV61 2 h post-irradiación, sumado al hecho que la función primordial de la proteína CSB es la remodelación de la cromatina y el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas, sugiere que la deficiencia en la remoción de los CPDs inducidos por UVC en células símil Síndrome de Cockayne puede explicarse por una alteración en el proceso de remodelación de la cromatina asociado al TCR.

Por tal motivo, se planteó como hipótesis del presente trabajo de tesis la posibilidad que la modificación en el patrón de acetilación de histonas pudiera facilitar la remoción de lesiones inducidas por la irradiación UVC en células deficientes en TCR. El estudio de la frecuencia de AC inducidas por UVC en células CHO competentes y deficientes en TCR (en presencia o ausencia

de un inhibidor de desacetilasas de histonas como la TSA), mostró que, contrario a lo esperado, el incremento en los niveles de acetilación de histonas se correlacionó con un incremento en la frecuencia de AC inducidas, tanto en las células competentes como en las deficientes en la proteína CSB. En otras palabras, las células competentes en presencia de TSA, presentaron una sensibilidad a la irradiación UVC similar a la observada en células deficientes en TCR (Figuras 18 y 19).

Este aumento de la frecuencia de AC inducidas por la irradiación UVC en presencia de TSA, se correlacionó con una tendencia a la disminución en la remoción de los CPD inducidos por UVC en presencia de este inhibidor de desacetilasas de histonas en células competentes (Figura 24). Sin embargo, en el caso de las células deficientes en la proteína CSB se observó una tendencia a favorecer la remoción de los CPDs (Figura 25), sugiriendo que el incremento en el nivel de acetilación de histonas pudiera mejorar la accesibilidad a las proteínas del sistema TCR.

Si bien se esperaba una mayor remoción de CPDs en presencia de TSA y una disminución en la frecuencia de AC inducidas, esta aparente contradicción puede tener una posible explicación en el hecho que las modificaciones epigenéticas deben actuar con un adecuado balance en el nivel de acetilación de las histonas de modo de permitir una correcta interacción entre las proteínas del TCR y las proteínas histónicas para acceder al sitio donde se encuentran las lesiones en el ADN. En tal sentido, ha sido postulado que el desequilibrio en la acetilación de histonas estaría relacionado con las enfermedades neurodegenerativas, lo cual podría estar en la base del Síndrome de Cockayne caracterizado por un aumento en la frecuencia de apoptosis y neurodegeneración (Rouaux et al., 2004) (Figura 26).



**Figura 26.-** La sobrevida neuronal puede ser el resultado del adecuado balance entre las actividades HAT y HDAC (Rouaux et al., 2004).

Este modelo apoya la teoría que una fina regulación de los mecanismos epigenéticos, como es el caso del proceso de acetilación de histonas, es necesaria para el adecuado funcionamiento de una célula, y en particular, una apropiada interacción entre las proteínas del sistema TCR y las lesiones inducidas por UVC en el ADN.

## 7. CONCLUSIONES

- No existe una diferencia en la estructura basal de la cromatina en el modelo de líneas celulares CHO competentes y deficientes en la proteína CSB (células AA8 y UV61, respectivamente).
- 2) Si bien ambas líneas celulares son deficientes en p53, se confirmó la existencia de un proceso de decondensación de la cromatina a las 2 h post-irradiación UVC. Proceso que está acompañado con un incremento en el nivel de acetilación de la histona H3.
- Las células competentes en CSB (AA8) son capaces de alcanzan un nivel de relajación de cromatina superior al observado en células deficientes en CSB (UV61) a las 2 h postirradiación UVC.
- 4) El incremento en los niveles de acetilación de histonas producido mediante inhibición de las desacetilasas de histonas, fue capaz de producir un freno en la remoción de las lesiones inducidas por UVC, afectando mayormente a células competentes que a deficientes en la proteína CSB.

**Conclusión final:** el desequilibrio 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 deficientes en CSB (símil Síndrome de Cockayne) como en células competentes tratadas con TSA, al disminuir las interacciones requeridas entre las proteínas de los sistemas de reparación y las lesiones ubicadas en el ADN, debido a cambios en la conformación de la cromatina a través de modificaciones en las marcas epigenéticas.

### 8. PERSPECTIVAS

 Estudiar la distribución en el núcleo de proteínas del sistema de reparación por escisión de nucleótidos en células competentes y deficientes en la reparación acoplada a la transcripción expuestas a UVC en presencia o ausencia de inhibidores de desacetilasas de histonas, mediante técnicas de transfección celular. En tal sentido, se llevó a cabo una pasantía en el Laboratorio de Microbiología del IIBCE cuyo informe del desarrollo alcanzado se adjunta a continuación. Se empleó un plásmido PCNA-cherry donado por la Prof. Vanesa Gottifredi del Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica del Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina).

La proteína PCNA se une a la cromatina no solo en el proceso de replicación de ADN sino también en la síntesis de ADN que ocurre durante el proceso de reparación por escisión de nucleótidos o NER (Essers et al., 2005). El seguimiento de la asociación de PCNA a la cromatina post-irradiación UVC nos permitiría conocer el grado de afectación de la eficiencia del sistema TCR en células deficientes en CSB o competentes en presencia de TSA.

2) 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).

# 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adcock I.M., Ford P., Ito K., Barnes P.J. Epigenetics and airways disease. Respiratory Research (2006) 7(1): 21-40.
- Allison S.J., Milner J. Remodeling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. Carcinogenesis (2004) 25: 1551-1557.
- Belmont, A.S., Dietzel, S., Nye, A.C., Strukov, Y.G., Tumbar, T. Large-scale chromatin structure and function. Current Opinion in Cell Biology (1999) 11: 307-311.
- Carvalho H., Augusto da Costa R.M., Chiganças V., Weinlich R., Brumatti G., Amarante-Mendes G.P., Sarasin A., Martins Menck C.F. Effect of cell confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells. Mutation Research (2003) 544: 159-166.
- 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.
- 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.
- Deaven L.L., Petersen D.F. The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. Chromosoma (1973) 41: 129-144.
- 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
- Earnshaw W.C. Mitotic chromosome structure. Bioessays (1988) 9: 147-150.

- Ehrenhofer-Murray A.E. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. European Journal of Biochemistry (2004) 271: 2335-2349.
- Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., and Vermeulen, W. (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. Mol Cell Biol 25, 9350-9359.
- Frosina, G. (2007). The current evidence for defective repair of oxidatively damaged DNA in Cockayne
- Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature (1992) 355: 219-224.
- Ford J.M. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. 2005 Mutatation Research (2005) 577: 195-202.
- 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.
- 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.
- Hanawalt P.C. DNA repair. The bases for Cockayne syndrome. Nature (2000) 405: 415-416.
- Hanawalt P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. Oncogene (2002) 21: 8949-8956.
- Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature (2001) 41: 366-74
- Hou J., Feng C., Li Z., Fang Q., Wang H., Gu G., Shi Y., Liu P., Xu F., Yin Z., Shen J., Yin Z.,
  Wang P. Structure-based optimization of click-based histone deacetylase inhibitors.
  European Journal of Medicinal Chemistry (2011) 46: 3190-3200.

- Hwang B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C., Chu G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 424-428.
- Jenuwein T., Allis C.D. Translating the Histone Code. Science (2001) 293: 1074-1079.
- Kao F., Puck T.T. Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. J. Cell Physiol. (1969) 74: 245-257.
- 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.
- Kingston R.E., Narlikar G.J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. Genes & Development (1999) 13: 2339-2352.
- Korolev V. Chromatin and DNA damage repair. Russian Journal of Genetics (2011) 47: 394-403.
- 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.
- 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., Pellicioli A., Plevani P., Muzi-Falconi M. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. DNA Repair (2009) 8: 1055-1067.
- Luger K., Mäder A., Richmond R., Sargent D., Richmond T. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature (1997) 389: 251-260.
- Marañon D.G., Laudicina A.O., Mühlmann-Díaz M. *In situ* DNase I sensitivity assay indicates DNA conformation differences between CHO cells and the radiation-sensitive CHO mutant IRS-20. Cytogenetic and Genome Research (2004) 104: 100-103.

- Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing.Nature reviews Molecular cell biology, 15(7), 465-481.
- Martínez-López W., Porro V., Folle G.A., Mendez-Acuña L., Savage J.R.K., Obe G. Interchromosomal distribution of gamma ray-induced chromatid aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Genetics and Molecular Biology (2000) 23: 1071-1076.
- Martínez-López W., Folle G.A., Obe G., Jeppesen P. Chromosome regions enriched in hyperacetylated histone H4 are preferred sites for endonuclease- and radiation-induced breakpoints. Chromosome Research (2001) 9: 69-75.
- Martínez-López W., Folle G.A., Cassina G., Méndez-Acuña L., Di-Tomaso M.V., Obe G. Palitti
  F. Distribution of breakpoints induced by etoposide and X-rays along the CHO X chromosome. Cytogenetics and Genome Research (2004) 104: 182-187.
- Martínez-López W., Di Tomaso M.V., Méndez-Acuña L., Mühlmann M. Role of chromatin structure and activity in the induction of chromosomal aberrations. In: Chromosomal Alterations: Methods, results and importance in Human Health. (Obe G, Vijayalaxmi Eds.) Springer-Heidelberg-Germany (2007) pp 209-222.
- 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) http://dx.doi.org/10.5772/54709
- 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., Martinez-Lopez 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.
- Narlikar G.J., Fan H.-Y., Kingston R.E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. Cell (2002) 108: 475-487.
- 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. Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103: 9613-9618.
- Obe G., Winkel E.U. The chromosome breaking activity of restriction endonuclease AluI in CHO cells is independent of the S-phase of the cell cycle. Mutat. Res. (1985) 152: 25-29.
- Orren D.K., Dianov G.L., Bohr V.A. The human CSB (ERCC6) gene corrects the transcriptioncoupled repair defect in the CHO cell mutant UV61. Nucleic Acids 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.
- 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.
- 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.
- Puck T.T., Cieciura S.J., Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. Exp. Med. (1958) 108: 945-956.
- Ramamathan B., Smerdon M.J. Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes.J. Biol. Chem. (1989) 264: 11026-11034.
- Rastogi R.P., Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiationinduced DNA damage and repair. Journal of Nucleic Acids (2010) 2010: 592-980.
- Ray M., Mohandas T. Proposed nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (Cricetulus griseus). En: Hamerton J.L. Report of the Committee on Chromosome Markers. Cytogen. Cell Genet. (1976) 16: 83-91.
- 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.
- 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.
- Savage J.R.K. Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. J. Med. Genet. (1976) 13: 103-122.
- Selby C.P., Sancar A. Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNAstimulated 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.

- Siciliano M.J., Stallings R.L., Adair G.M. The genetic map of the Chinese hamster and the genetic consequences of chromosomal rearrangements in CHO cells. En: Molecular Cell Genetics (Gottesman M.M., ed.). John Wiley & Sons, New York, (1985) pp. 95-135.
- 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 UVinduced DNA- reapir synthesis. Proc Natl Acad Sci USA (1978) 75: 4238-41.
- 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.
- 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., 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.

- 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.
- Villar-Garea A. Epigenetic transcriptional repression of tumor suppressor genes and its revert ion by drugs. (2005) Tesis Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia.
- 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 (2006) 22: 383-394.
- Wolffe A.P., Khochbin S., Dimitrov S. What do linker histones do in chromatin?. BioEssays (1997) 19: 249-255.
- Wolffe A.P. Chromatin. Structure and Function (Third Edition). (1998) Academic Press.
- Yu Y., Teng Y., Liu H., Reed S.H., Waters R. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102: 8650–8655.
- Zhou B., Elledge S. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature (2000) 408: 433-439.

# ANEXO I

## **INFORME DE PASANTIA**

PASANTE: Bíol. Dayana Moreno Ortega

**TITULO DE TESIS:** "Cambios en los niveles de acetilación de histonas modulan la accesibilidad de proteínas del sistema de reparación por escisión de nucleótidos acoplado a la transcripción"

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología, IIBCE

Orientadores de Pasantía: Mag. Paola Scavone y Dr. Pablo Zunino

Tiempo de Duración: 200 h

El entrenamiento realizado en el Laboratorio de Microbiología, permitirá el desarrollo óptimo de las actividades planteadas en el proyecto de tesis de Maestría, lo que permitirá corroborar la hipótesis planteada que, cambios en la conformación de la cromatina producidos por el incremento en los niveles de acetilación de histonas modifican los sitios de reconocimiento para las proteínas de reparación del NER, disminuyendo la eficiencia de la remoción de los dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs). Esto mediante el desarrollo de protocolos de transfección de plásmidos de interés, proceso evaluado mediante ensayos de inmunocitoquímica en diferentes líneas celulares mencionadas previamente.

# 1. OBJETIVO

Adquirir experiencia en el manejo de técnicas microbiológicas generales, tales como:

- > Crecimiento y mantenimiento de cepas de *Escherichia coli*.
- Generación de bacterias competentes y transformación con plásmidos de interés (mCherry-PCNA y pCMUT).
- Obtención y purificación de los plásmidos mCherry-PCNA (proteína PCNA unida al fluorocromo mCherry) y pCMUT en la cepa de *E. coli* DH5α.

# 2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACION DE PLÁSMIDOS

# 2.1 Cultivo de la cepa *E. coli* DH5α

La pasantía inicia con una introducción en las técnicas de cultivo bacteriano (siembra o plaqueo), mantenimiento y congelamiento de la cepa de interés (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) (Figura1) y la preparación de medios de cultivo sólidos, líquidos y de congelamiento.



**Figura 1.** Cultivo de la cepa *E. coli* DH5  $\alpha$ , en medio sólido e incubadas a 37°C por 18 h aprox.

# 2.2 Células Competentes y Transformación con Plásmidos

Para generar bacterias químicamente competentes de la cepa de *E. coli* DH5  $\alpha$ , se empleó el protocolo tradicional basado en el uso de CaCl<sub>2</sub> y otras sales, con una eficiencia aproximada de 10 UFC/µg. Este protocolo consiste en la permeabilización de la pared de las bacterias y shock térmico para permitir el ingreso del plásmidos a la bacteria. Para la transformación se realizó la mezcla de las células competentes y ADN plasmídico de interés (pCMUT y mCherry-PCNA) y una serie de incubaciones caracterizadas por variaciones de temperatura (Figura 2).





El volumen total obtenido del proceso de transformación se cultivó en placas con medio sólido con el antibiótico especifico

para cada plásmido, esto asegura que las colonias obtenidas contengan el plásmido de interés. Como control de la transformación se cultivaron las bacterias transformadas en medio sólido sin antibiótico para evaluar la eficiencia y estado de las células competentes. Los clones resistentes al antibiótico, se seleccionaron y cultivaron nuevamente en medio sólido (para su congelamiento) y líquido suplementado con antibiótico especifico para cada una de las cepas transfectadas con los plásmidos. El cultivo en medio liquido se realizar para proceder la extracción de los plásmidos a pequeña escala (Miniprep).



**Figura3.-** Cultivo de los clones seleccionados. (A) DH5α/pCMUT. (B) DH5α/mCherry-PCNA.

# 2.3 Extracción del plásmido a pequeña escala o Miniprep

Se utilizó esta técnica para purificar una pequeña cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de unos pocos mililitros, con el objetivo de, por ejemplo, chequear mediante electroforesis en geles de agarosa si los clonados seleccionados poseen el plásmido de interés. Se utilizó el kit de Axygen Biosciences (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit) para el plásmido pCMUT y un protocolo estándar comúnmente utilizado para el plásmido mCherry-PCNA.

# 2.4 Extracción del plásmido a gran escala o Maxiprep.

Se utiliza esta técnica para producir una gran cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de 250 mL (Figura 4). Se empleo un protocolo estándar comúnmente utilizado para la extracción de los plásmidos pCMUT y mCherry-PCNA.



**Figura4.-** A. Inoculación de cepas al medio liquido (LB). B. Medio liquido inoculado después de 14 h de incubación a 37°C en agitación.

# 2.5 Purificación del ADN plasmídico.

Para la purificación del ADN plasmídico, se empleó un kit de QUIAGEN (QIAquick Gel Extraction). Esto consiste en la purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

# **3. RESULTADOS**

## **3.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACION DE PLASMIDOS**

Una vez realizada la selección de los clones mediante resistencia a antibiótico se procedió a chequear la presencia del plásmido pCMUT mediante extracción del mismo y visualización en geles de agarosa (Figura 5). Se observó que el plásmido obtenido del clon 3 no posee el tamaño esperado, a diferencia de los clones 1 y 2, como se puede observar en la Figura 5. Pero también hay que tener en cuenta que los clones 2 y 3 no crecieron en medio sólido. De acuerdo con este resultado se procedió a aislar y amplificar el clon 1, y otros dos clones que presentaban la misma morfología del clon de referencia, estos fueron los clones 10 y 11 (*E. coli* DH5 $\alpha$ +pCMUT).



**Figura 5.-** Miniprep pCMUT. Electroforesis de Gel de agarosa 0,8% de tres clones seleccionados ( clones 1, 2 y 3).Los carriles 2 y 3 corresponden al clon 1, clon 2 en el carril 4 y clon 3 carril 5.

Los siete clones seleccionados para el miniprep de mCherry, crecieron al ser aislados y repicados en medio sólido, y como se observa en la Figura 6, todas las muestras obtenidas del miniprep poseen el plásmido de interés. De acuerdo a esto se seleccionaron tres de los nuevos clones para ser sembrados y congelados (*E. coli* DH5 $\alpha$ +mCherry-PCNA)



**Figura6.-** Miniprep mCherry-PCNA. Electroforesis de gel de agarosa 0,8% de 7 clones seleccionados (clones 1, 6, 8, 18, 21y 28).

Para el Maxiprep de pCMUT se seleccionó el clon 1, el cual fue amplificado satisfactoriamente en medio solido suplementado con antibiótico específico para el plásmido y del cual al realizar el miniprep se observó una banda del tamaño esperado en el gel 0,8% de agarosa lo que nos permitió verificar que el clon1 contenia el ADNplasmidico de interes. El proceso mencionado anteriormente para la verificación del contenido ADN plasmídico fue el mismo para el plásmido mCherry-PCNA, y para esto se seleccionó el clon 10 para el Maxiprep de mCherry-PCNA. Los productos del Maxiprep se comparan con los obtenidos en el miniprep para ambos plásmidos como se observa en la Figura 7.



**Figura7.** Maxiprep de los plásmidos pCMUT y mCherry-PCNA. Carril 2 y 3 plásmido pCMUT, carril 4 y 5 mCherry-PCNA. Producto de miniprep carriles 2 y 4. Carril 3 y 5 productos del Maxiprep.

Para realizar la purificación de los plásmidos, previamente se realizo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % con los productos del Maxiprep. Con ayuda del trans-iluminador se ubicaron las bandas de interés y se procedió a cortar dichos fragmento de agarosa. Posteriormente se realizo el protocolo de purificación de los plásmidos empleando el kit de QUIAGEN (QIAquick Gel Extraction)(Ver figura 8).



**Figura 8.** Purificación de ADN plasmídico (pCMUT y mCherry-PCNA). pCMUT ( carril 2 producto maxiprep y carril 3 plásmido purificado). mCherry-PCNA (carril 4 producto maxiprep y carril 5 plásmido purificado).

Con ayuda del NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), se midió la concentración (ng/ $\mu$ L) de los plásmidos (pMUT y mCherry-PCNA), resultante de los protocolos de extracción de plásmido a gran escala ó maxiprep y de purificación.

## **3.2 TRANSFECCION DEL PLASMIDO mCherrry-PCNA**

Para la transfección del plásmido obtenido en los procesos descritos anteriormente se empleó la línea celular humana (U2OS) y se debe realizar en cultivos con aproximadamente 70% de crecimiento celular (Figura 10). Para la prueba de transfección se usaron tres plásmidos diferentes, 1: plásmido original 2: plásmido purificado y 3: plásmido sin purificar (plásmidos 2 y 3 son productos mCherry-PCNA obtenidos durante la pasantía); dado a la diferencia en la concentración de los plásmidos el volumen empleado de estos plásmidos varia.



Figura 10. Diseño experimental de la prueba de transfección en las células U2OS



**Figura11.-** Células U2OS transfectadas con mCherry-PCNA. (A) Plásmido original  $(0.5\mu g/\mu L)$ , (B) Plásmido purificado  $(0.07\mu g/\mu L)$  y (C) Plásmido sin purificar  $(0.14\mu g/\mu L)$ ,

# **4. CONCLUSIONES**

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN, ya que es un cofactor de la ADN polimerasa delta. Cuando existen daños en el ADN, la proteína PCNA se reubica y participa en la vía de reparación del ADN dependiente de RAD6 (CSB). En el plásmido mCherry-PCNA, la expresión de la proteína se da unida a un epítope fluorescente en este caso el mCherry de color rojo. Como se puede observar en la figura 11, el plásmido producido ingresa a las células y la proteína presenta una localización nuclear como es de esperarse, por lo que se concluye que el plásmido es óptimo para emplearse en el análisis de su distribución *in vivo* ante diversos tratamientos.

# **ANEXO II**

Capítulo publicado:

Wilner Martínez-López, Leticia Méndez-Acuña, Verónica Bervejillo, Jonatan Valencia-Payan and Dayana Moreno-Ortega (2013). Chapter 6: Chromatin Remodeling in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. DNA Repair - New Research Directions. Intech Open. 2013. <u>http://dx.doi.org/10.5772/54709</u>

# 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 wounded 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-



© 2013 Martínez-López et al.; licensee InTech. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 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 histories 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-XPD 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 damage 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  $\varepsilon$ -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 p53dependent 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 p53induced 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  $\varepsilon$ -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 mammaliam 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 aminoacid 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 E3ligating 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 UVCinduced 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-CUL4BDDB2 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
	РВАҒ	SMARCA4/BRG1, SMARCA2/BRM	myperacetylation manner [71]
INO80	INO80	INO80	Promotes the removal of UVC lesions
	TRRAP/Tip601	EP400/p400	—— (CPDs,6–4PPs) by NER in not transcribed regions [71]
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 UVCinduced 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 ISWIcontaining 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 Cock-ayne'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.

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

#### Abbreviations and acronyms

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
СНО	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
НАТ	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
К	Lysine
MBT	Malignant brain tumor
NER	Nucleotide excision repair
NURF	Nucleosome remodeling factor
p300	Histone acetyltransferase named p300
p53	Tumor supressor p53 gene
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PHD	Plant Homeo Domain
РІЗК	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	
Т	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<sup>\*</sup>, Leticia Méndez-Acuña, Verónica Bervejillo, Jonatan Valencia-Payan and Dayana Moreno-Ortega

\*Address all correspondence to: wlopez@iibce.edu.uy

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

## References

- Nag R, Smerdon MJ. Altering the chromatin landscape for nucleotide excision repair. *Mutation research* 2009; 682(1):13-20.
- 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, Herceg 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 UVinduced 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 ATPdependent 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, Lymar 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] Nouspikel 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 4Amediated 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] Marteijn 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 UVdamaged 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 ATPdependent 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. Chromatinremodelling 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.


