

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PARTICIPACIÓN DE DmP53 EN LA DISMINUCIÓN DE LA TRIMETILACIÓN DE LA LISINA 9 DE LA HISTONA H3 POR LA DESMETILASA DmKDM4B DESPUÉS DEL DAÑO AL DNA CON LUZ UV.

TESISQUEPARAOBTENERELGRADODE:DOCTORAENCIENCIASBIOQUÍMICASPRESENTM. en C.ZORAYAPALOMERASÁNCHEZ



TUTOR: Dr. MARIO E. ZURITA ORTEGA

CUERNAVACA, MORELOS.

JUNIO 2011



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el laboratorio 15 del edicficio Norte; bajo la tutoría del Dr. Mario E. Zurita Ortega, quién recibió apoyos de PAPIIT/UNAM no. IN 20109-3, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 48550, y fondos de *Howard Hughes Medical Institute*.

Los estudios de doctorado de la M. en C. Zoraya Palomera Sánchez fueron apoyados con una beca doctoral del CONACYT - 172741, y el complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado-UNAM (DGEP-UNAM) y los fondos de *Howard Hughes Medical Institute.*

El comité Tutoral que aseroró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Mario E. Zurita Ortega	Instituto de Biotecnología, UNAM.
Dr. Xavier Soberon Mainero	Instituto de Biotecnología, UNAM.
Dr. Félix Recillas Targa	Instituo de Fisiología Celular. UNAM.

La Dra. Viviana Valadez Graham brindó una excelente asesoría en el desarrollo de esta investigación.

La laboratorista Maria del Carmen Muñoz Garcia brindó un excelente apoyo logístico para el desarrollo de este proyecto.

El M.C. Andres Saralegui Amaro brindó un excelente apoyo con el uso del microscopio confocal.

El Dr. Ignacio Lopez Gonzalez brindó un excelente apoyo en los análisis estadísticos que se realizaron en esta investigación.

El jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Gustavo Pedraza Alva
Secretario	Dra. Denhi Schnabel Peraza
Vocal	Dr. David Romero Camarena
Suplente	Dra. Viviana Valadez Graham
Suplente	Dr. Mario E. Zurita Ortega

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Lidia y Porfirio que siempre me han apoyado en cada paso que he dado en el camino de mi vida (desde los primeros pasos que me llevaron al kinder hasta estos pasos que me llevan a culminar los estudios de Doctorado). Gracias de todo corazón mami y papi por ser mí mejor ejemplo de amor, trabajo y entrega a la vida.

A mi hermano Emilio que con sus bromas y consejos optimistas me hace ver lo positivo de la vida. A mi hermano Israel que a su manera me ha demostrado su apoyo y cariño.

A mi sobrinito Leonardo Gael, por ser el niño más guapo colmado de amor y alegría para mi familia y para mí.

A mi mamá Nico, por ser mi mejor ejemplo de fortaleza y optimismo.

A mi mamá Chuy, por todas sus oraciones que me hacen sentir el apapacho de Dios.

A mi prometido y gran amigo Orlando que llegó a mi vida a la mitad del doctorado, gracias amor por tu apoyo, escucha, consejos, paciencia, por felicitarme en los buenos momentos y por animarme en los tan buenos. Gracias por querer formar conmigo un solo camino de vida donde el amor y la presencia de Dios nos guiarán.

A mis amigas Judith Arias y Carla Vargas por ser ahora mis angeles ante Dios.

A mi tutor, Mario Zurita por abrime las puertas de su laboratorio, por guiarme y formarme en mi carrera científica, sobre todo por ser un científico con una gran calidad humana. Gracias Mario.

A mi gran amiga Viviana por ser mi gran ejemplo de mujer en la ciencia; sobre todo por su escucha, su guia, sus consejos tanto en el ambito científico como en personal.

A mi amiga y comadre Sandra, que el doctorado me dió la gran dicha de conocerla y ser madrina de Danna, gracias por su cariño, escucha y consejos. A mi amiga Dvorak por su guía en el principio de mi carrera científica, así como sus valiosos consejos ante la vida. A mi amiga Monica Santos, que por el qPCR nos volvimos muy buenas amigas, gracias por todos los momentos compartidos con el aroma de un rico café.

A mi hermanito en la ciencia Alejandro, por su gran corazón ante la vida y por su paciencia y entrega a la ciencia.

A todos mis demás amigas y amigos con los que Dios me ha bendecido por su presencia desde la primaria hasta el doctorado, les agradezco de manera muy especial por coincidir en algún punto del camino de mi vida y formar parte de ella. Gracias por saber SER y ESTAR!



Momentos de la vida que se saben saborear y disfrutar con ustedes mis amigos!!!!

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
ΙΝΤΡΟΠΙΟΟΙΟΝ	٥
1 a cromatina	9 Q
1.1 Tipos do cromatina	10
2 Dinamismo do la cromatina	10
2.1 Compleios remodeladores de la cromatina	12
2.1 Complejos remodeladores de la cromatina	16
2.2 Valiances de historias	17
2.3 1 Acotilación do historias	10
2.3.2 Matilación de historias	20
2.3.2 Desmotilación de historias	20
3 DNA dañado con luz LIV	27
3.1. Reparación por escisión de Nucleótidos (NER)	24
3.2 NER & cromating	25
3.2.1 Aportura de la cromatina	25
3.2.2. Restablecimiento de la cromatina después de la reparación	28
4 n53	20
τ. ρου	25
HIPÓTESIS	31
	0.
OBJETIVO GENERAL	31
Objetivos particulares:	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Irradiación con luz UV	32
2. Inmunotinciones de cromosomas politénicos	32
2.1 Preparación de cromosomas politénicos (Squash)	32
2.2 Inmunotinción	33
2.3 Análisis Estadístico	33
3. Ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	34
4. Obtención de cDNA	36
4.1 Extracción de RNA	36
4.2 Integridad del RNA	37
4.3 Preparación de cDNA	37
5. PCR tiempo real (qPCR)	38
5.1 Secuencias de los primers	39
6. Ensayo de sensibilidad a UV	40
7. Inmunotinción de Smuch	40
8. Inmunoensayo de reparación de CPDs	41
9. Electroforesis de proteínas de glándulas salivales de larvas de tercer ins	tar
	42
10. Western Blot	43

RESULTADOS	44
1. Disminución de los niveles globales de la 3meK9H3 después de irradiar con luz UV a la mosca wt, mientras que en la mosca mutada en p53 los niveles de esta marca aumentan	۲ 44
2. La disminución de la 3meK9H3 después de irradiar con luz UV ocurre preferentemente en regiones de la heterocromatina.	47
 2.1 3meK9H3 en heterocromatina constitutiva	48 / 49 50 51
3. Participación de la proteína KDM4B en la disminución de la 3meK9H3 después de irradiar con luz UV, proceso p53 dependiente.	53
 3.1 Moscas afectadas en el gen que codifica a la DmKDM4B son más sensibles a luz UV 3.2 La mosca EP-KDM4B/+ no remueve eficazmente los CPDs 3.3 DmKDM4B es la responsable de la disminución global y local de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV 3.4 Dmp53 activa trascripcionalmente a DmKDM4B 	56 57 59 62
DISCUSIÓN	64
 Disminución de la 3meK9H3 después de irradiar el DNA con luz UV 9 La disminución de la 3meK9H3 que se observa en las regiones de heterocromatina es dependiente de p53 La disminución de la 3meK9H3 observada después de la irradiación con luz UV, parece ser consecuencia de una desmetilación efectuada por DmKDM4B, de manera p53 dependiente	64 65 1 65 66
MODELO	67
ANEXOS 1. Restablecimiento de la cromatina después de la reparación del DNA 2. Dinamismo de la 3meK20H4 después de la irradiación con luz UV	69 69 70
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	73
BIBLIOGRAFÍA TESIS DIRIGIDA ARTÍCULOS PUBLICADOS	74 78 79

RESUMEN

El DNA de los organismos eucariotes es constantemente dañado por diferentes factores ambientales, entre los que destaca la irradiación por luz UV. Dado que este daño al DNA puede afectar la integridad celular, los organismos eucariotes lo corrigen a través de la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Sin embargo para que la maquinaría de NER pueda terner acceso al DNA, es importante la relajación de la cromatina, estructura que organiza y empaqueta el DNA dentro del núcleo. A la fecha ha sido ampliamente reportado un incremento en la acetilación de histonas, (modificación guímica gue relaja a la cromatina), después de la irradiación con luz UV. Específicamente se ha observado un incremento en los niveles de la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (AcK9H3), después del daño al DNA con luz UV, permitiendo así la correcta reparación del DNA por NER. Con base en lo anterior, en este trabajo decidimos analizar el comportamiento de la marca antagónica a la AcK9H3, la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3) después de la irradiación con luz UV. Observando un decremento de los niveles de 3meK9H3 en las regiones de heterocromatina después del daño al DNA con luz UV en Drosophila melanogaster. Además se demostró que la desmetilasa de histonas DmKDM4B es la responsable de este decremento, ya que la mutante en esta enzima son más sensibles a la luz UV y no reparan correctamente el daño al DNA por luz UV. Asimismo observamos un incremento de los niveles de DmKDM4B dependiente de p53, después de la irradiación. Finalmente proponemos que en respuesta al daño al DNA con luz UV, Dmp53 incremente la expresión de DmKDM4B para que desmetile la 3meK9H3 en las regiones de heterocromatina. Este proceso resulta esencial para que pueda llevarse a cabo la reparación por NER.

ABSTRACT

In response to UV DNA damage histone H3 lysine 9 becomes hyperacetylated (H3K9Ac). This acetylation relaxes the chromatin in order to allow the DNA to be repaired by the Nucleotide Excision Repair (NER) mechanism. The histone H3 lysine 9 trimethylated (H3K9me3), which is a typical mark of heterochromatin regions, antagonizes the H3K9Ac. Therefore we hypothesize that the H3K9me3 levels must decrease after DNA damage by UV irradiation. In the present work, we found that H3K9me3 levels decrease in heterochromatin regions after DNA damage by UV irradiation in Drosophila melanogaster. We show that this decrease takes place by the action of the DmKDM4B histone demethylase. DmKDM4B mutants are more sensible to UV irradiation and do not remove UV-DNA damage efficiently. This process is dependent on the Drosophila homologue for the human p53 protein (Dmp53). Thus we propose that in response to UV irradiation, Dmp53 enhances the expression of the DmKDM4B demethylase, which in turn demethylates H3K9me3 preferentially in heterochromatin regions. This mechanism seems to be essential for the correct function of NER.

INTRODUCCIÓN

1. La cromatina

En eucariotes, el DNA esta organizado en una compleja estructura conocida como cromatina, en donde la unidad básica de ésta es el nucleosoma. El nucleosoma está compuesto de un octámero de proteínas llamadas histonas, (dos copias de cada una de ellas), la histona H2A, la histona H2B, la histona H3 y la histona H4. A este octámero de histonas se unen 146 1.75 vueltas (1). Esta conformación permite la pb de DNA, abarcando formación de la estructura de 10nm, también conocida como "collar de perlas". A continuación a través de la histona H1, que se une al DNA entre cada nucleosoma o DNA linker, se favorece la formación de estructuras con mayor nivel de compactación, como lo es la estructura de 30 nm o solenoide (2). Posteriormente se forman largos loops que se anclan en la matriz nuclear a través de proteínas nucleares, constituyendo estructuras de mayor compactación. De esta manera el DNA es organizado dentro del núcleo interfasico. Por ultimo se sabe que el mayor estado de compactación de la cromatina se presenta en el cromosoma metafásico durante la mitosis o meiosis (3). Fig. 1.



Figura 1. Estructura de la cromatina. Figura basada en (3).

1.1 Tipos de cromatina

La cromatina dentro del núcleo se clasifica con base en su estado de condensación, el cual es en parte establecido por las modificaciones de las histonas, así como las enzimas responsables de éstas (3). Generalmente la cromatina ha sido clasificada en tres tipos: Eucromatina, Heterocromatina constitutiva y Heterocromatina facultativa. En lo que se refiere a la eucromatina, esta es considerada como el estado descondensado de la cromatina que representa un muy pequeño porcentaje del genoma y esta compuesta por secuencias codificantes (genes) que están transcripcionalmente activas (genes housekeeping). Es importante mencionar que la mayoría de las secuencias promotoras de estos genes activos contienen una muy baja densidad nucleosomal, lo cual garantiza una correcta actividad transcripcional. Por otro lado, la heterocromatina constitutiva es un estado permanetemente compacto de la cromatina que representa la mayor parte del genoma; está compuesta por secuencias repetidas y transposones que constituyen las regiones teloméricas, centroméricas y pericentroméricas. La función de esta heterocromatina es de suma importancia, al dar protección y estabilidad al genoma, así como al contribuir en la correcta organización de la arquitectura nuclear. Por último tenemos a la heterocromatina facultativa considerada como el estado de la cromatina con la capacidad de condensarse y descondensarse (algunas veces reversible). Esta compuesta por secuencias codificantes o genes cuya expresión depende propiamente de decisiones específicas durante el desarrollo. Un claro ejemplo de heterocromatina facultativa de manera irreversible, es la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las hembras (4).

Interesantemente se acaba de reportar la existencia de cinco tipos de cromatina en *Drosophila melanogaster*, tres de ellos corresponden a heterocromatina y dos a eucromatina (5).

 Cromatina verde: corresponde a la forma clásica de la heterocromatina, y abarca principalmente las regiones pericentroméricas. Las marcas de represión que predominan en esta cromatina, son la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (2meK9H3). Entre las proteínas que prevalecen se encuentran la metil transferasa de histona SU(VAR)3-9 (enzima responsable

de la metilación de la lisina 9 de la histona H3) y la proteína HP1 (*Heterochromatin Protein 1*).

- Cromatina azul: corresponde a la heterocromatina formada por dominios de Policomb (PcG), incluyendo así a los grupos génicos implicados en el desarrollo embrionario (genes Hox). Las marcas que caracterizan este tipo de cromatina son la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (3meK27H3). Mientras que las proteínas que predominan son las proteínas PcG y la metiltransferasa de histona E(Z) (*Enhancer de Zeste*).
- Cromatina negra: representa la mitad del genoma de *Drosophila*, compuesta por un bajo número de secuencias codificantes, sin embargo en ella se encuentran la mayoría de los genes silenciados transcripcionalmente. Ésta cromatina no presenta marcas de activación transcripcional. Sin embargo, presenta principalmente las proteínas: SUUR (*Suppressor of Underreplication*) esencial en el reclutamiento de SU(VAR)3-9 (enzima responsable de la metilación de la lisina 9 de la histona H3), SU(HW) (*Suppressor of Hairy-wing*) proteína que actua como *insulator* y la histona H1. Por lo tanto su principal función es el silenciamiento transcripcional.
- Cromatina amarilla y roja: Ambos tipos representan la región de eucromatina con un enriquecimiento en las marcas de activación transcripcional como la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (2meK4H3), la trimetilación de la lisina 79 de la histona H3 (3meK79H3). También se caracterizan por presentar proteínas remodeladoras de la cromatina como Brahma, así como la presencia de la RNA polimerasa. Sin embargo cuentan con algunas diferencias, en el caso de la cromatina amarilla está altamente enriquecida por la 3meK36H3, marcador universal de la elongación transcripcional, en este tipo de cromatina se encuentran los genes que mayormente se están transcribiendo y que están implicados en funciones universales de las células como, reparación de DNA, metabolismo de los ácidos nucleicos, etc. Mientras que la cromatina roja no presenta altos niveles de la 3meK36H3, en este tipo de cromatina se encuentran los genes que están implicados en funciones más específicas como unión a receptores, activación de factores de transcripción y señales de traducción (5).

2. Dinamismo de la cromatina

Como mencionamos, la cromatina es en parte un polímero de nucleosomas que debe ser flexible, es decir susceptible a compactarse o relajarse para permitir el desarrollo de los diferentes procesos nucleares como son la replicación, la trascripción, la recombinación y la reparación. Esta flexibilidad en la cromatina se efectúa a través de tres mecanismos: complejos remodeladores ATP dependientes, variantes de histonas y modificaciones post-traduccionales de las histonas (3-13). De esta manera, los organismos eucariotes mantienen la integridad del genoma mientras los procesos nucleares continúan trabajando. A continuación nos referiremos en detalle a los diferentes mecanismos que determinan la dinámica de la cromatina.

2.1 Complejos remodeladores de la cromatina

La función de los complejos remodeladores es cambiar el estado de la cromatina, para permitir la apertura o compactación de esta estructura. Esto lo logran a través de la hidrólisis de ATP, lo que permite alterar la unión DNA-histonas. Con base en el dominio catalítico de ATPasa, se han caracterizado cuatro familias de complejos remodeladores: SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80. (6), (Fig.2).



Figura 2. Familias de los complejos remodeladores de la cromatina. Clasificada acorde a los dominios que difieren al dominio catalítico de ATPasa (DExx-HELICc); SANT: dominio de unión a histonas, HSA: dominio Helicasa-SANT, Bromo: dominio de unión a lisinas acetiladas, Cromo: dominio de unión a lisina 9 metilada de la histona H3 (meK9H3), SLIDE: dominio SANT-like ISWI. Figura tomada de (6).

Las cuatro familias comparten las siguientes caracteristicas: afinidad por el nucleosoma o el DNA, similar dominio de ATPasa que funciona como un motor de translocación del DNA para permitir la disociación entre DNA-histonas, y dominios o proteínas que regulan la actividad de ATPasa (6) (Fig.2).



Figura 3. Mecanismo propuesto para uno de los remodeladores de la cromatina más importante SWI/SNF. A. SWI/SNF se posa sobre un nucleosoma. B. A través de la energía generada por la hidrólisis del ATP se debilita la unión DNA-histonas y el dominio de translocación (*Translocation Domain*) desliza el nucleosoma a la región que correspondía al DNA *linker.* C. Lo anterior desestabiliza el nucleosoma adyacente, separándose primero el dímero H2A-H2B. D. Posteriormente, el nucleosoma posicionado por SWI/SNF es deslizado al DNA que correspondía al nucleosoma adyacente, y éste nucleosoma adyacente es expulsado. Figura tomada de (7).

SWI/SNF

La familia de remodeladores SWI/SNF (*switching defective/sucrose nonfermenting*), fue identificada por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*. Los complejos proteícos de esta familia estan compuestos de 8 a 14 subunidades dependiendo del organismo en que se encuentren. Esta familia se distingue por tener un domino HSA (Helicasa-SANT) en su extremo amino y un bromodominio en su extremo carboxilo. La función de esta familia de remodeladores es deslizar y expulsar nucleosomas en diferentes procesos de apertura (Fig.3). A la fecha no se han implicado en procesos de reconstitución de la cromatina (6).

ISWI

La familia de remodeladores ISWI (*Imitation Switch*) esta compuesta por 4 subunidades. Uno de sus complejos mejor conocidos es NURF (*Nucleosome Remodeling Factor*), el cual fue identificado por primera vez en *D. melanogaster*. Esta familia se caracteriza por poseer en su extremo carboxilo un dominio SANT y un dominio SLIDE, juntos estos dos dominios forman un módulo de reconocimiento nucleosomal, con la capacidad de unirse a histonas no modificadas y DNA. La función de esta familia es optimizar el espacio nucleosomal, así como participar en el ensamble de la cromatina y la represión transcripcional. Sin embargo algunos complejos NURF pueden asistir la activación de la RNApol II, espaciando azarosamente a los nucleosomas (6).

CHD

La familia de remodeladores CHD (*Chromodomain, Helicase, DNA binding*) en promedio combinan 5 subunidades, como el complejo Mi-2 que fue caracterizado en *Xenopus laevis*. Esta familia posee en el extremo amino dos arreglos *tandem* de cromodominos. La función principal de esta familia de remodeladores es deslizar o expulsar los nucleosomas para promover la transcripción. Sin embargo existen algunos complejos dentro de esta familia como Mi-2/NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*) que contiene una desacetilasa de histonas (HDAC1/2) y proteínas con dominios MBD (dominios de unión a islas CpG metiladas), que participan en represión transcripcional. La diversidad de la familia CHD podría deberse a la diversidad de sus cromodominios (dominio de unión a meK9H3) (6).

INO80

La familia de remodeladores INO80 (*Inositol requiring 80*), contiene más de 10 subunidades, incluyendo el complejo SWR1 que fue inicialmente purificado en *S. cerevisiae.* Esta familia se distingue por tener una larga inserción entre el dominio ATPasa y el dominio helicasa, y un domino HSA (Helicasa-SANT) en su extremo amino. La familia de INO80 presenta diferentes funciones como la promoción de la actividad transcripcional y la reparación del DNA. Además el complejo SWR1 de esta familia presenta una función muy particular en la reestructuración del nucleosoma, al intercambiar el dímero H2A-H2B por el dímero H2A.Z-H2B (6).

Las actividades de los remodeladores de la cromatina son vitales para que los diferentes procesos celulares se lleven a cabo; como por ejemplo en la replicación de DNA se sabe que SWI/SNF promueve la iniciación de la replicación en levadura. Mientras que los remodeladores ISWI participan ampliamente durante todo el proceso de replicación, facilitando la progresión de la horquilla de replicación. Por otro lado en la reparación del DNA los complejos SWI/SNF e IN080 son reclutados a los sitios de DNA dañado para permitir la relajación de la cromatina y la correcta reparación del DNA. Finalmente, durante la activación de la transcripción del DNA, ISW2 organiza la cromatina para permitir el deslizamiento de los nucleosomas en los sitios de inicio de la trascripción. Mientras que en la represión transcripcional ISW2 coopera física y funcionalmente con la desacetilasa HDAC (RPD3) para reprimir las zonas activas en el genoma de levadura (6).

2.2 Variantes de histonas:

Otro mecanismo importante por el cual la estructura de la cromatina puede ser modulada es por el reemplazo del core de histonas por sus correspondientes variantes. Las variantes de histonas juegan un papel principalmente en la segregación de los cromosomas, la regulación transcripcional y la reparación del DNA (8). A continuación se describen las variantes de histonas identificadas hasta la fecha.

H3.1

La variante de histona H3.1 es incorporada en la cromatina mediante la vía dependiente de la replicación del DNA, a través de la proteína chaperona CAF1 (*Chromatin Assembly Factor* 1). Esta histona es importante para el ensamble de la cromatina y la reparación del DNA dañado por luz UV (8).

H3.3

La variante de histona H3.3 difiere solo en cuatro aminoácidos de la variante H3.1. Su reemplazo es mediante una vía independiente de la replicación del DNA, a través de la proteína chaperona HIRA (*Histone Regulator A*). Esta variante es depositada en regiones activas transcripcionalmente, promotores y elementos regulatorios; participando tanto en la activación como en la elongación transcripcional (8). Sin embargo, un trabajo reciente reportó que la variante H3.3 es depositada también en telómeros (heterocromatina) por las proteínas ATRX-DAXX, que funcionan como chaperonas de esta variante en las regiones teloméricas (9).

CENP-A

CENP-A o variante H3 centromérica. Esta variante de la histona H3 es la variante menos conservada respecto a la H3 canónica. Es esencial para el ensamble del cinetocoro, desempeñando un papel muy activo en la segregación de los cromosomas. CENP-A también es importante para el correcto ensamble y mantenimiento de la heterocromatina centromerica y pericentromérica. (3,8).

H2A.Z

La variante H2A.Z difiere respecto a la histona H2A en el extremo carboxilo donde se encuentra un dominio de unión a la histona H3. Su reemplazo es a través de complejos remodeladores SWR1. Esta variante presenta dos funciones opuestas: de activación y represión transcripcional. En la actividad transcripcional, esta variante es depositada en las regiones promotoras libres de nucleosomas y en los sitios de inicio de la transcripción, favoreciendo el reclutamiento de la RNA pol II. Mientras que en la represión transcripcional es depositada en la heterocromatina y en los elementos que delimitan a la heterocromatina para evitar su expansión (8).

H2A.X

La variante H2A.X también difiere en su extremo carboxilo respecto a la H2A, por poseer un residuo de Serina que es rápidamente fosforilado. Esto permite la formación de la histona H2A.X fosforilada (γ H2A.X), la cual aparece en respuesta al daño al DNA por ruptura de la doble cadena (DSB: *Double Strand Break*), y su función es activar el reclutamiento de la maquinaria de reparación, de enzimas modificadoras de histonas así como de complejos remodeladores (8).

2.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas.

Las modificaciones químicas que ocurren en las colas de las histonas son uno de los mecanismos más estudiados en el paso de heterocromatina a eucromatina (o viceversa), (Fig.4). Entre estas modificaciones químicas de las histonas resaltan: la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación, ADP-ribosilación y biotinilación. (10,11), (Fig4).



Figura 4. Modificaciones de las histonas que predominan en heterocromatina y en eucromatina. (me: metilación, Ac: acetilación, p: fosforilación, Ub: ubiquitinación, Sumo: Sumorilación. K: lisina, H3: histona 3, H4: histona 4, H2A: histona 2A, H2B: histona H2B). Figura basada en (3,11).

la acetilación de histonas promueve la activación Brevemente. transcripcional al participar de manera muy directa en la relajación de la cromatina. La fosforilación de histonas presenta dos funciones: una en la actividad transcripcional por la fosforilación de la serina 10 de la histona H3, fosforilación que promueve la acetilación de la lisina 14 en la misma histona (ambas modificaciones son necesarias para contribuir a la relajación de la cromatina). La segunda función de la fosforilación es la condesación y segregación cromosomal al fosforilarze la histona H1 y H3. La metilación de histonas es una modificación más versátil al participar tanto en activación como en represión transcripcional, todo depende de los residuos metilados. La ubiquitinación también participa en ambos procesos transcripcionales: de activación (con la ubiguitinación de la lisina 123 de la histona H2B) y de represión (con la con la ubiguitinación de la lisina 119 de la histona H2A). La sumoilación de hisotnas solo ha sido relacionada con la represión transcripcional, a la fecha se ha descrito que todas las histonas excepto la H3 son sumoiladas en diferentes residuos. La ADP-ribosilación a diferencia de la sumoilación, esta implicada con la actividad transcripcional y principilamente se produce en la histona H1 y la H2B. Por último, la Biotinilación de histonas que esta relacionada con la represión de la cromatina y se encuentra principalemente en regiones repetidas y en los telómeros (11).

A continuación se describen detalladamente las modificaciones con las cuales se trabajó en este proyecto.

2.3.1 Acetilación de histonas

La acetilación es la modificación postraduccional más estudiada a la fecha. Se lleva a cabo por las enzimas acetil transferasas de histonas (HAT). La función de las HATs es transferir un grupo acetilo a partir de la acetil coenzima A (CoA-CO- CH_3), a ciertas lisinas (K-NH₃+) localizadas en el extremo amino terminal de las histonas (Fig.5). La acetilación de la lisina neutraliza la carga positiva de la histona, lo cual debilita la unión DNA-histonas (3). Se ha propuesto que esto desestabiliza la estructura del nucleosoma, ocasionando un relajamiento de la cromatina. Apoyando esto, recientemente se reportó que la acetilación de los extremos amino terminal de las histonas afecta la interacción que ocurre entre nucleosomas (12). Las cuatro histonas son susceptibles de acetilación, pero cabe resaltar que las histonas H3 y H4 son las más acetiladas; la histona H3 es acetilada en las lisinas K9, K14, K18 y K23, mientras que la histona H4 es acetilada en las lisinas K5, K8, K12 y K16. La acetilación de las histonas es una reacción reversible la cual es llevada a cabo por las enzimas desacetilasas de histonas (HDACs). Estas enzimas son las encargadas de mantener un balance entre los estados de acetilación y desacetilación de la cromatina. (3,11), (Fig.5).



Figura 5. **Mecanismo de acetilación-desacetilación de histonas**. Figura basada en (3,11).

2.3.2 Metilación de histonas

La metilación de las histonas se lleva a cabo por las metiltransferasas de histona (HMTs), enzimas que metilan principalmente los residuos de lisina K (4, 9, 27, 36, 79 -H3 / 20-H4)) y arginina R (2, 17, 26-H3 / 3-H4) (3). El dominio catalítico de las HMTs es el SET (Su(var)3-9, Enhancer de Zeste E(z) y Trithorax (trx) (11). La lisina (K) es el residuo que mayormente es metilado por las HMTs, debido a que este residuo puede ser mono, di o trimetilado (Fig.6). La metilación de las histonas principalmente ha sido relacionada con cromatina compacta, sin embargo existen ciertos residuos metilados relacionados con la relajación de la cromatina, todo depende del residuo metilado y del contexto molecular en el que se encuentren. Los residuos que más comúnmente se encuentran asociados a sitios de cromatina compacta son: la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3), la metilación de la lisina 27 de la misma histona y la lisina 20 de la histona H4 (3,10). La metilación de la lisina K9 de la histona H3, en especifico la trimetilación de dicho residuo (3meK9H3) ha sido principalmente implicada en la formación de la heterocromatina, en el imprinting, en activación y en silenciamiento transcripcional (11,13).

Ésta modificación funciona como blanco para los cromodominios de diferentes proteínas, como por ejemplo HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), proteína esencial en la formación de la heterocromatina (13). Además existe evidencia que la 3meK9H3 incrementa la afinidad de unión a HP1 (14) (Fig.6).



Figura 6. La metilación de la lisina K9 es la principal responsable de la formación de la heterocromatina. Figura basada en (11).

Un estudio bioinformático reveló la existencia de 24 posibles sitios de metilación en histonas y si tomamos en cuenta que esta marca se puede presentar en estado de mono, di o trimetilación, potencialmente podrían existir 3x10¹¹ distintas combinaciones de metilación en la histonas (15). Aunque no todas estas combinaciones podrían ser usadas específicamente, este prominente cálculo revela el vasto potencial que se requiere para la regulación de ésta modificación, y la enorme tarea de entender cómo es que trabaja la metilación.

2.3.3 Desmetilación de histonas

Anteriormente se pensaba que las metilaciones en las historias eran una marca inalterable, que solo era capaz de quitarse mediante proteólisis o remoción de la histona que contenía la marca (16). Sin embargo recientemente se encontraron proteínas capaces de desmetilar a las histonas. Las primeras desmetilasas de histonas estudiadas fueron las LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1), capaces de remover mono-metilaciones y di-metilaciones mediante una oxidación dependiente de FAD⁺ (16). Recientemente se encontró a otro tipo de desmetilasas de histonas que contienen un dominio Jumonji (JmjC) con capacidad de quitar tri-metilaciones de lisinas, usando Fe(II) y α cetoglutarato como cofactores (17). Además del dominio JmjC, también presentan un dominio JmjN que confiere estabilidad a la proteína, así como diversos dominios de unión a histonas como PHD y Tudor (18), (Fig. 7). En un principio esta familia fue nombrada como JMJD2 (Jumonji Demethylase 2), pero recientemente fue renombrada como la familia KDM4 (Lysine Demethylase 4). Las desmetilasas que destacan de esta familia son: KDM4A, KDM4B, KDM4C y KDM4D. KDM4A y KDM4C desmetilan a la tri- y dimetilación de la lisina K9 y la lisina K36 de la histona H3. KDM4D desmetila tri-, di- y monometilación de la lisina K9H3. KDM4B desmetila la trimetilación de la lisina K9 de la histona H3. La función general de estas desmetilasas a nivel celular es la activación o represión de genes, y esto depende del residuo de lisina desmetilado. El principal residuo desmetilado por esta familia KMD4 es la 3meK9H3 (17,18) A la fecha se sabe que de estas desmetilasas solo existen dos ortólogos en Drosophila melanogaster. dKDM4A y dKDM4B. Sin embargo solo dKDM4B es capaz de desmetilar a la **3meK9H3** en *Drosophila* (19,20), (Fig. 8).



Figura 7. **Desmetilasa de las trimetilaciones de las histonas (JMJD2)**. A: Mecanismo de reacción. B: Dominios de las proteinas JMJD2 (JmjN: domino que da estabilidad, JmjC: dominio catalítico, PHD y Tudor: dominios de unión a histonas). C: Estructura tridimensional. Figura tomada de (18).



Figura 8. **Miembros de la familia (JMJD2)KDM4**. En esta figura destacamos a dKDM4B la única enzima responsable de la desmetilación de la 3meK9H3 en *Drosophila melanogaster*. Figura tomada de (20).

Esto trajo nuevas perspectivas sobre cómo se pueden mantener dinámicas las metilaciones en las histonas en los diferentes procesos nucleares, contribuyendo así a mantener la integridad del genoma. Sin embargo dicha integridad es muchas veces comprometida por diferentes agentes genotóxicos como lo es la irradiación con luz UV (21).

3. DNA dañado con luz UV

Las irradiaciones por luz UV son uno de los principales agentes que constantemente están dañando al DNA. Entre las lesiones que ocasionan estas irradiaciones se encuentran: los dimeros de ciclobutano de pirimidina (CPDs) y los 6-4 pirimidin-pirimidona photoproducts (6-4PPs) (22). Los CPDs se producen solo en el DNA nucleosomal, ocasionando un distorcionamiento en el DNA de aproximadamente de 7-9 °. Estos dímeros se presentan en un 70-80% de todo el genoma. Mientras que los 6-4PPs se producen en el DNA *linker*, ocasionando un distorcionamiento de 44° en la doble hélice y con una incidencia en el genoma de 20-30% (22,23). Los CPDs son reparados más lentamente que los 6-4PPs, esto se puede deber a dos cosas; una a que se producen en el DNA-nucleosomal requiriéndose una mayor relajación para acceder a ellos y la segunda se podría deber a que a los 6-4PPs son reconocidos más rápidamente debido a que ocasionan un aducto mayor en el DNA (24), (Fig. 9).



Figura 9. **Daño al DNA con luz UV**. Se forma un aducto en el DNA por los dimeros de pirimidina: CPDs y 6-4PPs. Figura basada de (22,23).

3.1 Reparación por escisión de Nucleótidos (NER)

Los CPDs y los 6-4PPs son principalmente reparados por la reparación por escisión de nucleótidos (siglas en inglés: NER). El mecanismo de NER a su vez se subdivide en dos tipos: la reparación general del genoma (siglas en ingles GGR) que repara las lesiones a lo largo del genoma y la reparación acoplada a la transcripción (siglas en inglés TCR) que repara regiones activas transcripcionalmente (25). Las dos vías difieren sólo en el reconocimiento del daño, es decir, en GGR quien reconoce el daño son las proteínas XPC-HR32B y DDB2, mientras que en TCR el reconocimiento se lleva a cabo por el estancamiento de la RNApol II en el sitio dañado. Después es reclutado el complejo TFIIH, quien a través de la actividad de helicasa de XPD (5'-3') y la actividad de ATPasa de XPB, abre la cadena de DNA. Posteriormente XPA y RPA estabilizan el complejo de reparación para que se puedan reclutar las endonucleasas XPG y ERCCI-XPF. Estas enzimas son responsables de la incisión del DNA dañado, después se sintetiza nuevo DNA y por último actúan DNA ligasas para sellar la mella presente en el DNA (26). En el mecanismo de reparación de DNA por NER, el dinamismo de la cromatina es muv importante. Debido a que la cromatina es el blanco primario de los agentes que dañan al DNA (como lo es la luz UV), siendo ésta la plataforma para que las enzimas de la maquinaria de reparación actúen (27), (Fig. 10).

3.2 NER & cromatina

Entender cómo ocurre *in vivo* el proceso de reparación del DNA en un contexto de cromatina es aún un reto. En términos generales, para que la reparación del DNA se lleve a cabo, primero es necesario que se localice el sitio de la lesión, posteriormente se relaje la cromatina, (para que la maquinaria de reparación tenga acceso al DNA), se repare el daño y por último se restablezca la estructura inicial de la cromatina (27), (Fig. 10).



Figura 10. **Mecanismo de NER**: 1. Reconocimiento del DNA dañado, 2. relajación de la cromatina. 3 Formación de la burbuja de reparación. 4. Escisión de la cadena de DNA dañada. 5. Síntesis de la nueva cadena de DNA. 6. Restablecimiento de la cromatina. Figura tomada de (28).

3.2.1 Apertura de la cromatina

En el mecanismo de NER, la vía de reparación TCR presenta una mejor eficiencia de reparación que la reparación GGR (29). Esto se podría deber a que en TCR el DNA dañado es reconocido más rápidamente por el propio estancamiento de la RNApolII, y por la cromatina relajada presente en las regiones activas transcripcionalmente. A diferencia de esto, en las regiones compactas de la cromatina (GGR) se requiere la participación de XPC-HR23B, complejo que solo reconoce los 6-4PPs y no los CPDs. Por tanto XPC-HR23B requiere unirse a la proteína DDB2 para poder reconocer los CPDs (30). Se sabe que DDB2 se encuentra formando un pequeño complejo DDB1-DDB2-CUL4-RBX1 que al unirse al DNA dañado monoubiquitina a la histona H2A (31). Además el complejo Cul4-DDB1-DDB2-ROC1 ubiquitina a las histonas H3 y H4 en las regiones de daño (32). Estas modificaciones debilitan la unión DNA-histonas ocasionando distorsionamientos en la cromatina que podrían ser ahora reconocidos por otras proteínas que la relajen aún más, como podrían ser los complejos remodeladores. El complejo SW1/SNF facilita el mecanismo de NER in vitro e in vivo e interacciona con algunas proteínas que reconocen Además, recientemente se ha reportado la el daño al DNA (33-35). participación de otro complejo remodelador, INO80, el cual facilita la reparación por NER en las regiones no transcritas (36). Tomando en cuenta la importancia que representa la relajación de la cromatina para la correcta reparación de las regiones de GGR, existen numerosos estudios que muestran la significativa intervención de la acetilación de las histonas en el proceso de relajación vía daño al DNA por luz UV (37-42). En este sentido se reportó que células de levaduras mutadas en la histona acetiltransferasa Gcn5 no reparan correctamente el DNA dañado por UV (38). También se ha observado un incremento muy significativo en los niveles de acetilación de la histona H3 después de irradiar levaduras con luz UV (39). Es interesante mencionar que el incremento de la acetilación ocurre antes que el proceso de NER en levadura; esta conclusión se basa en que los niveles de acetilación se mantienen post-UV en cepas mutadas en rad4 o rad14, proteínas que participan en el reconocimiento de NER (40). Además, rad 16 (proteína homologa a snf2, que es la subunidad catalítica de SWI/SNF), media un estado de hiperacetilación en las histonas después de la irradiación UV (41). También se ha demostrado

que el supresor tumoral p53 favorece la relajación global de la cromatina después de dañar a células humanas con luz UV (42). En este trabajo se observó un incremento de los niveles de acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (AcK9H3) después de la irradiación, esto por el reclutamiento a los sitios de daño de la HAT p300 por la proteína p53 (42). Situación similar fue observada nuestro laboratorio, donde se demostró que Drosophila melanogaster en presenta un incremento en la AcK9H3 después de la irradiación con luz UV y este incremento también es dependiente de Dmp53, proteína homologa a p53 de humano (43). A diferencia de la acetilación, que ha sido ampliamente estudiada en el proceso de NER. la metilación de las histonas solamente se ha analizado la metilación de la lisina 79 de la histona H3. Ésta marca incrementa después de la irradiación con luz UV y podría estar implicada en la apertura de la cromatina post-UV, debido a que células de levaduras mutadas en la lisina K79 muestran una disminución en la apertura de la cromatina en el locus silenciado HML y un reclutamiento de las proteínas SIRs (desacetilasas de histonas) (44). Por tanto, seria muy importante estudiar el comportamiento de otras marcas de metilación de histonas en respuesta al daño al DNA por luz UV. Por ejemplo la metilación de la K9 de la histona H3 (3meK9H3), marca antagónica a la ya ampliamente estudiada AcK9H3 en este tipo de daño. Hasta aquí hemos hablado de diferentes vías que permiten la relajación de la cromatina para exponer el DNA dañado a la maguinaria de NER. Pero una vez reparado el DNA, se debe restablecer la estructura de la cromatina.

3.2.2 Restablecimiento de la cromatina después de la reparación

Una vez que el DNA es reparado por el proceso de NER, una serie de eventos deben presentarse para la reestructuración de la cromatina. A la fecha solo existen dos trabajos enfocados a entender este punto. El primero de ellos reporta que una vez reparado el DNA se incorpora una nueva histona, la H3.1, en el sitio que fue reparado y esta incorporación es dependiente de NER (45). La proteína chaperona encargada de esta incorporación es CAF-1. La incorporación de esta variante de histona, representa una marca epigenética de memoria para las regiones de DNA que fueron reparadas por NER (45). En otro trabajo se observa la monoubiquitinación de la histona H2A después de la

escisión del DNA dañado, también esta marca epigenética es dependiente de NER. Además en este trabajo se demostró que es necesaria la presencia de CAF-1 para la correcta formación de los focos de monoubiquitinación de la histona H2A (46). Posiblemente estas marcas sean el comienzo de una subsiguiente heterocromatinización vía RNAi (en el caso de GGR), de las regiones de DNA recién reparadas por NER (47). La heterocromatinización vía RNAi que sucede durante la replicación del DNA, se describe brevemente: primero se activa la transcripción de las regiones de heterocromatina, después los transcritos no codificantes son degradados por la maquinaria de RNAi, ahora los microRNAs producidos marcan la región de heterocromatina que los produjo, para ser blancos de HMTs como Su(var)3-9 que metila la K9H3, por último ésta marca es leida por las proteinas HP1 que favorecen la formación de la heterocromatina (47).

Hasta este momento hemos mencionado la importancia del dinamismo de la cromatina tanto en su apertura como en su restablecimiento en el proceso de NER. A continuación nos referiremos al trascendente papel que presenta la proteína p53 en la apertura de la cromatina durante el proceso de NER.

4. p53

p53 es un supresor tumoral, que entre varias funciones mantiene la integridad del genoma. Cuando la célula es sometida a un estrés genotóxico, p53 tiene la capacidad de detener el ciclo celular en G1/S o G2/M, promover la reparación del DNA y, si es necesario, activa las vías de muerte celular (apoptosis) (48). Para lograr lo anterior, p53 puede actuar como factor transcripcional, activando o reprimiendo diferentes genes o también puede actuar como proteína regulatoria, al participar en diferentes vías de señalización. p53 es activado a través de modificaciones postraduccionales en su extremo amino, destacando la fosforilación, mientras que en su extremo carboxilo fosforilaciones. se presentan acetilaciones. metilaciones. ubiquitinaciones y sumoilaciones. Las modificaciones postraduccionales en el extremo amino son importantes para la estabilización de la proteína p53, en tanto las modificaciones en su extremo carboxilo participan en la regulación de

la unión a DNA, su estado de oligomerización, en el proceso de importación/exportación nuclear así como su propia degradación. p53 es considerado uno de los guardianes del genoma, ya que en él recae la decisión de reparar el daño o mandar a apoptosis. Existen numerosos estudios que explican que esta decisión dependerá de la extensión y gravedad del daño celular, donde en bajos niveles de daño, p53 actúa como protector al detener el ciclo celular y permitir la reparación del DNA, pero si el daño es grave p53 directamente conduce a la apoptosis. Entre los daños que son infligidos en el DNA y donde p53 presenta una clara participación, se encuentran las irradiaciones por luz UV. Existen numerosos estudios de interacciones físicas y funcionales entre proteínas del proceso de NER y p53. Se sabe que la perdida de función de p53 afecta la eficiencia de reparación por GGR, pero no de TCR. (49). Además cuando es activado p53 por el daño causado por luz UV, estimula la transcripción de XPC y DDB2 (50). Asimismo se han reportado interacciones físicas entre p53, las subunidades de TFIIH (XPD y XPB) y la proteína CSB de TCR (51). Interesantemente también se ha reportado la participación de p53 en la relajación de la cromatina en el momento de que el DNA es dañado por la luz UV. Como lo mencionamos anteriormente, p53 favorece el incremento de los niveles de la AcK9H3 (modificación que relaja la cromatina) en celulas humanas, después del daño al DNA con luz UV (42). Situación similar fue observada en nuestro laboratorio, donde se demostró que también D. melanogaster presenta un incremento en la AcK9H3 después de la irradiación con luz UV y este incremento también es dependiente de Dmp53, proteína homologa a p53 de humano (43).

HIPÓTESIS

Como reportamos anteriormente, se presenta un incremento en los niveles de la AcK9H3 en respuesta a daño al DNA por luz UV, de una manera dependiente de p53. Planteamos que este incremento debería ir acompañado de una disminución en la marca antagónica (3meK9H3) al inducir daño al DNA con luz UV. De ser esto cierto, resultaría trascendental saber si también este proceso sería dependiente de p53, como ocurre con los niveles de acetilación.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de la metilación de las histonas y de Dmp53 a nivel de cromatina después del daño al DNA con luz UV, en *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares:

1.- A través de Inmunofluorescencias de cromosomas politénicos, demostrar si se presenta algún cambio en el patrón global de la 3meK9H3 después de irradiación con luz UV en moscas silvestres (*wt*) y mutadas en Dmp53 (*Dmp53* ^{-/-} o Dmp53 ^{ns/ns}).

2.- Mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y PCR cuantitativas (qPCR), evaluar la abundancia de 3meK9H3 en las diferentes regiones de la cromatina (Heterocromatina constitutiva, Heterocromatina facultativa y eucromatina), antes y después de irradiar con luz UV, tanto en la mosca *wt* como en la $Dmp53^{-/-}$.

3.- Analizar la posible participación de la enzima KDM4B en la disminución global y específica (heterocromatina constitutiva y facultativa) de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Irradiación con luz UV

En este trabajo se recolectaron larvas de tercer instar de moscas silvestres Ore R (*wt*), *Dmp53^{-/-}* (52) y *EP-Kdm4B⁰³⁵³¹/+*, colocándose en una caja de petri con papel *whatman* húmedo para su posterior irradiación con luz UV Se usó el equipo stratalinker 2400 (Stratagene). La dosis de luz UV fue de 200 J (J:Joules/m²) para todos los ensayos, excepto para la inmunotinción de los núcleos de las glándulas salivales (*smuch*) donde se irradió a 100 J; sin embargo, en todos los casos después de la irradiación se dejó reposar a las larvas por 30 minutos (protegidas de la luz) antes de ser usadas en los diferentes ensayos.

2. Inmunotinciones de cromosomas politénicos

2.1 Preparación de cromosomas politénicos (Squash)

Para efectuar las inmunotinciones, previamente se realizan preparaciones de cromosomas politénicos, mejor conocidas como Squach. Primero se tratan los portaobjetos con poly-L-lysina (Sigma) y se dejan secar. Después se tratan los cubreobjetos con Sigmacote (Sigma), una vez secos, se enjuagan con etanol al 100%. Estos tratamientos son con la finalidad de garantizar una buena extensión de los cromosomas politénicos. Posteriormente se disecan un par de glándulas salivales de larvas de tercer instar (con y sin irradiación con luz UV) en NaCI 0.7%. A continuación se incuban las glándulas en 25 ul de solución 1 (3.7% paraformaldehido + 1% Triton X-100 / PBS 1X) por 10 segundos sobre un cubreobjetos, después se pasan a 25 uL de la solución 2 (3.7% paraformaldehido + 50% acido acético) sobre un segundo cubreobjetos y se incuban por 2 min. Se toma un portaobjetos, se adhiere suavemente al segundo cubreobjetos (donde están las glándulas en la solución 2) y se levanta; ahora con las pinzas se mueve el cubreobjetos (adherido con las glándulas) a favor y en contra de las manecillas del reloj o en movimientos horizontales y verticales, esto con la finalidad de favorecer la lisis y dispersión de las glándulas. Posteriormente se coloca la preparación entre un pieza de papel *whatman* doblado (2.5cmx7cm) y se presiona fuerte con el dedo pulgar aproximadamente 5 veces (3 veces en el centro de la preparación y una vez a cada lado de la preparación) Nota: el desplazamiento del cubre y la fuerza de presión son pasos críticos para una buena extensión de los cromosomas (pueden variar). Ahora se verifica en el microscopio el número y morfología de los cromosomas (bandas definidas, extensión, sin tejido). Si la preparación es aceptable se sumerge en nitrógeno líquido, se quita el cubre (colocando una navaja en un extremo y levantarlo), por último se guarda la preparación en metanol a 4 ºC hasta el momento de hacer la inmunotinción.

2.2 Inmunotinción

Se hidratan las preparaciones por 30 min a 1 hora en PBS 1X a temperatura ambiente. Después se adiciona el anticuerpo primario (1:100) diluido en una solución al 1% de leche en polvo (no fat Carnation) diluida en NP40 0.1%-PBS1X. (Vol. 50 uL, cubrir con *parafilm*), se incuba toda la noche a 4ºC en cámara húmeda. El anticuerpo primario usado fué anti-3meK9H3 (millipore). Al día siguiente se realizan de 10 a 15 lavados con la solución de NP40 0.1%-PBS1X, usando una pipeta pasteur y colocada la preparación verticalmente. Se adiciona el anticuerpo secundario (1:200) diluido en una solución al 1% de la leche en polvo en NP40 0.1%-PBS. (Vol. 50 ul, cubrir con parafilm) y se incuba por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y cámara húmeda. A continuación se realizan de 3 a 5 lavados de 10 min. c/u con la solución de NP40 0.1%-PBS1X; estos lavados se realizan adicionando 1 mL de la solución anterior sobre la preparación colocada horizontalmente dentro de la cámara húmeda y agitando suavemente (en oscuridad). Por último, adicionar 1 gota (30 uL) de citifluor (EMS), colocar el cubreobjetos, sellar las orillas con pintura de uñas transparente y observar al microscopio.

2.3 Análisis Estadístico

Las imágenes de las inmunotinciones de los cromosomas politénicos fueron tomadas en el microscopio confocal aplicando la técnica de contador de fotones, esto permite estandarizar la intensidad de la señal del anticuerpo entre 0 para la ausencia de señal y 256 para la intensidad máxima. Posteriormente las imágenes de los cromosomas se analizaron con el software *Image J*, con el cual se camina a lo largo de los cromosomas detectando el valor de intensidad de cada banda (0 a 256) y los datos o frecuencias obtenidas son analizados. Es importante resaltar que el escaneo se realiza en 2/3 de todo el genoma, y que se analizaron en promedio 15 genomas de cada condición, para su posterior análisis estadístico. Una vez obtenidas las frecuencias promedio de todos los genomas analizados de cada condición, se calcula la prueba de Chi cuadrada X², usando el programa de Excel. La prueba de X² es usada para determinar si existe diferencia significativa entre las distribuciones de cada condición. Si el valor de P de cada prueba de X² es menor de 0.05, se considera que existe una diferencia significativa entre las muestras analizadas.

3. Ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Este ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina se realiza con las glándulas salivales de larvas tercer instar. Para cada ensayo se disecan 120 pares de glándulas salivales. La disección se realiza en el buffer Roberts (87 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10mM HEPES pH 7.6) con inhibidores de proteasas (roche); el tiempo de disección debe oscilar entre los 30 y 45 min. Después de ese tiempo, se realiza el crosslinking, al incubar las glándulas disecadas en formaldehído al 1% en buffer Roberts durante 15 min. con agitación a temperatura ambiente (T.A). Posteriormente se para la reacción de crosslinking incubando las glándulas en una solución de Glicina 125 mM en buffer Roberts, durante 5 min. con agitación a T.A. Por ultimo, se realiza un lavado en Buffer Tris-Salino (150 mM NaCl, 20 mM, Tris-HCl pH 7.6) de 5 a 15 min. con agitación a T.A. Las glándulas fijadas se congelan a -70º, hasta completar un número de 120 pares de glándulas fijadas por ensayo (Nota: es importante siempre por ensayo incluir un tubo más de 120 pares de glándulas, el cual funcionará como control negativo). Una vez colectadas las 120 pares de glándulas por ensayo se descongelan a T.A., se les adicionan 600 uL de buffer de lisis (8 mM KCl, 0.5% NP40, 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8) y se dejan incubando en hielo por 10 min. A continuación se realiza la sonicación: 11 pulsos con 30 seg. sonicación y 30 min. descanso, esto con la finalidad de fraccionar la cromatina en fragmentos de 200 a 800 pb

(importante que el buffer de lisis quede turbio y sin glándulas). Se centrifugan los tubos a 14,000 rpm (centrífuga eppendorf 5417R) por 5 min. a 4ºC. Posteriormente se toma el sobrenadante, se pasa a un tubos nuevos, se completa un volumen de 1 mL con el buffer IP (0.01% SDS, 1% Triton, 1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, 167 mM NaCl) y cada tubo se le agrega 40 uL de una mezcla de perlas de agarosa A + G (previamente bloqueadas). Para el Bloqueo de las perlas se toma 1 mL del buffer de Inmunoprecipitación, se le adiciona 40 uL de BSA (BSA 5% en PBS1X), 50 uL de DNA de esperma de Salmón (10ug/uL), 100 uL de proteína G y 100 uL de proteína A, incubar en agitación a 4ºC toda la noche. Al día siguiente se centrifugan las perlas a 3000 rpm (centrífuga eppendorf 5417R) por 5 min a 4°C, se desecha el sobrenadante y se realizan 3 lavados con PBS1X, las perlas se dejan en un volumen de 200 uL de PBS1X. De estas perlas bloqueadas se toman los 40 uL antes mencionados para adicionarlos a la muestra y al control negativo, se incuban 3 hr a T.A. en rotación, con la finalidad de limpiar la muestra de moléculas inespecíficas. Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm por 5 min a 4ºC, se recupera el sobrenadante y se separa el 10% de su volumen total (*input*), se reserva a 4ºC. Al resto de la muestra se le adiciona 5 ug del anticuerpo seleccionado y al control negativo se le adiciona un anticuerpo inespecífico (lgG) o solo agua para que funcione como mock. Los anticuerpos usados fueron anti-3meK9H3 (millipore), anti-histona H3 (millipore), anti-AcK9H3 (millipore) y anti-p53 (Santacruz). Se dejan incubando toda la noche en rotación a 4ºC. Al día siguiente se incuban 2 hr a T.A. y se le agregan 50 uL de las perlas bloqueadas, se vuelven a incubar a 4ºC en rotación toda la noche. Posteriormente se sacan del cuarto frío y se incuban a T.A. por 2hr. A continuación se realizan lavados de 10 min de incubación a T.A. con rotación, y se centrifugan a 1000 rpm (centrífuga eppendorf 5417R) por 10 min a 4ºC; con cada uno de los siguientes buffers: Buffer RIPA (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 1% NP40, 1mM EDTA), Buffer High Salt (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 1% NP40, 1 mM EDTA), Buffer LiCI (50 mM Tris-HCI pH 8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1% NP40, 0.5% Deoxycholate), Buffer Tris Salino (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6). Después del último lavado se adiciona 10 ul de RNAasa (10mg/mL) y se incuba a 37ºC por 2 hr. Posteriormente se adiciona 1 ul de
Proteinasa K (20ug/ul) y se incuban a 45°C por 2 hr. A continuación se incuba a 65° toda la noche, de esta manera se revierte el *crosslinking*. Al día siguiente se realiza la extracción Fenol-Cloroformo, para esto se divide la muestra en dos tubos es decir 500 ul en cada tubo, se le adiciona 500 ul de Fenol, se mezcla con el *vortex* por 30 seg., se centrifuga a 14000 rpm (centrífuga eppendorf 5417R) 4°C, y se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo. Ahora se agrega 500 ul de fenol y 500 ul de cloroformo se mezcla con el *vortex* por 30 seg., se centrifuga a 14000 rpm 4°C, y se recupera el sobrenadante. Después se adiciona 500 ul de cloroformo se *vortexea* 30 seg. y se centrifuga a 14000 rpm por 5 min. Al sobrenadante recuperado se le adiciona 10% de su volumen de acetato de sodio 5 M pH 5.2, y 3 volúmenes de etanol al 100% se deja precipitar toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizan 3 lavados con etanol al 70%, centrifugando a 14000 rpm por 5min. Por ultimo el botón de DNA se disuelve en 40 ul de agua inyectable, para ser usado como templete en el PCR tiempo real o PCR cuantitativo qPCR.

4. Obtención de cDNA

4.1 Extracción de RNA

El RNA fue purificado de las larvas de tercer instar usando el protocolo de Trizol (Invitrogene). Brevemente, se pesan 50 a 100 mg de larvas, se les adiciona 1 mL de Trizol, se incuban 5 min, ahora con un homogenizador pequeño se disgregan las larvas en aproximadamente un tiempo de 5 min. Se centrifuga a 12000g (centrífuga eppendorf 5417R), 10 min a 4 °C, recupero el sobrenadante en un tubo nuevo y lo dejo reposar 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se le adiciona 200 ul de cloroformo, se mezcla vigorosamente invirtiendo el tubo con las manos 15 veces, se deja reposar el tubo por 3 min y se centrifuga a 12000 g por 15 min a 4 °C. En este punto se separan las fases, se toma la primera fase o fase acuosa (el volumen es aproximadamente 60% del volumen inicial de Trizol). A continuación, se adiciona 500 ul de isopropanol, se mezcla por inmersión 3 veces, y se incuba 10 min. a temperatura ambiente, esto permitirá la precipitación del RNA; se centrifuga a 12000g por 10 min a 4°C. Después se lava la pastilla, adicionando 1 mL de etanol al 75% disuelto en agua tratada con DEPC (*Diethyl*)

pyrocarbonate) al 1%, se *vortex*ea solo 10 seg. y se centrifuga a 7500g por 5 min a 4 $^{\circ}$ C, Por ultimo se decanta, se deja secar a temperatura ambiente por 10 a 15 min. y se le adiciona 30 a 50 ul de agua tratada con DEPC. Nota: si no se disuelve, incubar por 10 min a 60 $^{\circ}$ C y *vortexear* suavemente. Una vez disuelto almacenar a -70 $^{\circ}$ C.

4.2 Integridad del RNA

Para verificar la integridad del RNA extraído se realiza un minigel desnaturalizante. Se pesan 0.4g de agarosa grado biología molecular, se le adiciona 5 mL de MOPS 10X (0.2 M MOPS, 50 mM Acetato de Sodio, 10 mM EDTA, ajusta el pH a 7 con NaOH), 43.5 mL de agua estéril (no necesariamente tratada con DEPC), se calienta, se le añade 2.5 mL de formaldehído a 37%, se mezcla y vacía en el molde de la cámara de electroforesis, una vez solidificado el gel se coloca el molde dentro de la cámara, se añade suficiente MOPS 1X, se cargan las muestras y se corre a bajo voltaje (60V). Las muestras de RNA se preparan antes de ser cargadas: a 2 ul de muestra se le adiciona 2 ul de loading buffer (750ul Formamida, 150 ul MOPS 10X, 240 ul Formaldehído, 100 ul agua, 100 ul Glicerol, 80 ul Azul de Bromofenol 10%), se calienta a 65°C por 10 min., se le añade 1 ul de una solución de Bromuro de Etidio (1mg/mL) y se procede a la migración en el gel.

4.3 Preparación de cDNA

Previo a la preparación del cDNA, el RNA es tratado con DNAasa, esto con la finalidad de eliminar cualquier traza de DNA en la muestra. Para esto se toman aproximadamente 1 ug de RNA, se le adicionan 50 uL de agua DEPC, 5 ul de buffer 10X DNAasa, 1 ul de la enzima DNAasa, 0.2 ul de DTT (*Dithiothreitol*) 0.1M, 1ul de inhibidor de RNAasa, incubar 30 min a 37 °C, para inactivar la enzima se adiciona 1 ul de EGTA (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*) 20mM pH 8 e incubar a 65°C por 10 min. Una vez realizado el tratamiento de DNAasa, se puede comenzar la preparación de cDNA. De la preparación anterior de RNA se toman 2 ul, se le adiciona 2 ul de dNTPs 10mM, 1 ul de oligo dT, se incuba a 65°C por 5 min, después se pasa la muestra a hielo, se dá un *spin* en la centrifuga y ahora se le añade, 4 ul de buffer de incubación 5X

M-MuLV, 2 ul de DTT 0.1M, 1 uL de inhibidor de RNAasa, se mezcla con la pipeta e incuba a 37°C por 2 min. Posteriormente añadir 1 ul de la enzima Expand Reverse Transcriptase (roche), se incuba a 37°C por 1 hr. Por último se incuba e 65°C por 15 min. El cDNA se encuentra listo para la reacción de PCR.

5. PCR tiempo real (qPCR)

El sistema de PCR tiempo real se basa en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente (SYBR-Green), el cual se incorpora a DNA de doble cadena y es directamente proporcional a la cantidad de producto obtenido en la reacción de PCR. El PCR tiempo real es capaz de monitorear la cantidad de fluorescencia de cada ciclo durante la fase exponencial, donde se presenta el primer incremento significativo del producto de PCR, debido a que solo en esta fase de la reacción, este incremento correlaciona con la cantidad inicial de templado (esta medida es conocida como Cp o Ct). Se usó como templado el DNA asociado a cromatina, que se obtuvo de los ChIPs y los diferentes cDNAs obtenidos de larvas de tercer instar. Los primers se diseñaron para amplificar fragmentos de 150 a 200pb. La reacción de gPCR se realizó con el kit de FastStar DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (roche) en el equipo Light Cycler 1.5 (roche). Para el DNA obtenido del ChIP, se realizaron triplicados de experimentos independientes. Para cada set de primers se realizó una curva de rango dinámico, en la cual se corren de tres a cuatro diluciones del Input y 2.5 uL de la muestra inmunoprecipitada. (Nota: la Cp de la muestra del ChIP se compara con la Cp de la dilución más cercana). Esto permite calcular la cantidad de la secuencia blanco en la cromatina inmunoprecipitada en relación con la cantidad de la secuencia blanco del Input, esta relación es nombrada como % del Input. El cálculo fue realizado según el manual de Champion-ChIPTM qPCR Primers. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Chromatin, S.A. Biosciences 2008. Formula usada:

 Δ Ct [ChIP normalizado] = (Ct [ChIP] - (Ct [Input] - Log2 (Input del Factor de Dilución))). Donde el Input del Factor de Dilución = (fracción reservada de la cromatina input)⁻¹

% Input = 2 (- Δ Ct [ChIP normalizado])

Para analizar los niveles de RNA se utilizó como gen constitutivo calibrador a rp49. Se amplificó rp49 y el gen blanco en una curva estándar donde se usan de tres a cuatro diluciones del cDNA de las larvas silvestres junto con el cDNA de las larvas irradiadas. Posteriormente se selecciona y fija una dilución cuyo valor de Cp de cada una de las diferentes condiciones permitirá obtener la cantidad relativa de transcrito a través del análisis de la 2^{$\Delta\Delta$ CP} (53).

5.1 Secuencias de los primers

Heterocromatina Constitutiva:

rover.s: 5'-CAA CCA AGA CCA ACC TAC CC-3' rover.as: 5'-GCT CAT TTT AGT CTG TCC GC-3' AL1.s: 5'-CCC ACA CAT TGT CCA GTG CA-3' AL1.as: 5'-CGT AAG ATA ATC CAG AGC GG-3'

Heterocromatina Facultativa:

NippedA.s: 5'-CAG CGG TCA AGT TGT TGA AC-3' NippedA.as: 5'-GAC GGA TAT GCC GGA CTT TG-3'; Plc21.s: 5'-GTT CAT CAG TGG GTC AGT AG-3' Plc21.as: 5'-CAA TAT CCC CGG ACA AAA TC-3'

Eucromatina:

Sgs8.s: 5'-CTT TAC CAG ATG GTA ACC GT-3' Sgs8.as: 5'-GAA CGA TGA CAC AGA AAA TG-3' Hsp70Aa promoter.s 5'-CTG CAA CTA CTG AAA TCA AC-3' Hsp70Aa promoter.as 5'-GGT CGT TGG CGA TAA TCT CC-3' Hsp70Aa 350pb.s 5'-CCA AGA TCG GGG TGG AGT AT-3' Hsp70Aa350pb.as 5'-TGG GAG TCG TTG AAG TAG GC-3'

Niveles de transcrito:

rp49.s: 5'- TCA AGA TGA CCA TCC GCC CA-3' rp49.as: 5'-GTT CTC TTG AGA ACG CAG GC-3' KDM4B.s 5'-CCA CTC AGA CCG CTC AGA CA-3' KDM4B.as 5'-CTG CAA CAT CTG ATG GCG TC-3' Su(var)3-9.s: 5'-GTT TCG CGA GGA CTA CCT GA-3' Su(var)3-9.as: 5'-GGA GAT GAC CTC CGG TGA TA-3'.

6. Ensayo de sensibilidad a UV

Larvas de tercer instar silvestres y larvas *EP-kdm4b*⁰³⁵³¹/+ fueron irradiadas a diferentes dosis de luz UV (J:Joules/m²): 50, 100, 150 J, usando el equipo *stratalinker* 2400 (Stratagene). Posteriormente se contaron 100 pares de larvas de cada condición, se depositaron en una botella con comida y se permitió su desarrollo hasta adultos. Por último, se contó la población que de moscas adultas que sobrevivieron y se calculó su porcentaje.

7. Inmunotinción de Smuch

Primero se realizaron las preparaciones de los smuch, para lo cual se disecaron tres pares de glándulas salivales de larvas de tercer instar en PBS 1X y se irradiaron a 100 J/m². Las glándulas se colocaron en una gota de PBS1X sobre un portaobjetos, después se coloca un cubreobjetos sobre ellas, presionando y deslizándolo suavemente, esto con la finalidad de disgregar los núcleos de las glándulas. Ahora los núcleos fueron fijados en paraformaldehido al 4% en PBST 0.2% (PBS1X con 0.2% de Triton X-100) a 4ºC por 20 min. Posteriormente las muestras fueron lavadas, al sumergirlas en una solución de PBST al 0.4% a temperatura ambiente por 40 min. Las muestras se bloquean con 1% de suero de cabra normal (NGS) en PBST 0.4% a 4ºC por 2 hr. A continuación se realiza la inmunotinción: se adiciona el anticuerpo primario (1:100) diluido en una solución al 1% de leche en polvo (no fat-Carnation) diluida en NP40 0.1%-PBS1X. (Vol. 50 ul, cubrir con parafilm), se incuba toda la noche a 4ºC en cámara húmeda. Anticuerpos: anti-CPDs (Kamiya-Biomedical), anti-DmKDM4B (Dr. J. Workman). Al día siguiente se realizan de 10 a 15 lavados con la solución de NP40 0.1%-PBS1X, usando una pipeta pasteur y colocada la preparación verticalmente. Se adiciona el anticuerpo secundario (1:200) diluido en una solución al 1% de la leche en polvo en NP40 0.1%-PBS. (Vol. 50 ul, cubrir con *parafilm*) y se incuba por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y cámara húmeda. A continuación se realizan de 3 a 5 lavados de 10 min. c/u con la solución de NP40 0.1%-PBS1X; estos lavados se realizan adicionando 1 mL de la solución anterior sobre la preparación colocada horizontalmente dentro de la cámara húmeda y agitando suavemente (en oscuridad). Por ultimo adicionar 1 gota (30 ul) de citifluor, colocar el cubreobjetos, sellar las orillas con pintura de uñas transparente y observar al microscopio confocal.

8. Inmunoensayo de reparación de CPDs

50 larvas de tercer instar de cada condición se irradian a 200 J/m² de luz UV, después se les extrajo el DNA a diferentes tiempos post irradiación (5 min, 30 min, 4 h, 6h, 12h, 24h), con fenol cloroformo y se reserva a -20ºC. Es importante cuantificar el DNA y hacer alícuotas de 1ug/uL. Para este ensayo se utilizó el equipo Bio-Dot, microfiltration apparatus de Bio-Rad; los buffers usados y los pasos más detallados se encuentran en el manual del equipo. Brevemente, la membrana de nylon se incuba en agua durante 5 min. y en buffer SSC (saline-sodium citrate) 20X durante 5 min. Posteriormente se desnaturaliza 1 ug de DNA por condición a 100ºC por 7 min, se centrifuga a 5000 rpm por 3 min. y se reserva en hielo. Se arma el equipo de Bio-Dot, según las instrucciones del manual hasta dejar puesto el sealing gasket, se colocan las membranas sobre el equipo semi-armado utilizando unas pinzas y se eliminan las burbujas con las manos con guantes, ahora se coloca el sample template, se alinean bien los tornillos y se giran suavemente de manera cruzada, esto con la finalidad de garantizar una presión uniforme. Posteriormente se coloca el equipo a la fuente de vacío, se prende el vacío y se mueve la perilla del equipo según el manual. Con el vacío prendido, volver a ajustar los tornillos en forma diagonal, esto para evitar filtraciones entre los pozos. Se ajusta la válvula según instrucciones (cerrando el vacío), se hidrata la membrana adicionando 100 ul de buffer SSC 20X en cada pozo, con la válvula se abre el vacío suavemente, una vez que se hayan secado los pozos, se cierra el vacío y queda listo para cargar la muestra. A continuación se adicionan 50 ul de la muestra de DNA previamente desnaturalizada en cada pozo (importante registrar los números de pozos usados), en los pozos sin usar se les adiciona 50 uL de agua o buffer SSC 20X. Suavemente se abre el vacío y para poder controlar el flujo de éste con un dedo se cubre y descubre la entrada de aire (checar manual). Después que la muestra se ha filtrado, se cierra el vacío, se adiciona 500 ul de Buffer SSC (*saline-sodium citrate*) 10X a cada pozo, y se abre el vacío para que se laven los pozos. Por último, se cierra el vacío, se desensambla el equipo de Bio-Dot y se coloca la membrana en SSC 2X por 5min. Se seca la membrana al aire y una vez seca está lista para la hibridación. En este caso la hibridación se realiza tipo *Western Blot,* usando 1:1000 del anticuerpo anti-CPDs (Kamiya-Biomedical).

9. Electroforesis de proteínas de glándulas salivales de larvas de tercer instar

Los ensayos de Western Blot (WB) presentados en este trabajo se realizaron con extractos de glándulas salivales de larvas de tercer instar. Por lo tanto previo al WB, se realizaron las preparaciones proteicas de las glándulas salivales para su posterior migración en un gel SDS-PAGE. Brevemente, se disecaron 17 pares de glándulas salivales por carril en una solución al 0.7 % de NaCl, después las glándulas se pasan a 10ul de buffer de lisis (250 mM sucrosa, 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl2, 5 mM EDTA, inhibidores de proteasas) en hielo, se adiciona 1 uL de SDS 10%, se incuba en hielo por 5 min. Se le adiciona 4 ul de buffer Laemmli 4X (100uL 4X, 6 uL Beta mercapto etanol), se vortexea 10 seq., se hierve a baño maria por 5min., se centrifuga a 10000 rpm (centrifuga eppendorf 5417C) por 5 min. y se carga en un carril de un gel SDS-PAGE al 10%. Nota: si no ha completado todos los carriles deseados, la muestra después de hervir se sumerge en nitrógeno liquido y se guarda a -70°C, hasta completar el numero de carriles. Una vez cargado el gel, se corre a 100V en buffer de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM Glicina, 0.1% SDS). Para verificar la integridad de las proteínas el gel se incuba con azul de coomassie (Bio-Rad) (0.2% de azul de coomassie R-250, 50% metanol, 7% acido acético, 40% agua) durante 10 min. en agitación a temperatura ambiente. Después se remueve el coomassie, se elimina el exceso del mismo con agua bidestilada y para visualizar las proteínas migradas se lava el gel varias veces en una solución desteñidora (25% metanol, 5% acido acético) en agitación a temperatura ambiente.

10. Western Blot

Después de la migración (separación electroforética) de las proteínas en el gel, éstas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente ser reconocidas por anticuerpos específicos dirigidos solo a ciertos epitopes de la proteína seleccionada. Brevemente, el gel es equilibrado en el buffer de transferencia (380 mM Glicina, 50 mM Tris, 20% metanol, 0.1% SDS) durante 15 min. en agitación a temperatura ambiente. Después se prepara el sándwich de transferencia de la siguiente manera: en un recipiente con suficiente buffer de transferencia se coloca la rejilla abierta, enseguida se colocan las esponjas presionando para quitar burbujas, después tres papeles *whatman* (cortados a la medida del gel) se presiona, posteriormente se coloca el gel. A continuación se coloca la membrana de nitrocelulosa (BioRad) se presiona suavemente para sacar la burbujas, enseguida se colocan otros tres papeles whatman, las esponjas faltantes, se presiona suavemente y se cierra las rejillas. Se coloca el sándwich en la cámara de transferencia (Importante cuidar que el lado del sándwich donde se encuentra el gel se coloque en el polo negativo de la cámara). El buffer de transferencia se adiciona dentro de la cámara y se corre toda la noche a 80 mili amperes a 4ºC. Al día siguiente se verifica la transferencia de las proteínas, tiñendo la membrana en rojo de ponceau (0.2% Ponceau S, 3% ácido acético), en agitación leve por 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquea la membrana en 10% de leche en polvo disuelta en PBS-Tween 0.1% (0.1% Tween 20, PBS1X) por 1hr con agitación a temperatura ambiente. Concluido el bloqueo se enjuaga la membrana con PBS-Tween (dos veces). A continuación se incuba la membrana con el anticuerpo primario (1:500, 1:1000) en una solución de leche al 5% en PBS-Tween 0.1%, por 2hr. en agitación leve a temperatura ambiente. Después se realizan 5 lavados de 10 min. cada uno con PBS-Tween 0.1% en agitación moderada a temperatura ambiente. Ahora se incuba con el anticuerpo secundario (HRP: horseradish Peroxidase) correspondiente (1:2000) en una solución de leche al 5% en PBS-Tween 0.1%, por 2hr. en agitación leve a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 5 lavados de 10 min. cada uno con PBS-Tween 0.1% en agitación moderada a temperatura ambiente. Por ultimo se procede a revelar con el kit de quimioluminiscencia.

43

RESULTADOS

1. Disminución de los niveles globales de la 3meK9H3 después de irradiar con luz UV a la mosca wt, mientras que en la mosca mutada en p53 los niveles de esta marca aumentan.

Hasta la fecha ha sido ampliamente estudiado el papel que juega la acetilación de las histonas en respuesta a daño al DNA por luz UV. En específico, todos los estudios en este campo han demostrado que después de la irradiación, se presenta un incremento de la acetilación principalmente en la lisina 9 de la histona H3 (AcK9H3). Dado que la AcK9H3 no podría coexistir con su marca antagonica la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3), decidimos estudiar el comportamiento de la (3meK9H3) después de la irradiación con luz UV. Para abordar este punto, se realizaron inmunotinciones de cromosomas politénicos de glándulas salivales de moscas *wt* y moscas $p53^{-/-}$, antes y después de la irradiación con luz UV. La mosca $p53^{-/-}$ ò $Dmp53^{ns/ns}$ es una mutante nula obtenida por recombinación homóloga y homocigota viable (52). En estas preparaciones se observa que la 3meK9H3 disminuye ligeramente después de la irradiación en la mosca *wt*; mientras que en la mosca mutada en p53 se observa un incremento de esta marca post-UV. (Fig.11).

Para validar estos resultados de manera cuantitativa, se le aplicó a estas imágenes la técnica de contador de fotones, utilizando el microscopio confocal. Posteriormente se usó el software *image J*, el cual nos permitió caminar por los cromosomas y leer la intensidad del anticuerpo en cada una de sus bandas, los datos obtenidos se vaciaron en un histograma (Fig. 12A). Para apreciar mejor las diferencias se obtuvo el área bajo la curva de cada condición (Fig. 12B). Estos resultados nos confirman que efectivamente se presenta un decremento de la 3meK9H3 post-UV en la mosca *wt*. Esto correlaciona de manera opuesta con el aumento que se observa de la acetilación en este mismo residuo (AcK9H3) después de irradiar con luz UV a moscas y células humanas (42,43), (recordemos que son marcas antagónicas). Sugiriéndonos que para que se pueda acetilar la K9, primero es necesario que se desmetile la lisina 9.



Dmp53-/-

Figura 11. Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3). Inmunofluorescencias de cromosomas politénicos de larvas de tercer instar silvestres (*wt*) y mutadas en p53 ($Dmp53^{-/-}$). –UV: sin irradiar, +UV: irradiados con 200 J/m² de luz UV. La señal en rojo corresponde al anticuerpo anti-trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3). La flecha indica el centrómero.

Por otro lado las moscas afectadas en p53 presentan niveles menores de trimetilación de la K9 en comparación con los niveles basales de la mosca wt (Fig.12). Esto indica la importancia de p53 para mantener los niveles basales de esta marca, como se observó anteriormente para la acetilación de la K14 de la histona H3 (36). Además, se observó que al irradiar con luz UV a las moscas *p53^{-/-}* los niveles de la 3meK9H3 incrementan (Fig.12). Por tanto, la proteína p53 es importante para la disminución de la 3meK9H3 después de UV, así como para mantener los niveles basales de esta marca.



Figura 12. Variación en los niveles de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV en moscas silvestres y mutates en p53. A .Frecuencias de cada una de las intensidades de la 3meK9H3 a lo largo de los cromosomas politénicos de moscas silvestres y mutadas en p53 antes y después de dañar el DNA. En el eje de las X observamos la intensidad de la señal de la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3, que va de 0 (ausencia de señal) a 256 (intensidad máxima). En el eje de las Y observamos la frecuencia obtenida de cada intensidad. n= 20 Valor de p< 0.05. **B.** Recopilación del área bajo la curva de la gráfica A para cada una de las cuatro condiciones (*wt, wt* irradiada UV; $Dmp53^{ns/ns}$, $Dmp53^{ns/ns}$ irradiada UV).

2. La disminución de la 3meK9H3 después de irradiar con luz UV ocurre preferentemente en regiones de la heterocromatina.

Con base en que observamos una disminución de la 3meK9H3 post-UV en la mosca *wt*, decidimos entonces analizar el comportamiento de esta marca a un nivel más local, es decir a nivel de cromatina. Para ésto, se realizaron ensayos de ChIP para la 3meK9H3 en las glándulas salivales de larvas de tercer instar de moscas *wt* y $p53^{-/-}$. El DNA obtenido del ChIP se utilizó como templado para amplificar dos secuencias de cada una de las tres regiones de la cromatina: heterocromatina constitutiva, heterocromatina facultativa y eucromatina. En el caso de Heterocromatina constitutiva se seleccionó a *rover* (retrotransposón) y a *AL1* (elemento repetido). Para la heterocromatina facultativa se seleccionó la región promotora de dos genes que no se están transcribiendo en este estadio: *Nipped A y Plc21*. Por último, para la región de eucromatina se seleccionó parte de los promotores de dos genes: *Sgs8* que está activo trancripcionalmente en este estadio y *Hsp70* que presenta una cromatina relajada en su región promotora (54), (Fig. 13).



Figura 13. Secuencias seleccionadas de cada una de las tres regiones de la cromatina. La línea roja indica el sitio de amplificación por qPCR.

2.1 3meK9H3 en heterocromatina constitutiva

Los resultados obtenidos muestran que las dos secuencias de heterocromatina constitutiva presentaron un comportamiento muy similar, es decir, tanto *rover* como *AL1* muestran altos niveles de la 3meK9H3 en la mosca *wt*. Este resultado se esperaba ya que se sabe que las regiones de heterocromatina se encuentran enriquecidas en esta modificación (3). Sin embargo después de la irradiación con luz UV la trimetilación disminuye en ambas secuencias. Esto nos indica que en la región de heterocromatina constitutiva existen zonas que al ser dañadas con luz UV presentan un decremento de la 3meK9H3 (Fig.14A,B).



Figura 14. La disminución de la 3meK9H3 en heterocromatina constitutiva después de irradiación con luz UV, es dependiente de Dmp53. En el eje de las X se observa cada una de las cuatro condiciones indicadas en la figura. En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al input. n=3.

Los resultados de esta marca en la mosca mutada en p53 ($Dmp53^{ns/ns}$ o $Dmp53^{-/-}$) presentan un comportamiento muy diferente a la *wt*. Tanto *rover* como *AL1* muestran una disminución de los niveles basales de esta marca en la mosca $Dmp53^{-/-}$, mientras que después de irradiar con luz UV no se observa un cambio significativo en la marca (Fig.14A,B).

2.2 La histona H3 permanece después de la irradiación con luz UV y hay un incremento en la AcK9H3 en rover post-UV.

Para corroborar que la disminución observada en la trimetilación se debe a una desmetilación de la histona y no al desplazamiento nucleosomal, se realizaron ensayos de ChIP para la histona H3 y para la AcK9H3. Para *rover* los niveles de la histona H3 son altos y se mantienen antes y después de irradiar con luz UV, además *rover* presentó un ligero aumento de la AcK9H3 después de la irradiación. (Fig. 15).



Figura 15. En *rover* los niveles de la histona H3 no varían después de la irradiación con luz UV, además esta secuencia presenta un incremento de la AcK9H3 después de la irradiación. Se muestra la amplificación de *rover* a través de qPCR de diferentes ensayos de ChIPs. A: ChIP de la histona H3, *rover* no presenta variación de los niveles de esta histona después de UV. B. ChIP de la AcK9H3, *rover* presenta un ligero incremento de esta marca después de UV. *Rp49* control positivo del ChIP de AcK9H3. En el eje de las X se observa las secuencias inmunoprecipitadas en dos condiciones (WT, WT+UV). En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al input.

Todo esto nos sugiere que el decremento de la 3meK9H3 que se observa después de irradiar con luz UV se debe a la participación de alguna desmetilasa y no a la pérdida de nucleosomas. Además, estos resultados apuntan a que el decremento de la 3meK9H3 presente después de la irradiación, permite la posterior acetilación del mismo residuo. Una vez que fueron comprobados estos puntos, se continuó analizando el resto de las secuencias.

2.3 3meK9H3 en heterocromatina facultativa

En el caso de hetrocromatina facultativa, *Nipped* A y *Plc21* muestran niveles medios de la 3meK9H3 en la mosca *wt* y de igual manera, después de irradiar con luz UV esta marca disminuye en ambas secuencias (Fig.16A,B). Mientras que en la mosca *p53^{-/-}, Nipped* A y *Plc21* presentan disminuidos los niveles basales de la 3meK9H3, pero interesantemente después de irradiar con luz UV estos niveles incrementan (Fig.16A,B). Este incremento correlaciona con lo observado a nivel global en los cromosomas politénicos.



Figura 16. Disminución de la 3meK9H3 en heterocromatina facultativa en la mosca *wt* después de irradiar con luz UV. Sin embargo, en la mosca mutada en p53 se observa un incremento de esta marca después de irradiar con luz UV. En el eje de las X se observa cada una de las cuatro condiciones indicadas en la figura. En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al input. n=3.

2.4 3meK9H3 en eucromatina

Para la región de eucromatina, *Sgs8* presenta niveles muy bajos de la 3meK9H3 tanto en la región 5' como en la región 3' del gen (Fig.17A,B). Esto correlaciona con trabajos previos donde muestran que genes activos transcripcionalmente presentan una muy baja o ausente densidad nucleosomal en sus regiones promotoras (55). Para la región promotora de *Hsp70* se observan niveles bajos de la 3meK9H3 en la mosca *wt* e interesantemente después de irradiar con luz UV estos niveles bajan aún más (Fig.17C); correlacionando con un reporte previo donde demuestran que la región promotora de este gen presenta poca densidad nucleosomal (54). Aunado a esto se analizó la región con mayor densidad nucleosomal de *Hsp70*, que comprende de +200 a +400 pb, observando poca presencia de 3meK9H3 en la mosca *wt* y una disminución después de la irradiación (Fig.17C). Por último, en la mosca mutada en p53 no se observan niveles, ni cambios significativos de esta trimetilación en ninguna de las dos secuencias analizadas (Fig.17A,C).



Figura 17. Probablemente no hay cambios en la 3meK9H3 en *Sgs8* y se presenta un mínimo porcentaje de la 3meK9H3 en *Hp70Aa*, tanto en las moscas *wt* como en *Dmp53^{ns/ns}* después de irradiar con luz UV. Se muestran los qPCR (PCR cuantitativos) de los ChIPs de la 3meK9H3. A: Región promotora 5' de Sgs8. B: región 5' y 3' de Sgs8. C: Hsp70Aa (región promotora y región +200 a 400 pb). En el eje de las X se observa cada una de las cuatro condiciones indicadas en la figura. En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al input. n=3. ChIPs: anti-3meK9H3 y anti-H3



Figura 18. Bajos niveles de la histona H3 en la regiónes promotoras de eucromatina antes y después de la irradiación con luz UV. Se muestran los qPCR (PCR cuantitativos) de los ChIPs de la 3meK9H3 y de la histona H3. **A.** ChIP de la 3meK9H3 y de la histona H3 para la región promotora de Sgs8 en la mosca wt. **B.** ChIP de la histona H3 para la región promotora de Hsp70Aa. En el eje de las X se observa las secuencias inmunoprecipitadas en dos condiciones (WT, WT+UV). En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al input.

Dado que los niveles de la 3meK9H3 se observaron muy bajos en estas dos secuencias de eucromatina; se decidió entonces analizar la presencia de la histona H3 antes y después de la irradiación con luz UV. Para Sgs8, se observaron niveles muy bajos de la histona H3 tanto antes como después de irradiar. La región promotora de Hsp70Aa presenta niveles basales bajos de la histona H3 e interesantemente decrecen ligeramente después de irradiar con luz UV (Fig.18). Probablemente después de daño al DNA, el nucleosoma se desplaze ligeramente (datos preliminares). Esto corrobora que la región de eucromatina no presenta niveles, ni cambios significativos en la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV.

Todo lo anterior nos permite concluir que solo la región de heterocromatina presenta una disminución de la 3meK9H3 dependiente de p53 después de UV; además la proteína p53 es importante para mantener los niveles basales de esta marca. Por último el incremento de la 3meK9H3 que se presenta en los cromosomas de la mosca $p53^{-/-}$ después de la irradiación, se debe preferentemente a las secuencias de heterocromatina facultativa.

3. Participación de la proteína KDM4B en la disminución de la 3meK9H3 después de irradiar con luz UV, proceso p53 dependiente.

Si los niveles de la 3meK9H3 disminuyen después de irradiar con luz UV en la mosca *wt* y como corroboramos que la histona H3 se mantiene después de la irradiación, entonces muy probablemente alguna enzima que desmetile la trimetilación de esta histona esté participando en este proceso.

Para comprobar lo anterior, primero se midieron los niveles de expresión de la única enzima reportada hasta la fecha capaz de desmetilar a la 3meK9H3 en la mosca: dKDM4B o DmKDM4B (20), a través de RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de DmKDM4B se analizaron en larvas de moscas *wt* antes y después de irradiar con luz UV. Los resultados demostraron que efectivamente el RNA mensajero de DmKDM4B incrementa después de la irradiación (Fig. 19). En base a que en la mosca $p53^{-/-}$ no se observa una disminución de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV, es pausible pensar entonces que el incremento de DmKDM4B depende de *p53*. Por tanto se analizaron los niveles de expresión de la enzima en esta mosca afectada en *p53*. Los resultados muestran que los niveles basales del RNA mensajero de la enzima DmKDM4B disminuyen en la mosca *p53*^{-/-} y así se mantienen después de la irradiación con luz UV (Fig.19). Estos resultados nos sugieren que la proteína p53 podría estar regulando la expresión de DmKDM4B tanto a nivel basal como después de irradiar con luz UV.



Figura 19. La expresión de DmKDM4B incrementa después de la irradiación con luz UV en la mosca *wt*. Mientras que los niveles basales de la enzima disminuyen en Dmp53^{-/-} y así se mantienen después de la irradiación con luz UV. RT-qPCR tiempo real de la expresión de DmKDM4B en las moscas *wt*, *wt* irradiada UV, *Dmp53^{-/-} Dmp53^{-/-}* irradiada UV. En el eje de las X se presentan las 4 condiciones. En el eje de la Y se muestra el nivel de expresión respecto a la *wt* que vale 1. n=3.

Posteriormente y gracias a que el Dr. J. Workman nos donó el anticuerpo que reconoce a esta desmetilasa pudimos analizar los niveles de proteína en cada una de las cuatro condiciones. Para esto se realizaron ensayos de Western Blot (WB). Efectivamente e igual que en el RNA-mensajero, se observa un incremento de los niveles de la proteína DmKDM4B en la mosca *wt* después de irradiación con luz UV (Fig.20A). De manera semejante en la mosca p53-/- (con y sin irradiación) se observa una ligera disminución de la proteína DmKDM4B (Fig.20B). Esto sugiere que probablemente la proteína p53 esté regulando directa o indirectamente la expresión de la enzima DmKDM4B cuando las células son dañadas con luz UV.



Figura 20. Los niveles de proteína de DmKDM4B incrementan después de la irradiación con luz UV en la mosca *wt*. Mientras que los niveles basales de la proteína de esta enzima disminuyen en *p53-/-* y así se mantienen después de la irradiación con luz UV. A. proteína DmKDM4B en extractos de glándulas salivales de larvas *wt* de tercer instar, sin irradiación e irradiados (extraídos a diferentes tiempos post-UV). B. proteína DmKDM4B en extractos de glándulas salivales de larvas *Dmp53-/-* de tercer instar extraídos a diferentes tiempos post-UV. C. Proteína DmKDM4B en extractos de glándulas salivales de larvas *Dmp53-/-* de tercer instar extraídos a diferentes tiempos post-UV. C. Proteína Dm KDM4B en extractos de glándulas salivales de larvas *Dmp53-/-* y *EP-KDM4B/+.* Ensayos de Western Blots con el anticuerpo que reconoce a DmKDM4B y el anticuerpo que reconoce a B-tubulina. La intensidad relativa fue calculada respecto a B-tubulina.

3.1 Moscas afectadas en el gen que codifica a la DmKDM4B son más sensibles a luz UV

Para corroborar que efectivamente KDM4B participa en el proceso de NER, se decidió trabajar con una mosca que presenta una mutación en el gen que codifica para esta enzima. Para esto, se pidió al Bloomington Stock Center una mosca con un elemento P insertado en la región del gen DmKDM4B (EP-KDM4B⁰³⁵³¹), esta mosca es homocigota letal. Por tanto se trabajó con la mosca heterocigota (*EP-KDM4B*⁰³⁵³¹/+). Posteriormente se verificó la integridad de la proteína DmKDM4B en esta mosca *EP-KDM4B/+*, a través de ensayos WBs. Los resultados muestran un decremento significativo de la proteína KDM4B en la mosca EP-KDM4B/+ (Fig.20C). Si la mosca EP-KDM4B/+ presenta una importante afectación en los niveles de la enzima DmKDM4B y tomando en cuenta nuestros resultados anteriores, entonces muy probablemente esta mosca, presentaría defectos en el mecanismo de reparación NER.

Por tanto, esta mosca se sometió a ensayos de sensibilidad a luz UV. Brevemente, se tomaron 100 larvas de tercer instar tanto de la mosca *wt* como de la mosca *EP-KMD4B/+* para cada una de las tres dosis de irradiación a que fueron sometidas, posteriormente se les permite su desarrollo a moscas adultas. Esto con la finalidad de cuantificar el porcentaje de supervivencia de la mosca *EP-KDM4B/+* después de irradiarlas a diferentes dosis, con respecto a la mosca *wt*. Los resultados revelan que la mosca *EP-KDM4B/+* es más sensible a la irradiación con luz UV comparado con la mosca *wt* (Fig.21). Estos datos apoyan la hipótesis de que la presencia de esta desmetilasa es importante para que se pueda llevar a cabo la reparación por NER de manera eficiente.



Figura 21. La mosca *EP-KDM4B/+* presenta mayor sensibilidad a la irradiación por UV. 100 larvas de cada una de las dos condiciones (*wt, EP-KDM4B/+*), fueron irradiadas a diferentes dosis de UV. En el eje de las X se presenta las diferentes dosis de irradiación con luz UV. En el eje de las Y se observa el número de moscas que sobrevivieron. n=3.

3.2 La mosca EP-KDM4B/+ no remueve eficazmente los CPDs

Para comprobar que efectivamente la desmetilasa DmKDM4B es importante para el proceso de NER, en la reparación de los dimeros de pirimidina (CPDs) ocasionados por la luz UV; se realizaron ensayos de Dot Blot donde se puede medir la tasa de remoción de los CPDs. Para este ensayo se extrajo el DNA de 50 larvas de tercer instar de la mosca *wt* y de la mosca *EP-KDM4B/+* para cada uno de los diferentes tiempos post irradiación, se goteó 1ug de este DNA en una membrana de nylon, para después ser incubada con un anticuerpo que reconoce de manera especifica los CPDs en el DNA. Efectivamente observamos que la mosca *EP-KDM4B/+* no es capaz de remover los CPDs eficientemente, como ocurre en la mosca *wt* aproximadamente a las 4h (Fig. 22).



Figura 22. La mosca *EP-KDM4B*⁰³⁵³¹/+ es incapaz de remover los CPDs. Ensayo de Dot-blot: se colocó en una membrana de nylon el DNA extraído a diferentes tiempos post-UV de larvas de tercer instar (*wt, EP-KDM4B*⁰³⁵³¹/+), se incubó esta membrana con el anticuerpo que reconoce a los dimertos CPDs y se reveló con un ensayo tipo WB. N.I.: No irradiado. 5', 30', 4h, 6h, 12h, 24h: tiempo después de irradiar con 200 J de luz UV.

Por otro lado nos planteamos la pregunta de que si la DmKDM4B es esencial para la correcta remoción de los dimeros de pirimidina, entonces es muy probable que esta enzima pueda localizarse en las regiones dañadas. Realizando ensayos de inmunoflorescencia con el anticuerpo que reconoce los CPDs y el anticuerpo que reconoce a DmKDM4B, se corroboró el reclutamiento de la enzima KDM4B en las regiones dañadas por la irradiación con luz UV en núcleos de glándulas salivales de larvas de tercer instar (Fig. 23).



Figura 23. **DmKDM4B es reclutada en las regiones de daño por luz UV.** Ensayos de inmunofluorescencias con los anticuerpos que reconocen a la DmKDM4B y a los CPDs en núcleos de glándulas salivales *wt*, antes y después de la irradiación con luz UV.

A partir de los resultados anteriores podemos concluir que la desmetilasa DmKDM4B es importante para la correcta remoción de los CPDs.

3.3 DmKDM4B es la responsable de la disminución global y local de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV

Los datos presentados hasta este punto sugieren que la disminución que observamos en la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV en las regiones de heterocromatina, es consecuencia de la participación de DmKDM4B. Para comprobar directamente esta hipótesis, primero se evaluó si los niveles globales de la 3meK9H3 se ven afectados en la mosca *EP-KDM4B/+* antes y después de irradiar con luz UV. Esto se analizó a través de ensayos de inmunofluorescencias de cromosomas politénicos. Los resultados revelan que los niveles basales de la 3meK9H3 incrementan en la mosca *EP-KDM4B/+* y esta marca incrementa aún más después de la irradiación con luz

UV (Fig.24). Por tanto, la disminución de los niveles globales de la 3meK9H3 que se presenta después de la irradiación en la mosca *wt*, son consecuencia de la participación de la desmetilasa DmKDM4B. Esto correlaciona con un trabajo previo, donde observan que *C. elegans* mutados en esta enzima presentan niveles altos de la 3meK9H3 (17).



Figura 24. La enzima DmKDM4B participa en la disminución de la 3meK9H3 después de la irradiación por luz UV. Recopilación de las áreas bajo la curva de los histogramas de la cuantificación de la 3meK9H3 para cada una de las cuatro condiciones (*wt, wt* irradiada UV; *EP-KDM4B/+*, *EP-KDM4B/+* irradiada UV). n=10, p<0.05.

Por otro lado con la finalidad de evaluar la participación de DmKDM4B después de la irradiación a un nivel más local, específicamente en las regiones de heterocromatina, se realizaron ensayos de ChIPs y qPCR. En el caso de las secuencias de heterocromatina constitutiva (*rover* y *AL1*), no se observó variación de los niveles de la 3meK9H3 en la mosca *EP-KDM4B/+* antes y después de irradiar con luz UV (Fig.25A,B). Lo mismo se presentó para las dos secuencias de heterocromatina facultativa; *Nipped A* y *Plc21* (Fig.25C,D). Esto nos confirma que la disminución de los niveles de la 3meK9H3 que se observan después de la irradiación con luz UV en la región de heterocromatina de moscas *wt*, es debido a la participación de la desmetilasa DmKDM4B.



Figura 24. La enzima DmKDM4B participa en la disminución LOCAL de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV. Ensayos de ChIPs de la 3meK9H3 y qPCRs. A,B. Secuencias de heterocromatina constitutiva: *rover* y *AL1*. C,D. Secuencias de heterocromatina facultativa: *Nipped A*, *Plc21*. En el eje de las X se observa cada una de las cuatro condiciones de la mosca. En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al input. n=3.

3.4 Dmp53 activa trascripcionalmente a DmKDM4B

Haciendo un resumen de lo analizado hasta el momento, encontramos que después de irradiar con luz UV se presenta una disminución de la 3meK9H3. A continuación observamos un incremento en los niveles de mensajero y de proteína de la desmetilasa DmKD4MB después de la irradiación con luz UV y que este incremento no se observa si la proteína Dmp53 esta ausente. Esto nos sugería hasta ese momento que KDM4B era la responsable de la disminución de la 3meK9H3 post-UV. Posteriormente se observó que la enzima KDM4B colocaliza en las regiones de daño por UV y que esta desmetilasa es necesaria para la correcta remoción de los dímeros de pirimidina. Además se observó que en moscas afectadas en KDM4B no se presenta la disminución de esta marca, esto último nos comprueba la participación de esta desmetilasa después de la irradiación con luz UV. Sin embargo hasta este punto quedaba por contestar si efectivamente Dmp53 es capaz de activar este proceso después de la irradiación con luz UV. Para elucidar esto, se analizó si Dmp53 activa transcripcionalmente al gen que codifica a DmKDM4B. Primero se buscaron posibles sitios consenso de unión a Dmp53 en la región cercana al sitio de inicio de la trascripción del gen *DmKDM4B*. Estos sitios son conocidos como elementos de respuesta a p53 en Drosophila melanogaster (Dp53RE). Por ejemplo, está bien caracterizado que Dmp53 activa transcripcionalmente al gen reaper después de irradiar con luz UV, a través de unirse al sitio Dp53RE presente en su región promotora (56). A pesar que la región promotora de DmKDM4B es muy compleja, se pudo encontrar un sitio consenso para Dp53RE. Posteriormente se diseñaron los primers para amplificar dicha región, esto con la finalidad de comprobar si la proteína p53 se une a esta secuencia Dp53RE en el gen DmKDM4B. El análisis fue hecho a través de ensayos de ChIPs y qPCRs, como control positivo del ensayo se utilizó a la secuencia Dp53RE de reaper y como control negativo la secuencia promotora del gen Sgs8. Los resultados demuestran que efectivamente p53 se une a los sitios Dp53REs tanto de KDM4B como de reaper y esta unión se vio sobreestimulada en ambos genes después de la irradiación con luz UV. Sin embargo, p53 no se une significativamente a la región promotora de Sgs8 en ninguna de las dos condiciones (Fig. 26).



Figura 26. Después de la irradiación con luz UV, p53 se une a al sitio Dmp53RE que presenta el gen DmKDM4B. A. Secuencia consenso de Dmp53RE en el gen *DmKDM4B*. B. Ensayos de ChIPs realizados contra la proteína p53 en la mosca *wt* y wt+UV. qPCRs que amplifican los Dmp53REs de *DmKDM4B y reaper* (control +), y la región promotora de *Sgs8* (control -).

Con base en todo lo anterior podemos sugerir que la desmetilasa DmKDM4B es necesaria para una eficiente reparación de los sitios dañados por la irradiación con luz UV, de manera dependiente a Dmp53.

DISCUSIÓN

1. Disminución de la 3meK9H3 después de irradiar el DNA con luz UV

Es trascendental resaltar el papel que juega el dinamismo de la cromatina en los diferentes procesos nucleares, como lo son la replicación, transcripción, recombinación y la reparación del DNA (3). Este dinamismo es establecido principalmente por las modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas, destacando las acetilaciones y las metilaciones como marcas que presentan una participación importante en el mantenimiento de la integridad nuclear. Cuando dicha integridad en el DNA es alterada, en este caso por la irradiación con luz UV, la cromatina representa la plataforma primaria sobre la que la maquinaria de reparación deberá actuar. Uno de los procesos más importantes de reparación del DNA dañado por luz UV, es la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Recordemos que en la fase de reconocimiento del DNA dañado debe haber una relajación de la cromatina, para que toda la maquinaria de NER pueda acceder al DNA y repararlo. En este punto de apertura de la cromatina ha sido ampliamente estudiada la acetilación de histonas (relaja-cromatina) en específico la acetilación de la histona H3 la cual resulta vital para una correcta reparación por NER (37-43). Se sabe que después de la irradiación con luz UV se presenta un incremento en los niveles de acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (AcK9H3), e interesantemente esta incremento es dependiente de p53, tanto en células humanas como en Drosophila melanogaster (42,43). Si tomamos en cuenta que las regiones de heterocromatina son ricas en la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3) y que la acetilación en este mismo residuo (AcK9H3) es su marca antagónica, entonces para que puedan incrementar los niveles de la AcK9H3 en la heterocromatina, primero es necesario que se desmetile dicho residuo. Esta hipótesis la hemos demostrado a lo largo de este trabajo, ya que observamos un decremento de los niveles de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV en la mosca wt, tanto a nivel global del genoma como en las regiones de heterocromatina constitutiva y facultativa.

2. La disminución de la 3meK9H3 que se observa en las regiones de heterocromatina es dependiente de p53

Interesantemente después de irradiar con luz UV a las moscas $p53^{-2}$. incrementan los niveles de la 3meK9H3 pero solo en las regiones de heterocromatina facultativa. Probablemente las células que no presentan p53 y además son dañadas con luz UV, prefieren heterocromatinizar genes que se expresan estadio o ambiente especifico, para después irse a apoptosis, ya que esta mosca p53^{-/-} presenta mayor sensibilidad a la luz UV que la mosca wt (43). A diferencia en la región de heterocromatina constitutiva no se presenta cambio en esta marca después de la irradiación en la mosca p53^{-/-}. Por lo tanto, la disminución de la 3meK9H3 que se presenta en las regiones de heterocromatina después de UV, es p53 dependiente. Además, se confirmó que la proteína p53 es importante para mantener los niveles basales de las modificaciones postraduccionales de las histonas. Esto apoyado por nuestro trabajo, donde las moscas afectadas en p53 presentan disminuidos los niveles de la 3meK9H3, así como de un trabajo previo donde se observa el mismo comportamiento pero con la acetilación de la K14 de la histona H3 (43). Estos resultados resaltan el importante papel de p53 en el mantenimiento de ciertas modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas, tanto en condiciones normales de las células como en respuesta a daño al DNA.

3. La disminución de la 3meK9H3 observada después de la irradiación con luz UV, parece ser consecuencia de una desmetilación efectuada por DmKDM4B, de manera p53 dependiente

Es trascendental que exista una coordinación entre la metilación y desmetilación de histonas para así lograr mantener la integridad del genoma cuando el DNA es dañado por luz UV. En cuanto a la metilación de histonas se refiere, existe solo un trabajo donde se reporta la metilación de la lisina K79H3 después de la irradiación con luz UV (44). Sin embargo, nuestro trabajo es el primero que muestra que una desmetilación, como lo es, la desmetilación de la 3meK9H3 es vital para el proceso de NER. KDM4B es la enzima responsable de esta desmetilación post-UV, esto con base en que la mosca afectada en esta desmetilasa: presenta mayor sensibilidad a luz UV, no repara los CPDs, muestra altos niveles de la 3meK9H3 y no desmetila la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV.

incremento del RNA mensajero y de la proteína DmKDM4B después de la irradiación, dicho incremento se vio afectado en la mosca $p53^{ns/ns}$ en ambas condiciones. Esto nos podría hablar de una regulación de la expresión de DmKDM4B por Dmp53. Interesantemente, se encontró un elemento de respuesta a p53 cerca de la región promotora del gen DmKDM4B y en nuestro trabajo demostramos que efectivamente p53 se une a esta secuencia después de la irradiación con luz UV. Por lo tanto proponemos que la proteína p53 es quien coordina la expresión de KDM4B después de la irradiación con luz UV. Correlacionando con un estudio previo donde células humanas afectadas en p53 y dañadas con un agente toxico, presentan una reducción de los niveles del mensajero de la enzima JMJD2B (KDM4B) (57). Todo lo anterior sugiere fuertemente que KDM4B es un blanco más de p53, como lo son también XPC y DDB2 (50), proteínas de NER implicadas en el reconocimiento del DNA dañado en las regiones del DNA no transcritas. Nuestros datos corroboran nuevamente la importante participación que presenta la proteína p53 en respuesta a la irradiación por luz UV, así como lo hace en respuesta a diferentes factores de estrés (48).

4. Restablecimiento de la estructura de la cromatina después de la irradiación por luz UV

No podemos olvidar la importancia que también debe presentar este dinamismo en la fase de restablecimiento de la cromatina, una vez que se ha reparado el DNA. En este punto hemos observado una recuperación de la 3meK9H3 después de una ventana larga de tiempo post-UV (anexo1). Se sabe que después de la reparación por NER se presenta un cambio de la histona H3 por su variante la histona H3.1, como marca de memoria de daño (45). Entonces muy probablemente esta variante al ser incorporada a la cromatina sea trimetilada por la enzima Su(var)3-9, todo esto en el proceso de reestructuración de la heterocromatina después de reparar el DNA dañado. Todo lo anterior nos permite resaltar el importante papel que juega la metilaciòn de la lisina 9 de la histona H3 (meK9H3) en el mantenimiento de la integridad del genoma cuando el DNA es dañado con luz UV. Esto es apoyado por un trabajo reciente donde observan que se requiere mantener los niveles de la meK9H3 por la enzima Su(var)3-9 para garantizar la estabilidad de la heterocromatina (58).

66

MODELO

Con base en los resultados de este trabajo y a los datos publicados (referidos en la introducción) sobre el papel que juega la dinámica de la cromatina en NER, se propone el siguiente modelo (59). Cuando el DNA es dañado con luz UV, el punto de partida para la reparación del daño es la detección del DNA distorsionado por los CPDs o 6-4PPs. El aducto en el DNA producido por los CPDs en las regiones de heterocromatina distorsiona la unión DNA-histonas lo que permite ser reconocido por el complejo DDB1-DDB2. Este complejo monoubiquitina a las histonas H2A, H3 y H4, modificando así la estructura del nucleosoma y permitiendo la incorporación del complejo XPC-HR23Bcentrina2. Ahora XPC y DDB2 son ubiquitinados, esto libera a DDB2 y estabiliza la unión de XPC al DNA. Posteriormente son reclutados complejos remodeladores como SWI/SNF y INO80 que a través de la hidrólisis del ATP relajarán un poco más la región dañada para el arribo de las enzimas modificadoras de las histonas. Dentro de ellas podriamos mencionar a las HMTs, que metilarian a la K79H3, así como la demetilasa KDM4B que al disminuir los niveles de la 3meK9H3, permitiría que HATs como Gcn5 incrementaran los niveles de acetilación en este mismo residuo (AcK9H3). Toda esta dinámica en conjunto causaría una completa relajación de la cromatina en la zona dañada, con una posible expulsión de nucleosomas. Posteriormente el complejo XPC-HR23B es reconocido por el resto de la maguinaria de NER, permitiendo que la remoción del DNA dañado se lleve a cabo de manera correcta. Una vez que el DNA es reparado la variante de histona H3.1 es incorporada por CAF-1, probablemente con la finalidad de establecer una memoria en la cromatina de daño al DNA. Finalmente esta región de heterocromatina es reestablecida a su estado original, posiblemente en este punto participen HMTs como Su(var)3-9 y otras proteínas hasta ahora desconocidas (59), (Fig.27).



Figura 27. **NER y Cromatina**: **1.** Daño al DNA con luz UV, **2**. Formación de dimeros de pirimidina (CPDs). **3.** Reconocimiento del daño, ubiquitinación de las histonas H2A, H3 y H4. **4**. Participación de complejos remodeladores (SWI/SNF), participación de DmKDM4B en la disminución de la 3meK9H3, acetilación de la lisina K9 de la histona H3 (AcK9H3) **5**. Despliegue de la maquinaria de NER, para reparar el DNA. **6**. Síntesis de la nueva de DNA. **7**. Reestructuración de la cromatina. Figura tomada de (59).

ANEXOS

1. Restablecimiento de la cromatina después de la reparación del DNA

Ahora nos preguntamos, ¿qué pasa con la cromatina después de la reparación del DNA? ¿Se restablecerá la marca de 3meK9H3? Para contestar estas preguntas decidimos analizar en *rover* (heterocromatina constitutiva) el estado de la 3meK9H3 a las 3h y 15h posteriores a la irradiación con luz UV. Estos resultados son preliminares ya que no se completó el triplicado. Interesantemente observamos que a las 3h la marca todavía se encuentra disminuida, sin embargo a las 15h se observa una recuperación casi total de la 3meK9H3. (Fig.1).



Figura 1. Restablecimiento de la 3meK9H3. Ensayos de ChIPs y qPCR. En el eje de las X se observa los tiempos 0, 30min, 3h, 15h post-UV. En el eje de las Y se observa el porcentaje inmunoprecipitado respecto al imput. (ChIP: n=2).

Recordemos que la remoción de CPDs comienza a las 4h y a las 24h casi se completa, como se observó en la figura 19. Por tanto esto nos sugiere que efectivamente se restablece la estructura de la cromatina una vez que el DNA fue reparado. Ahora sería muy interesante estudiar si dicho proceso de reheterocromatinización es vía RNAi, como ha sido reportado (47).

2. Dinamismo de la 3meK20H4 después de la irradiación con luz UV

También decidimos analizar el comportamiento de otra marca de heterocromatina: la trimetilación de la lisina K20 de la histona H4 (3meK20H4) después de la irradiación con luz UV, tanto en la mosca *wt* como en la mosca *Dmp53-/-*. Se realizó una cuantificación global de la 3meK20H4, a través de ensayos de inmunofluorescencias de cromosomas politénicos. Los resultados de la cuantificación de la la 3meK20H4 después de la irradiación presentaron un comportamiento diferente al de la 3meK9H3. Interesantemente la 3meK20H4 incrementa después de la irradiación con luz UV en la mosca *wt*. Asimismo los niveles basales de esta marca incrementan significativamente en la mosca *Dmp53-/-*, sin embargo después de la irradiación disminuye la marca ligeramente. Figura 1.



Figura 1. La 3meK20H4 presenta variaciones tanto en sus niveles basales como en después de la irradiación con luz UV. Recopilación de las frecuencias promedio de la 3meK20H4 para cada una de las cuatro condiciones (*wt*, *wt* irradiada UV; *Dmp53-/-*, *Dmp53-/-* irradiada UV). n= 20 Valor de p< 0.05.

El incremento de la 3meK20H4 que se observa después de la irradiación con luz UV en la mosca *wt*, nos muestra que cada marca presenta un comportamiento muy particular después de la irradiación con luz UV. Posiblemente este incremento de la marca sea una manera de protección nuclear, al compactar regiones específicas del núcleo, mientras repara otras regiones. Un estudio previo apoya la importancia de la 3meK20H4 cuando las células son dañadas con luz UV, debido a que observaron una mayor sensibilidad a la irradiación con luz UV en células mutadas en Su(var)4-20, enzima responsable de poner esta marca (60). También podemos sugerir que p53 es una proteína clave en el mantenimiento de las modificaciones de histonas, ya que al no encontrarse p53 se alteran los niveles basales de la 3meK20H4, como también lo observamos para la AcK14H3 y para la 3meK9H3 (43), (Fig. 1).
CONCLUSIONES

1. Se encontró una disminución de la 3meK9H3 después de la irradiación con luz UV, tanto a nivel global, como en las regiones de Heterocromatina constitutiva y H. facultativa, que es dependiente de p53.

2. Se observa un aumento de la 3meK9H3 a nivel global y en H. facultativa después de la irradiación con luz UV en la mosca p53 -/- .

3. En la región de eucromatina la 3meK9H3 no varía después de la irradiación con luz UV.

4. La enzima DmKDM4B es la responsable de la disminución de 3meK9H3, tanto a nivel global como local en la Heterocromatina constitutiva y facultativa.

5. p53 regula la transcripción de la enzima KDM4B después de la irradiación con luz UV.

PERSPECTIVAS

1.- Estudiar si el proceso de restablecimiento de la cromatina después de la reparación del DNA dañado por luz UV, se lleva a cabo por la vía RNAi para su posterior heterocromatinización.

2.- Analizar si en células humanas también se presenta una disminución de la
3meK9H3 después de la irradiación con luz UV y analizar si también depende de DmKDM4B y p53.

3.- Analizar a nivel de todo el genoma el patrón (por lo menos) de la 3meK9H3y la AcK9H3 después de la irradiación con luz UV, tanto en células humanassanas como en células afectadas en p53.

BIBLIOGRAFÍA

- T.H. Eickbush, E.N. Moudrianakis, 1978. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein interactions, Biochemistry 17. 4955-4964.
- 2. N. Happel, I.D. Doenecke, 2009. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function, Gene 431. 1-12.
- Allis C. D., Jenuwein T., Reinberg D., Chaparros M. L., 1st Ed, 2007. Epigenetics:Genetics and Genome Sciencie; Molecular Biology. Edited by Cold Spring Harbor Books.
- 4. Trojer P, Reinberg D. 2007. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? Mol Cell. 28(1). 1-13.
- Filion GJ, van Bemmel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B, 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. Cell 143(2). 212-24.
- 6. Cedric R. Clapier and Bradley R. Cairns, 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. Annu. Rev. Biochem. 78. 273-304.
- Dechassa ML, Sabri A, Pondugula S, Kassabov SR, Chatterjee N, Kladde MP, Bartholomew B. 2010. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes. Mol. Cell 38(4). 590-602.
- Paul B. Talbert and Steven Henikoff. 2010. Histone variants ancient wrap artists of the epigenome. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11(4). 264-75.

- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. 2010. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. Proc. Natl. Acad. Sci. 107(32). 14075-80.
- 10. Suganuma T., Workman J.L. 2008. Crosstalk among Histone modifications. Cell 135. 604-607.
- 11. A. Vaquero, A Loyola, D. Reinberg, 2003. The constantly changing face of chromatin. Sci. Aging Knowledge Environ. 14. RE4.
- Lee JY, Wei S, Lee TH. 2011. Effects of Histone Acetylation by Piccolo NuA4 on the Structure of a Nucleosome and the Interactions between Two Nucleosomes. J. Biol Chem. 286(13). 11099-109.
- Christèle Maison and Geneviève Almouzni. 2004. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. Nat Rev Mol Cell Bio. 4. 296-304.
- 14. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. 2002. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. Science. 295(5562). 2080-3.
- 15. Sims III R., Nishioka K., Reinberg D. 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends Genet. 19. 629-639.
- 16. Bannister A., Kouzarides T., 2005. Reversing histone methylation. Nature 436. 1103-1106.
- Whetstine J.R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y., 2006. Reversal of Histone Lysine Trimethylation by the JMJD2 Family of Histone Demethylases. Cell 125. 1-15.

- 18. Zhang Y., Klose R.J., 2007. Regulation of histone methylation by demethylation. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8. 307-318.
- Lloret-Llinares M., Carre C., Vaquero A., de Olano N., Azorin F., 2008. Characterizion of Drosophila melanogaster JmjC+N histone demethylases. Nucleic Acids Res. 36. 2852–2863d.
- Lin C.-H., Li B., Swanson S., Zhang Y., Florens L., Washnum M. P., Abmayr S. M., Workman J. L., 2008. Heterochromatin Protein 1a Stimulates Histone H3 Lysine 36 Demethylation by the Drosophila KDM4A Demethylase. Molecular Cell 32: 696-706.
- 21. Friedberg E. C., Walker G. C. and Siede W. 1995. DNA repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington D.C.
- Suquet C., Smerdon M.J., 1993. UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. J. Biol. Chem. 268. 23755-23757.
- 23. Kim J.K., Patel D., Choi B.S., 1995. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6–4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity, Photochem. Photobiol. 62 . 44–50.
- Tijsterman M., de Pril R., Tasseron-de Jong J.G., Brouwer J., 1999.
 RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6–4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast, Mol. Cell Biol. 1. 934–940.
- 25. Hanawalt P. C. 2002 . Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21(58). 8949-8956.
- 26. Liren Liu, Jennifer Lee and Pengbo Zhou. 2010. Navigating the Nucleotide Excision Repair Threshold. J. Cell. Physiol. 224: 585-589.

- 27. Bassal S., El-Osta ., (2005). DNA Damage Detection and Repair, and the Involvement of Epigenetics Status. Human Mutation 25. 101-109.
- 28. Thoma F. 1999. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. EMBO J. 18(23). 6585-98.
- Bohr V.A., Smith C.A., Okumoto D.S., Hanawalt P.C. 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall, Cell 40. 359–369.
- Fitch M.E., Nakajina S., Yasui A., Ford J.M., 2003. In vivo recruitment of XPC to UV induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 Gene Product, J. Biol. Chem. 278 46906–46910.
- Guerrero-Santoro J., Kapetanaki M.G, Hsieh C.L, Gorbachinsky I., Levine A.S., Rapic'-Otrin V., 2008. The cullin 4B-based UV-damage DNA-binding protein ligase binds to UV-damage chromatin and ubiquitinates histone H2A, Cancer Res. 68. 5014–5022.
- 32. Wang H., Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y., 2006. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. Mol. Cell 22. 383–394.
- Hara R., Sancar A., 2003. Effect of damage type on stimulation of human excision nuclease by SWI/SNF chromatin remodeling factor, Mol. Cell. Biol. 23. 4121–4125.
- 34. Gong F., Fahy D., Smerdon J.M., 2006. Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide exicision repair, Nat. Struct. Mol. Biol. 13. 902–907.

- Zhao Q., Wang Q.E., Ray A., Wani G., Han C., Milum K., Wani A.A.J.,
 2009. Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex, J. Biol Chem. 284. 30424–33432.
- Jiang Y., Wang X., Bao S., Guo R., Johnson D.G, Shen X., Li L., 2010. INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107. 17274–17279.
- 37. Ramanathan B., Smerdon M.J., 1989. Enhanced DNA repair sythesis in hyperacetylated nucleosomes, J. Biol. Chem. 264. 11026–11034.
- 38. Teng Y.,, Yu Y., Waters R., 2002. The Saccharomyces cerevisiae histone acetyltrasferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene, J. Mol. Biol. 316. 489–499.
- 39. Guo R., Chen J., Mitchell D.L., Johnson D.G., 2008. GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. Nucleic Acid Res. 39(4).1390-7.
- 40. Yu Y., Teng Y., Liu H., Reed S.H., Waters R., 2005. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus, Proc. Natl. Acad. Sci. 102. 8650–8655.
- 41. Teng Y., Liu H., Gil H.W., Yu Y., Waters R., Reed S.H., 2008. Saccharomyces cerevisiae Rad 16 mediates ultraviolet-dependent histone H3 acetylation required for efficient global genome nucleotideexcision repair, EMBO Rep. 9. 97–102.
- 42. Rubbi C, Milner J., 2003. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. The EMBO Journal Vol.22 No. 4, 975-986.

- Rebollar E. Valadez-Graham V., Vázquez M., Reynaud E., Zurita M. 2006. Role of the p53 homologue from *Drosophila melanogaster* in the maintenance of histone H3 acetylation and response to UV-light irradiation. FEBS letters 580: 642-648.
- 44. Chaudhuri S., Wyrick J. and Smerdon M.J., 2009. Histone H3 Lys 79 methylation is required for efficient nucleotide excision repair in a silenced locus of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research.1-11.
- 45. Polo S.E., Roche D., Almouzni G. 2006. New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells, Cell 127. 481–493.
- 46. Zhu Q., Wani G., Arab H.H., El-Mahdy M.A., Ray A., Wani A.A. 2009. Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damage genomic sites, DNA Rep. 8. 262–273.
- Djupedal I., Ekwall K. 2009. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi, Cell Res. 19. 282–295
- 48. Meek D. W. 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? Nat. Rev. Cancer 10. 714-23.
- 49. Ford J.M. and Hanawalt P.C. 1995. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for *p53* mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance, Proc. Natl. Acad. Sci. 92. 8876–8880.
- 50. Fitch ME, Cross IV, Ford JM. 2003. p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo. Carcinogenesis. 5:843-50.

- 51. Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, et al. 1995. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. Nat. Genet. 10(2). 188-95.
- 52. Sogame, N., Kim, M. and Abrams, J.M. 2003. Drosophila p53 preserves genomic stability by regulating cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4696–4701.
- 53. Kenneth J. Livak* and Thomas D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DD*C*T Method. METHODS 25, 402–408.
- 54. Petesch S.J. and Lis J.T. 2008. Rapid, Transcription-Independent Loss of Nucleosomes over a Large Chromatin Domain at Hsp70 Loci. Cell 134. 74-84.
- 55. Yaragatti M, Basilico C, Dailey L. 2008. Identification of active transcriptional regulatory modules by the functional assay of DNA from nucleosome-free regions. Genome Res. 18(6). 930-8.
- 56. Brodsky, M.H., Nordstrom. W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M. and Abrams, J.M. 2000. Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. Cell 101. 103-113
- 57. Birgitte Lid Adamsen et. al., and Paula M. De Angeles. 2007. Apoptosis, cell cycle progresision and gene expression in TP53-depleted HCT116 colon cells in response to short-term 5 fluorouracil treatment. Int. Journal of Oncology 31. 1491-1500.
- 58. Peng, J. C., and Karpen, G. H. 2009. Heterochromatic genome stability requires regulators of histone H3 K9 methylation. PLoS Genet. March, (5)3. e1000435.

- 59. Palomera-Sanchez Z., Zurita M. 2011. Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. DNA Repair 10(2). 119-25.
- 60. Schotta G., Sengupta R., Kubicek S., Malin S., Coger M., Callen E., Celeste A., Pagani M., Opravil S., De La Rosa-Velazquez I.A., Espejo A., Bedford M.T., Nussenzweig A., Busslinger M., Jenuwein T., 2008. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse, Genes Dev. 22. 2048–2061.

TESIS DE LICENCIATURA DIRIGIDA



"Posible participación de la desmetilasa dKDM4B en el daño al ADN por luz UV"

TESISPARAOBTENERELTÍTULODE:LICENCIADAENCIENCIASPRESENTAESENTALYERIBUCIOMÉNDEZ

Directora de Tesis: M. en C. Zoraya Palomera Sánchez

2011



ARTICULOS PUBLICADOS

Drosophila p53 Is Required to Increase the Levels of the dKDM4B Demethylase after UV-induced DNA Damage to Demethylate Histone H3 Lysine 9^{*IS}

Received for publication, March 29, 2010, and in revised form, July 21, 2010 Published, JBC Papers in Press, July 30, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.128462

Zoraya Palomera-Sanchez, Alyeri Bucio-Mendez, Viviana Valadez-Graham¹, Enrique Reynaud, and Mario Zurita² From the Department of Developmental Genetics, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 62250, Cuernavaca Morelos, México

Chromatin undergoes a variety of changes in response to UVinduced DNA damage, including histone acetylation. In human and Drosophila cells, this response is affected by mutations in the tumor suppressor p53. In this work, we report that there is a global decrease in trimethylated Lys-9 in histone H3 (H3K9me3) in salivary gland cells in wild type flies in response to UV irradiation. In contrast, flies with mutations in the Dmp53 gene have reduced basal levels of H3K9me3, which are then increased after UV irradiation. The reduction of H3K9me3 in response to DNA damage occurs preferentially in heterochromatin. Our experiments demonstrate that UV irradiation enhances the levels of Lys-9 demethylase (dKDM4B) transcript and protein in wild type flies, but not in Dmp53 mutant flies. Dmp53 binds to a DNA element in the dKdm4B gene as a response to UV irradiation. Furthermore, heterozygous mutants for the *dKdm4B* gene are more sensitive to UV irradiation; they are deficient in the removal of cyclobutane-pyrimidine dimers, and the decrease of H3K9me3 levels following DNA damage is not observed in *dKdm4B* mutant flies. We propose that in response to UV irradiation, Dmp53 enhances the expression of the dKDM4B histone demethylase, which demethylates H3K9me3 preferentially in heterochromatin regions. This mechanism appears to be essential for the proper function of the nucleotide excision repair system.

In eukaryotic cells, the dynamics of chromatin structure play a central role in all processes involving nuclear DNA, including transcription, replication, recombination, and repair. It has been shown that ATP-dependent complexes that alter the structure and array of nucleosomes, together with complexes containing enzymes that modify different histone residues, are the primary modulators of chromatin structure.

The most extensively studied histone modifications include acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, and ADP-ribosylation (1, 2). It is possible to correlate the status of the chromatin with the residue that is modified and the type of modification, in a manner that is dependent on the specific histone involved. Some histone modifications are prevalent in heterochromatic regions, and others are preferentially linked to euchromatin. For instance, in the case of DNA transcription and replication, it is generally accepted that relaxed chromatin facilitates the incorporation of factors that recognize elements in the DNA, allowing multisubunit complexes to assemble and achieve these functions. A similar situation may occur during DNA repair, because the DNA repair machinery has to repair DNA in the context of chromatin (3).

DNA damage by UV irradiation in eukaryotic cells is repaired via the nucleotide excision repair (NER)³ mechanism. In vitro reconstituted assays have demonstrated that removal of a lesion requires recognition by XPC-HR23b and subsequent unwinding of the DNA duplex by TFIIH (3, 4). The resulting single strands of DNA are then stabilized by xeroderma pigmentosum A and replication protein A, and the margins of the resulting DNA bubble are recognized by XPG and ERCC1-XPF, which generate 3' and 5' incisions on the damaged strand, respectively (3, 4). However, in vivo, the NER machinery must recognize DNA damage within the context of chromatin. In the case of transcribed regions, the chromatin is accessible to the recruitment of the NER machinery without the need for XPC-HR23b, because a stalled RNA polymerase II is also capable of recruiting the NER factors (3, 4). In silenced chromatin, the DNAbinding protein complex (DDB) acts in conjunction with XPC-HR23b to identify sites of UV damage (5, 6). DDB consists of a heterodimeric complex of the DDB1 and DDB2 proteins, which interact with the ubiquitin ligases Cul4A or Cul4B and RBX1, respectively (7). The DDB1-DDB2-CUL4-RBX1 complex recognizes UV damage in the chromatin and monoubiquitinates histone H2A at the sites of UV lesions (7). In addition to H2A ubiquitination, a complex composed of Cul4-DDB-ROC1 ubiquitinates histones H3 and H4 at the UV-damaged site in the chromatin (8). Together, these modifications of H3 and H4 weaken the interaction between the histones and the DNA, facilitating the action of the NER machinery (8).



^{*} This work was supported by funds from PAPIIT/UNAM grant no. IN 20109-3, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia Grant 48550, and funds from the Howard Hughes Medical Institute (to M. Z.).

The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Figs. S1–S4.

¹ Supported by a Lóreal-Organización de las Naciones Unidas para la Educación, Ciencia y Cultura-Académia Mexicana de Ciencias (UNESCO-AMC) scholarship.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-555-6227659; E-mail: marioz@ibt.unam.mx.

³ The abbreviations used are: NER, nucleotide excision repair; CPD, cyclobutane-pyrimidine dimer; dKDM4B, *Drosophila* lysine demethylase 4B; Dmp53, *Drosophila* p53; H3K9me3, histone H3 lysine 9 trimethylated; H3K9Ac, histone H3 lysine 9 acetylated; Hsp70, heat shock protein 70; Dp53RE, *Drosophila* p53 response element; DDB, DNA-binding protein complex; qPCR, quantitative PCR.

Another histone modification that has been linked to the response to UV damage is histone acetylation. Acetylation of histones generates more relaxed and accessible chromatin, facilitating access by the NER machinery. For example, H3K9 acetylation is increased after UV irradiation. However, in human cancer cell lines carrying mutations that affect the p53 gene, the basal levels and the increase in H3K9 acetylation are affected, together with a general increase in histone acetylation (9, 10). A similar situation has been identified in *Drosophila*: in *Dmp53* mutant flies, the increase in H3K9 acetylation after UV irradiation is dramatically affected (11). Thus, in both human and *Drosophila* cells, p53 has a direct influence on histone acetylation in response to UV irradiation.

Another important and highly studied covalent modification of histones is methylation. Lysine methylation has been implicated in gene regulation and, depending on the residue and state of methylation (mono-, di-, and trimethylation), has been recognized as a marker for gene repression or activation (12– 14). Several histone demethylases have recently been discovered. For instance, LSD1 can demethylate mono- and dimethylated histones H3K4 and H3K9 in a FAD oxidation reaction (15, 16). In addition, a family of histone demethylases containing a JmjC domain has been identified. This family of proteins can remove the methyl group from all three stages of methylated lysines using Fe(II) and α -ketoglutarate as cofactors (17–19).

The effect and role of histone methylation in NER has only recently been investigated in yeast (20, 21). One study observed that H3K79me is important for correct action of the NER mechanism at the HML locus (22). However, the roles of other methylated histone residues in NER remain completely unknown.

In this work, we analyze the effect of UV-induced DNA damage on histone H3K9me3 in wild type and *Dmp53* mutant *Drosophila*. Remarkably, Dmp53 is required to enhance the expression of the H3K9me3 demethylase dKDM4B, which in turn reduces the levels of this mark preferentially in heterochromatin. This process seems to be essential for the proper action of the NER mechanism in the fly.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Drosophila Stocks—The wild type strain was OreR. The *Dmp53^{-ns}* strain was generated by direct targeting (23). The *P* element insertion mutant in EP-KDM4B, *EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹/*CyO*, was obtained from Bloomington Stock Center at Indiana University (stock number 11336).

UV Irradiation—For UV irradiation, the third instar larvae wild type, *Dmp53* null, and *EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹ were collected and irradiated at UV light 200 J/m² using a UVB Stratalinker 2400 (Stratagene). After irradiation, the larvae were incubated at 25 °C for 30 min, and the salivary glands were dissected in 0.7% NaCl for polytene chromosomes preparations. Only for smuch preparations were the salivary glands of WT larvae directly irradiated at UV light 100 J/m², and they were incubated at 25 °C for 60 min before fixation.

Inmunofluorescence of Polytene Chromosomes and H3K9me3 Quantification—Salivary glands were fixed in solution 1 (PBS, 3.7% paraformaldehyde, and 1% Triton X-100) and then in solution 2 (3.7% paraformaldehyde, 50% acetic acid). The chromosomes were spread on poly-L-lysine-coated microscope slides. Anti-H3K9me3 antibody (Upstate) was used at 1:200, and anti-Cy3-conjugated secondary antibody (Rockland) was used at 1:300. The images were taken on a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510 META). The pixel intensity distribution was measured along the chromosomes, using the photon counting and length profile programs from the confocal microscope operating system, where the maximum number of pixels is 256, which represents the maximum accumulation of target bound to secondary antibody, and the minimum value is 0, which represents the absence of signal.

Statistical Analysis—The statistical analysis was performed as described in Ref. 11. For chromosome scanning we selected randomly approximately two-thirds of each genome independently of the chromosome arm, obtained in an average of 800 pixels/cell. At last 15 genomes were analyzed of each condition. The values were emptied out in a histogram representing the pixel arbitrary intensity (0–256 pixels) against the frequency. After we calculated the average frequency of each different condition, we performed the X² test, using the Excel program. The X² test was used to determine whether there was a significant difference between the frequency distributions. If the *p* value of each X² test was <0.05, it was considered that a significant difference exists between the analyzed samples.

Smuch Nuclei Preparations and Nuclei Immunostainings—For salivary gland nuclei smuch preparations, we dissected three pairs of late third instar larval salivary glands in $1 \times PBS$, and after UV irradiation the tissue was placed on a slide in a drop of $1 \times PBS$, covered with a coverslip, and gently squashed (44). The nucleus were then fixed in 4% paraformaldehyde in 2% PBST (PBS with 0.2% of Triton X-100) at 4 °C for 20 min. For washing, the preparations were immersed in 0.4% PBST for 40 min. After they were blocked with 1% normal goat serum in 0.4% PBT for 2 h at 4 °C. Staining was performed as in immunofluorescence of polytene chromosomes, where anti-DmKDM4B was used at 1:50, and anti-CPD (Kamiya labs) was used at 1:25.

Chromatin Immunoprecipitations—The third instar larvae salivary glands were dissected in ice-cold Roberts buffer (87 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.6), and the salivary glands (~120 pairs) were fixed for 15 min at room temperature in 1 ml of cross-linking solution (1% formaldehyde/Roberts buffer) with rotation. The reaction was stopped by washing for 5 min in 1 ml of glycine buffer (125 mM glycine/Roberts buffer) after the salivary glands were washed for 5 min in 1 ml of Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6) with rotation. The glands were then resuspended in 600 µl of sonication buffer (8 mM KCl, 0.5% Igepal CA-630, 1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8) and sonicated 11 min (pulsed 11 times for 30 s, paused 30 s) in an Ultrasonic Processor. The chromatin was precleared in 1 ml of immunoprecipitation buffer (0.01% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, 167 mM NaCl) with 40 μ l of protein A/G beads (Invitrogen) for 3 h at room temperature. 10% of the chromatin was taken for input reaction. The anti-H3K9me3 (Upstate), anti-H3.1 (Upstate), and anti-Dmp53 (Santa Cruz) antibodies were incubated overnight with rotation at 4 °C. Antibody-chromatin complexes were recovered by incubation with 50 μ l of protein A/G beads overnight at 4 °C. The washes were per-



formed four times for 10 min at room temperature with 1 ml of radioimmune precipitation assay buffer, 1 ml of high salt buffer, 1 ml of LiCl buffer, and 1 ml of TE buffer. Then the samples were incubated with RNase A (Sigma) at 2 h, incubated with proteinase K (Roche Applied Science) at 2 h, and incubated at 65 °C overnight to reversal of cross-linking. Finally the DNA was extracted with phenolchloroform and diluted in 40 μ l of H₂O. To calculate the amount of target sequence (rover, AL1, NippedA, Plc21, Sgs8, Hsp70Aa, rp49, and repaer) in immunoprecipitated chromatin, we performed real time qPCR.

RNA Extraction—Total RNA was isolated from third instar larvae using a TRIzol (Invitrogen), and 10 μ g of total RNA was converted to cDNA using reverse transcriptase enzyme (Invitrogen). RNA quantification of the levels of *KDM4B* transcripts was performed by real time qPCR.

Real Time qPCR Analysis—The primers pairs were designed to amplify 150-200-bp fragments. The qPCR analysis was performed with FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Applied Science) in the Light Cycler 1.5 instrument (Roche Applied Science). For the ChIP, the PCR was performed in triplicate, and serial dilutions of pure, input DNA were measured together with the immunoprecipitated DNA samples. This allowed calculation of the amount of target sequence in immunoprecipitated chromatin relative to the amount of target sequence in input chromatin called the percentage of input according to Champion-ChIPTM qPCR primers (quantitative real time PCR analysis of chromatin; SA Biosciences). We used three different ChIP experiments. For the analysis of the RNA levels, we used a constitutive gene as a calibrator (rp49), the PCR for each gene was made in triplicate, and serial dilutions of cDNA of wild type fly were measured together with the cDNA of treated flies. The sequences for the primers used in qPCR were: rover forward, 5'-CAACCAAGACCAACCTACCC-3'; rover reverse, 5'-GCTCATTTTAGTCTGTCCGC-3'; AL1 forward, 5'-CCCACACATTGTCCAGTGCA-3'; AL1 reverse, 5'-CGTAAGATAATCCAGAGCGG-3'; NippedA forward, 5'-CAGCGGTCAAGTTGTTGAAC-3'; NippedA reverse, 5'-GACGGATATGCCGGACTTTG-3'; Plc21 forward, 5'-GTT-CATCAGTGGGTCAGTAG-3'; Plc21 reverse, 5'-CAATATC-CCCGGACAAAATC-3'; Sgs8 forward, 5'-CTTTACCAGAT-GGTAACCGT-3'; Sgs8 reverse 5'-GAACGATGACACAGA-AAATG-3'; Hsp70Aa promoter forward 5'-CTGCAACTAC-TGAAATCAAC-3'; Hsp70Aa promoter reverse 5'-GGTCGT-TGGCGATAATCTCC-3'; Hsp70Aa 350 bp foward 5'-CCAA-GATCGGGGTGGAGTAT-3'; Hsp70Aa 350 bp reverse 5'-TGGGAGTCGTTGAAGTAGGC-3'; rp49 forward 5'-TCAAG-ATGACCATCCGCCCA-3'; and rp49 reverse 5'-GTTCTCTT-GAGAACGCAGGC-3'. For RT-PCR, the sequences were: dKdm4B forward, 5'-CCACTCAGACCGCTCAGACA-3'; and dKdm4B reverse, 5'-CTGCAACATCTGATGGCGTC-3'. For Dmp53 ChIP, the sequences were: Kdm4B forward, 5'-TGTCTGCGAGTGTGTTGTTG-3'; dKm4B reverse, 5'-GCG-TCTGATAAGCAGCCATC-3'; reaper forward, 5'-CCTTCT-TTGGCACCGTCTAC-3'; and reaper reverse, 5'-CTATGG-AAAAAGGGCGAAAA-3'.

UV Irradiation Sensitivity Assays—Third instar wild type and *EP-kdm4b*⁰³⁵³¹/+ larvae were irradiated at different UV light dosages (J/m²), using a UVB Stratalinker 2400 (Stratagene). The

larvae were then allowed to develop into adults, and the emerged population was counted.

Immunoassay for CPD Repair—The third instar larvae were irradiated at 200 J/m², and then DNA was isolated at different times after irradiation (5 min, 30 min, 4 h, 6 h, 12 h, and 24 h). One microgram of genomic DNA was denatured by heat and dotted onto a nylon membrane using a vacuum blotter (Bio-Dot microfiltration apparatus; Bio-Rad). To evaluate the CPD, a normal immunodetection blot was performed using an anti-CPD antibody (Kamiya Biomedical) diluted 1:1000.

Western Blots—Salivary glands from the third instar larvae were collected in lysis buffer (250 mM sucrose, 50 mM Tris, pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, plus protease inhibitors) and loaded in 10% SDS-PAGE gels. After the protein resolved, the gels were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked with 10% nonfat milk for 2 h and then incubated overnight with the dCPDKDM4B antibody at 1:1000 dilution and β -tubulin antibody at 1:2000 dilution. After washing, the membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Zymed Laboratories Inc.) for 1 h. Finally the membranes were washed, and the signals were detected with a chemiluminescence Western blot detection kit (Thermo Scientific). The Western blot quantification was performed using special software.⁴

RESULTS

Global H3K9me3 Levels Are Reduced after UV Irradiation, but This Response Is Affected in Dmp53 Mutant Flies—We have recently shown that global H3K9Ac levels are increased after UV irradiation in the *Drosophila* salivary gland polytene chromosomes and that this response is diminished in Dmp53-deficient organisms (11). Therefore, we decided to investigate the effect of UV irradiation on global H3K9me3 levels using a similar approach (11). An important advantage of these experiments is the use of a whole living organism with only a mutation in the *Dmp53* gene, a feature that is uncommon in cell lines derived from cancer patients expressing mutated p53 that have accumulated many mutations. Wild type and $Dmp53^{-ns}$ allele homozygous mutant (23) third instar larvae were irradiated with 200 J/m² (24, 25). After an average of 60-90 min of recovery, polytene chromosomes were prepared from irradiated and nonirradiated larvae for analysis by confocal microscopy. The signal intensities of ~ 20 genomes (60 linear chromosomes) were quantified using photon counting for each condition, as reported previously (11, 26). The chromocenter was not quantified; only the immunofluorescent regions on the chromosome arms were analyzed. In previous works, we demonstrated that the signal obtained by immunostaining of polytene chromosomes could be quantitatively measured (11, 26). This approach is more quantitative than Western blot analysis for two reasons: modified histones that do not form part of the chromatin are present in the nuclear lumen, and the high levels of H3K9me3 at the chromocenter do not interfere with quantification using this method. In addition, this assay allows direct analysis of

⁴ L. Miller, personal communication.



FIGURE 1. **Effect of UV irradiation on H3K9me3 global levels in WT and** *Dmp53* **null organisms.** *A*, example of H3K9me3 distribution in polytene chromosomes before and after UV irradiation. Note that in addition to the chromocenter (*white arrows*), where the signal is saturated, specific regions are stained with the antibody. In wild type organisms, the intensity of the chromocenter signal is practically not affected; however, in other chromosomal regions, a reduction of the signal is observed. In the case of Dmp53 mutant flies, there is an increase in the number of sites stained with the antibody after UV irradiation. *B*, H3K9me3 quantitative analysis in WT and *Dmp53*^{ns/ns} mutant polytene chromosomes before and after DNA damage. Note that the distribution of the histogram in the WT flies moves to the *left* after UV irradiation (*red line*) when compared with the nonirradiated organisms (*blue line; p* value = 1.9×10^{-3}). This indicates that a decrease in the frequency of pixels with higher intensity occurs after DNA damage. Also note that the distribution of the histogram that represents the H3K9me3 basal levels in the *Dmp53* null polytene chromosomes also moves to the *left*, and its area is also reduced when compared with the WT chromosomes (*p* value = 3.5×10^{-3}). On the contrary, after UV irradiation, the histogram that represents the HK9me3 levels in the *Dmp53* mutant chromosomes moves to the *left*, indicating an increase of the H3K9me3 levels (*p* value = 3.1×10^{-4}). *C*, column representation of the quantification of the relative intensity of the data presented in the figure.

many chromosomes to obtain hundreds of data points for each condition, thus guaranteeing statistically reproducible results (11, 26).

Examples of nonirradiated and irradiated chromosomes are shown in Fig. 1A. Notably, the irradiated samples show a reduction in the intensity and number of bands stained with the anti-H3K9me3 antibody. Fig. 1B shows the distribution of the relative fluorescent intensities for each condition. The signal distribution of the levels of H3K9me3 is different in the wild type chromosomes before and after UV irradiation (Fig. 1B). These wild type samples show a clear reduction in levels of H3K9me3 after UV-induced DNA damage, as indicated by the quantification of the signal (represented as a *bar graph* in Fig. 1C). In the case of the chromosomes from the $Dmp53^{-ns}$ mutant, we observed a reduction in the basal levels of H3K9me3, suggesting that chromatin structure and histone modifications are altered in the Dmp53^{-ns} mutant chromosomes (Fig. 1). Intriguingly, after UV irradiation, there is an overall increase in total H3K9me3 levels in the Dmp53 mutant chromosomes, as compared with the basal levels (Fig. 1, B and

C), suggesting that, in the absence of Dmp53, there is an increase in heterochromatization after DNA damage. These results, together with our previous work and reports of basal levels of H3K9Ac in human cells, indicate that chromatin in p53 mutants displays several differences from wild type chromatin at the level of histone modification (10, 11). Consequently, the response to UV irradiation is also affected at the level of covalent modifications of the nucleosome. On the other hand, in wild type chromosomes, there is a correlation between the previously reported increase in levels of H3K9Ac (11) and the global decrease in H3K9me3 levels after UV irradiation. A recent report that used human cells to study the DNA damage response on histone modifications using hydroxyurea and phelomycin did not find alterations in the H3K9me3 levels, although a clear reduction in H3K9me2 and H3K9me1 levels was observed in the hydroxyurea-treated cells (27). Taking this difference into account with our findings suggests that the type of DNA damage is important for the type of response, because hydroxyurea generates base oxidation, depurination, and



Link between the Histone Demethylase dKDM4B and Dmp53



FIGURE 2. **H3K9me3 levels in different chromatin regions in WT and** Dmp53 **null flies before and after UV irradiation.** Chromatin was prepared from salivary glands before and after irradiation of third instar larvae at 200 J/m² and immunoprecipitated using an anti-H3K9me3 antibody. The regions amplified are indicated in supplemental Fig. S1. The graphs show results from independent immunoprecipitation assays (n = 3). ChIP signals quantified by the means of quantitative polymerase chain reaction and are presented as the mean percentages of input chromatin precipitated at each region; the *error bars* indicate \pm S.D. *Mock* is a ChIP assay from the same salivary glands chromatin using an irrelevant IgG. *A*, H3K9me3 levels in the rover element. *B*, H3K9me3 levels in AL1 elements. Note that the basal levels of H3K9me3 are high in these constitutive heterochromatic regions and dramatically decrease after UV irradiation. In the case of the *Dmp53^{ns/ns} mutant*, the H3K9me3 levels are significantly reduced when compared with the wild type in basal conditions (p value = 0.001) in both heterochromatin regions, and no significant change occurs after UV irradiation. *C* and *D*, H3K9me3 levels in two facultative heterochromatin regions in third instar salivary glands. Note that in both regions after UV irradiation when compared with the nonirradiated *Dmp53* mutant flies (NippedA, p value = 0.001; Plc21 = 0.02). *E*, H3K9me3 levels in the *Sgs-8* gene promoter. Note that he levels are very low in all of the tested conditions. The nucleosome density of this region is shown in supplemental Fig. S2. *F*, H3K9me3 levels in the *H3F0PAa* promoter region (around the transcription initiation point) and the +200 to +400 nucleotide positions. A significant reduction in the H3K9me3 levels is observed in the H3F0PA promoter region (around the transcription initiation point) and the +200 to +400 nucleotide positions. A significant reduction in the H3K9me3 levels is observed in the H3F0PA promoter region (around the t

stalled replication forks, phelomycin generates doublestrand breaks, and as far as we know, NER is not involved in repairing this kind of damage in the DNA.

The Reduction of H3K9me3 Levels after UV Irradiation Occurs Preferentially in Heterochromatin—The confocal microscopy quantification method shows a reduction in the global levels of H3K9me3 after UV irradiation in polytene chromosomes. However, the response to DNA damage could differ, depending on chromatin conformation. Therefore, we decided to investigate the levels of H3K9me3 in constitutive and facultative heterochromatin, as well as in euchromatic regions. To perform this analysis, we selected two known constitutive heterochromatic sequences described in third instar larvae polytene chromosomes: the retrotransposon *rover* and the *AL1* element (supplemental Fig. S1). The promoter regions of the *Nipped A* and *Plc21* genes, which are not expressed in salivary glands, were analyzed as facultative heterochromatin. The promoter region of the *sgs8* gene, a region that is highly transcribed in salivary glands, and the Hsp70 promoter represented euchromatin. The *Hsp70* promoter is partially inactive without heat shock, but it is known that the nucleosome density is low at this site, because RNA polymerase II is poised on the promoter (28) (supplemental Fig. S1). To measure the levels of H3K9me3 at these regions, we used chromatin immunoprecipitation and real time PCR in both wild type and *Dmp53^{-ns}* mutant organisms before and after UV irradiation.



Link between the Histone Demethylase dKDM4B and Dmp53

In the case of constitutive heterochromatin (*rover* and *AL1*), the basal levels before UV irradiation of H3K9me3 are high in relation to the input (Fig. 2, A and B). However, these levels decrease following induction of DNA damage by UV irradiation (Fig. 2, A and B). These changes occur without the removal of nucleosomes, because ChIP assays using an antibody against canonical H3 do not show any difference between nonirradiated and irradiated organisms (supplemental Fig. S2). In addition, an increase in the levels of H3K9ac is detected at these sites (supplemental Fig. S2). In the facultative heterochromatin (Nipped and Plc21 promoters), the basal levels of H3K9me3 were not as high as in rover and AL1 but were significantly high (Fig. 2, C and D). However, the levels of H3K9me3 also decrease in facultative heterochromatin following UV irradiation (Fig. 2, C and D). When we analyzed the promoters of the sgs8 and Hsp70 genes, we found that the levels of H3K9me3 were low under basal conditions (Fig. 2, *E* and *F*). This result agrees with previous reports showing that the density of nucleosomes is low in the Hsp70 promoter region (28). Interestingly, we did observe a small decrease in H3K9me3 levels at the Hsp70Aa promoter after UV irradiation. When we analyzed the levels of H3K9me3 near the site where the first nucleosome is poised in the Hsp70 promoter, +200 to +350 (28), we also detected very low levels of H3K9me3. These levels remained unchanged after UV irradiation in wild type organisms (Fig. 2F). Similarly, we observed a very low density (or a complete absence) of nucleosomes on the sgs8 promoter. In fact, our observations suggest that the entire gene is devoid of nucleosomes, because a similar configuration is present at the 3' end of the gene (Fig. 2E and supplemental Fig. S2). This is an expected result, because sgs8 is highly transcribed in third instar salivary glands. Therefore, no significant changes in the levels of H3K9me3 or histone H3 were observed in the euchromatic regions of the sgs8 and Hsp70 genes in third instar salivary glands after UV irradiation. This finding indicates that these chromosomal regions already show an open chromatin structure; following UV damage, this configuration is maintained, which probably allows for viable recognition by the NER machinery.

In Dmp53 mutant flies, the basal levels of H3K9me3 are clearly reduced in both types of heterochromatin (Fig. 2, A-D). These results correlate with the global status of H3K9me3 in the homozygous $Dmp53^{-ns}$ flies (Fig. 1). Intriguingly, in the facultative heterochromatic regions analyzed, the levels of H3K9me3 rose above basal levels after UV irradiation (Fig. 2, C and D). This observation correlates with the global analysis of H3K9me3 levels after UV irradiation in the $Dmp5^{-ns}$ mutant (Fig. 1). However, levels of H3K9me3 remained low at the rover and AL1 sites (Fig. 2, A and B). Taken together, the results of the analysis using signal intensity from confocal microscopy and the ChIP experiments suggest that the increase in the levels of H3K9me3 after UV irradiation in Dmp53 mutant flies occurs preferentially in facultative heterochromatin but not in constitutive heterochromatin. On the other hand, the levels of H3K9me3 are reduced in the Dmp53^{-ns} mutant flies under basal conditions. This result, together with previous reports on acetylated levels of histones affected by a lack of p53 in human and Drosophila cells, indicates broad effects on nucleosome modifications under basal conditions that may contribute to genome instability.

Dmp53 Is Required for the Increase in dKDM4B Levels after UV Irradiation and dKdm4B Mutant Flies Are More Sensitive to UV Irradiation-Recently, histone demethylases of the JmjC family have been identified in different eukaryotes. In particular, the Drosophila ortholog of the hKDM4 demethylase (dKDM4A) was linked to H3K36me3 and H3K36me2 demethylation (29, 30). In the same studies, another hKDM4 ortholog (dKDM4B) was identified as an H3K9me3 and H3K36me3 demethylase in vitro (29, 30). Because we observed a reduction in the levels of H3K9me3 after UV-induced DNA damage, we hypothesized that a demethylase might be activated or overexpressed to remove the methyl group from H3K9. On the other hand, the global levels of H3K9me3 are lower in Dmp53 mutant flies, and a response to UV irradiation was not observed in these flies, suggesting that the mechanisms induced to demethylate H3K9me3 are not fully operational if Dmp53 is not present. We analyzed the mRNA levels of dKDM4B by quantitative RT-PCR before and after UV irradiation at 200 J/m² in both wild type and homozygous Dmp53^{ns} third instar larvae. Interestingly, in wild type flies, the transcript levels of the dKDM4B demethylase are increased ~3-fold after UV irradiation (Fig. 3A). The increase in dKDM4B mRNA levels after UV irradiation was not observed in the homozygous Dmp53 mutant organisms. In contrast, a reduction of dKDM4B mRNA was observed before and after UV irradiation in the mutant flies. Next, we determined the protein levels of dKDM4B in similar samples using a polyclonal antibody against dKDM4B generously donated by Prof. J. Workman. We observed an increase of \sim 2.5-fold in the levels of dKDM4B protein over a period of time between 1:15 and 2:25 h after UV irradiation in wild type flies (Fig. 3B). In the case of $Dmp53^{-ns}/$ $Dmp53^{-ns}$ organisms, this response was not observed (Fig. 3B). Taken together, these results indicate that the transcription of the dKDM4B gene is stimulated in response to DNA damage, suggesting that the increase in dKDM4B demethylase may be linked to the reduction of H3K9me3 levels after UV irradiation. These results also suggest that the induction of dKDM4B after DNA damage requires functional Dmp53.

We next investigated the survival of a *dKdm4B* mutant fly after UV irradiation. We used the P-element insertion within the dKdm4B transcription unit (EP-Kdm4B⁰³⁵³¹; insertion located at nucleotide 359 of the dKdm4B 5'-UTR that disrupts the *dKdm4B* gene (supplemental Fig. S3; flybase). This allele is recessive, homozygous, lethal. Initially, we evaluated the levels of the dKDM4B demethylase in protein extracts from third instar larvae salivary glands of *EP-Kdm*4 B^{03531} /+ flies (Fig. 3*C*) and found a substantial reduction in the levels of dKDM4B protein in these flies cells, indicating that the dKDM4B gene is indeed affected in this mutant. We also observed that the basal levels of the dKDM4B protein are reduced in Dmp53^{-ns}/ $Dmp53^{-ns}$ organisms, compared with wild type flies, in agreement with the transcript measurements (Fig. 3, A and C). Based on these results, we investigated whether heterozygous flies were more sensitive to UV irradiation than wild type individuals. In general, heterozygous flies carrying a mutation in genes involved in NER are more sensitive to UV irradiation than wild type flies (25, 31). Thus, third instar larvae were irradiated at different doses of UV, and the viability of the wild type and



Link between the Histone Demethylase dKDM4B and Dmp53



FIGURE 3. Levels of the *Kdm4B* mRNA and protein in basal conditions after UV irradiation, UV sensitivity of a *Kdm4B* mutant fly, and dKDM4B nuclear localization after DNA damage. *A*, the mRNA levels were quantified by RT-qPCR from three independent experiments (*, p value = 0.002). The conditions and phenotypes are indicated in the figure. *B*, dKDM4B protein levels before and after UV irradiation in wild type and *Dmp53^{-ns}/Dmp53^{-ns}* /*Dmp53^{-ns}* in instar salivary gland cells. Note that there is an increase of ~2.5 times of the dKDM4B protein in wild type cells, but not in the *Dmp53* mutant cells after UV irradiation. *C*, basal dKDM4B protein levels in wild type. *Dmp53^{-ns}/Dmp53^{-ns}*, and *EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹/+ cells. *D*, survival of WT and *Kdm4B* heterozygous mutant (*EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹/+) flies after several UV doses. Calculation of the survival rate is reported under "Experimental Procedures." The phenotypes and the irradiation doses are indicated in the figure. *E*, kinetic removal of CPDs after UV irradiation in wild type and *dKdm4B* mutant organisms. The third instar larvae were irradiated at 200 J/m², and then DNA was purified at different times. A specific anti-CPD antibody was used to determine the presence of CPDs. The amount of loaded DNA in the membrane is shown. *F*, immunolocalization of CPDs (*green*) and dKDM4B (*red*) in nuclei before and after UV irradiation following the smuch protocol (44). The images were captured using a confocal microscope from isolated nuclei prepared from salivary glands either without UV irradiation or after UV irradiation after 2 h of recovery.

*EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹/+ organisms was evaluated by quantification of the survival organisms that develop to adulthood. Fig. 3D shows that the *dKdm4B* heterozygous mutant flies are significantly more sensitive to different doses of UV than wild type flies. In addition, *dKdm4B* mutant flies are not able to efficiently remove CPDs after UV irradiation (Fig. 3*E*). We previously observed that the kinetics of CPD removal in third instar larvae can be detected 4 h after irradiation and occurs faster than in mammalian cells (32). Interestingly, the H3K9me3 demethylated state is maintained in heterochromatin for several hours until the H3K9me3 levels rise again (supplemental Fig. S4). This situation may allow the NER machinery to function in these chromatin sites.

For this reason, we decided to analyze the distribution of the dKDM4B enzyme in the nuclei of third instar salivary glands cells after UV irradiation. Salivary glands were directly irradiated at 100 J/m², and after 2 h of recovery, the tissue was fixed, and the nuclei were isolated by the smuch procedure (see "Experimental Procedures") and inmunostained with an anti-CPD antibody and an anti-dKDM4B antibody to visualize the

presence of CPDs and dKDM4B. Accordingly, we observed an increase in dKDM4B signal intensity in UV-irradiated nuclei (Fig. 3*F*). Interestingly, there is also a colocalization in the nuclear regions of CPDs (Fig. 3*F*), suggesting a recruitment of dKDM4B at damaged chromatin.

To have an insight of the role of Dmp53 in the transcription inductions of the *dKdm4B* gene, we searched for possible Dmp53 response elements (Dp53RE) in the region around the possible *dKdm4B* transcription initiation site based in the flybase gene annotation. The organization of the *dKdm4B* gene is complex because it is possible that it contains several promoter elements (supplemental Fig. S3). Nevertheless, we were able to identify a putative Dp53RE that matches with the p53 response element consensus sequence and has high identity with the Dp53RE present in the *reaper* gene (33). This sequence is just downstream from the transcription initiation site in the first intron after the 5'-UTR exon (Fig. 4A). We performed ChIP experiments to determine whether Dmp53 binds this element in the *dKdm4B* gene before and after UV irradiation of third instar larvae. As a positive control we used the Dp53RE present





FIGURE 4. Dmp53 binds a p53 response element in the dKdm4B gene after UV induced DNA damage. A, localization of a Dmp53 response element (Dmp53RE) in the first intron of the *dKDM4B* gene, near the transcription initiation site. The identified sequence of the Dmp53RE is shown in the figure. The numbers (+263 to +283) indicate the position with the putative transcription initiation site (+1) of the larger dKDM4B transcript reported in the flybase. A p53RE consensus sequence is also indicated. The black arrow indicates the transcription orientation. The Dmp53RE was identified by using the Math-inspector program from Genomatix. B, ChIP experiment to determine the Dmp53 occupancy in the *dKdm4B* gene-Dmp53RE before and after UV irradiation. Third instar larvae were irradiated at 200 J/m², and after 30-60 min of recovery the salivary glands were fixed with formaldehyde and used for ChIP. The position of the primers used for dKdm4B Dmp53RE are indicated as gray arrows in A, and their sequences are listed under "Experimental Procedures." As a positive control we used the reaper Dmp53RE (33), and as a negative control we used the sqs8 promoter used in this work.

in the *reaper* gene (33), and as a negative DNA sequence we used the *sgs8* promoter. Before UV irradiation there is little occupancy of Dmp53 in both the *repear* and the putative *dKdm4B* Dp53REs. However, after UV irradiation there is a significant increase of Dmp53 occupancy in both sequences but not in the negative control, suggesting that after UV-induced DNA damage Dmp53 can bind the Dp53RE present near the *dKdmB* promoter. Taken together, the results presented in this section suggest that dKDM4B is required for efficient DNA repair after UV irradiation in a Dmp53-dependent manner.

H3K9me3 Demethylation after UV-induced DNA Damage Requires dKDM4B—We next asked whether there was a correlation between the decrease of H3K9me3 levels after UV-induced DNA damage and the dKDM4B enzyme. To investigate this question, we irradiated wild type and dKdm4B heterozygous mutant (*EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹/+) third instar larvae with 200 J/m² and evaluated the global levels of H3K9me3 in polytene chromosomes. As expected, the levels of H3K9me3 were reduced in wild type flies after UV irradiation (Fig. 5A). Interestingly, the levels of H3K9me3 levels were higher in the nonirradiated heterozygous dKDM4B mutant flies than in the wild type flies, and these levels increased after UV irradiation, despite the fact that one copy of the wild type allele is present in

Link between the Histone Demethylase dKDM4B and Dmp53

these heterozygous organisms (Fig. 5A). In addition, we performed ChIP experiments to measure the levels of H3K9me3 before and after UV irradiation. Initially, we analyzed the rover and AL1 loci, because a clear reduction of the levels of H3K9me3 was observed after UV-induced DNA damage. In agreement with the global analysis, the reduction of the levels of H3K9me3 at the rover and AL1 loci in response to UV irradiation was not diminished in the dKdm4B heterozygous flies when compared with wild type organisms (Fig. 5, B and C). We next performed similar ChIP assays to investigate the levels of H3K9me3 at the Nipped and Plc21 promoters. Similar to the constitutive heterochromatic regions, we observed that although one *dKdm4B* wild type allele is present in *EP-Kdm*4*B*⁰³⁵³¹/+ flies, no reduction in the levels of H3K9me3 occurs after UV irradiation (Fig. 5, D and E). Based on these results, it is possible that in EP-Kdm4B⁰³⁵³¹/+ organisms, the induction of dKDM4B is affected after UV treatment. On the other hand, preliminary observations also indicate that the levels of Su(var)3-9 transcript are also increased after UV irradiation in the fly,⁵ suggesting that a balance between methylation and demethylation of H3K9me3 may occur after severe UV irradiation. Related to this point, recent reports have shown that chromate exposure, which produces severe DNA damage in human cancer cells, increased global levels of di- and trimethylated H3K9, together with an increase in the levels of G9a histone methyl transferase (34, 35). Nevertheless, the data presented in this section support the hypothesis that the reduction of the levels of H3K9me3 after UV irradiation requires the dKDM4B demethylase.

DISCUSSION

In this study, we found that there is a general reduction in the levels of H3K9me3 in *Drosophila* salivary gland cells chromosomes in response to UV irradiation. Demethylation of H3K9me3 occurs preferentially in heterochromatic regions, because the levels of H3K9me3 are low in euchromatin. This phenomenon requires the presence of a functional Dmp53, which further enhances the expression of the dKDM4B demethylase in response to UV irradiation. This finding suggests that Dmp53 can directly regulate the expression of enzymes that modify histones in response to genotoxic insults.

Dynamics of Histone Modifications in Response to UV-induced DNA Damage—Chromatin modifications are dynamic across the processes of regulation of gene expression and DNA repair. In the case of DNA damage by UV irradiation, previous studies have demonstrated that histone hyperacetylation is required for NER. In particular, levels of H3K9Ac are increased after UV irradiation in yeast, Drosophila, and mammalian cells (10, 11, 35). Additionally, this response to DNA damage is affected in p53 mutant cancer cells, as well as in Dmp53 null mutants in Drosophila (10, 11), indicating a direct role for this tumor suppressor gene in the chromatin modifications involved in NER. In the case of heterochromatic regions enriched for H3K9me3, the demethylation of H3K9me3 may be



⁵ Z. Palomera-Sanchez, A. Bucio-Mendez, V. Valadez-Graham, E. Reynaud, and M. Zurita, unpublished results.



FIGURE 5. **H3K9me3 global and specific levels in the** *dKdm4B* **mutant before and after UV irradiation.** *A*, global H3K9me3 levels in WT and heterozygous *dKdm4B* mutant allele (+/*Ep-Kdm4B*⁰³⁵³¹). H3K9me3 levels were quantified from at least 10 genomes (30 polytene chromosomes) for each phenotype and condition as described under "Experimental Procedures" and "Results." The phenotypes and conditions are indicated in the figure. n = 10, p < 0.05. *B–E*, quantification of the H3K9me3 levels in WT and *EP-Kdm4B*⁰³⁵³¹/+ flies before and after UV irradiation in the rover transposon, the AL1 sequence, the Nipped promoter region, and the Plc2 promoter region. Note that the H3K9me3 levels do not change in rover, AL1, Nipped, and Plc2 after UV irradiation in the *Kdm4B* heterozygous mutant. The graphs show results from independent immunoprecipitation reactions (n = 3). ChIP signals quantified by means of quantitative polymerase chain reaction are presented as mean percentages of input chromatin precipitated at each region; the *error bars* indicate \pm S.D. *Mock* is a ChIP assay from the same salivary glands chromatin using an irrelevant lgG.

required for the increase of H3K9Ac, a hypothesis supported by our results.

Intriguingly, the basal levels of H3K9me3 are reduced in Dmp53 mutants, as indicated by global chromosome confocal analysis and ChIP experiments. A similar situation occurs with basal levels of H3K9Ac in p53 mutant human cells and basal levels of H3K14Ac in Drosophila p53 mutants (10, 11). Together, this information suggests that the regulation of histone modification is altered in p53-deficient cells, even if the lack of p53 in Drosophila and mice permits the survival of the organism. However, homozygous Dmp53^{-ns} organisms have shorter life spans and are more sensitive to UV irradiation than wild type flies. It is also interesting to note that after UV irradiation, global levels of H3K9me3 are increased in the Dmp53^{-ns} flies, although our ChIP results suggest that this increase is only present at the facultative heterochromatic regions. The increase in the level of H3K9me3 may be due to a general response to compact the chromatin in gene-encoding regions when the UV-induced DNA damage response is deficient in the Dmp53 mutant flies. Altogether, these data indicate that the absence of p53 alters the mechanisms that maintain a specific histone modification status under normal conditions and after genotoxic stress. Interestingly, it was recently demonstrated that heterochromatic genome stability requires the maintenance of the levels of methylated H3K9 through the histone methyltransferase Su(var)3-9 (36). Thus, alterations in these modifications caused by the absence of p53 might directly affect chromosomal integrity under basal conditions, generating a condition of chromosomal instability.

It is important to note that after NER, new H3.1 histone is deposited in the regions of chromatin that suffered the DNA damage. This deposition occurs outside of the S phase and acts to restore new nucleosomes at the damaged chromatin (37). Therefore, it is possible that in heterochromatic regions, demethylation of H3K9me3 is the initial step required to allow access of the NER machinery and also for the transient removal of histone H3, as has been proposed in the access-repair-restore model (37–40).

Histone H3K9me3 Demethylation after UV Irradiation Requires dKDM4B and Dmp53—Histone methylation and demethylation are dynamic events that control gene expression during development. Only recently has the status of H3K79 methylation been linked to NER (22). Prior to this work, H3K9 demethylases had only been linked to transcriptional control, not to UV-induced DNA damage. Heterozygous dKdm4B mutant flies are

more sensitive to UV irradiation, do not remove CPDs efficiently, display higher basal levels of H3K9me than wild type flies, and exhibit deficiencies in demethylation of H3K9me3 after UV irradiation. These results suggest that demethylation of H3K9 by dKDM4B plays an important role in NER. It is also possible that other histone modifications may be altered after UV irradiation. Thus, it will be relevant to obtain a complete landscape of the dynamics of the methylated residues of H3 and H4 after DNA damage to test whether the corresponding methyltransferases and demethylases are also involved in NER. ChIPseq experiments are required to answer these questions.

Genotoxic stress activates p53 (among other factors) to trigger the mechanisms of DNA repair in animal cells (41). In particular, p53 modulates the transcription of multiple factors involved in DNA repair, apoptosis, and cell cycle arrest (41). In this work, we found that UV irradiation results in an increase in the mRNA and protein levels of the H3K9me3 demethylase dKDM4B. However, this response is affected in homozygous mutant Dmp53 organisms, suggesting a role for Dmp53 in the enhancement of the expression of dKDM4B after UV irradiation. In addition, a Dmp53 response element is present near the dKdm4B promoter, and Dmp53 binds this sequence after UV irradiation, suggesting a direct role for Dmp53 in dKdm4B gene regulation as a response to genotoxic stress. Indeed, a recent transcriptional analysis of p53-depleted human cells revealed that the expression of the JMJD2B/hKDM4B gene is reduced after drug-induced DNA damage, as compared with nonde-



pleted p53 cells (43). This suggests that JMJD2B/hKDM4B is a putative target of p53, because other genes are involved in NER, such as DDB1 and XPC (42). In addition, it has been reported that overexpression of p53 generates a reduction in levels of H3K9me2 in cultured human cells (41). Our results are compatible with these reports, because dKDM4B may also demethylate H3K9me2, suggesting that demethylation of H3K9me3 following UV irradiation requires the activation of the *dKDM4B* gene through Dmp53. An important point in this study is that our observations were performed in a specific cell tissue (third instar salivary gland), and it will be interesting to investigate whether in other tissues and developmental stages the same response to UV irradiation is also present.

Based on our results in the fly, it will be important to determine whether human cells also show a JMJD2B/hKDM4B-dependent decrease in the level of H3K9me3 after UV-induced DNA damage and to investigate whether p53 is involved in this response. The information obtained from these types of studies will facilitate better understanding of the role of the dynamics of histone methylation in genotoxic stress and cancer.

Acknowledgments—We thank Prof. Jerry Workman and Chia Hui Lin for the anti-dKDM4B antibody and for sharing unpublished information. We also thank Andrés Saralegui for help with the confocal analysis and Ignacio López and Rene Hernandez Vargas for technical support.

REFERENCES

- 1. Suganuma, T., and Workman, J. L. (2008) Cell 135, 604-607
- 2. Kim, T., and Buratowski, S. (2009) Cell 137, 259-272
- 3. Lainé, J. P., and Egly, J. M. (2006) *Trends Genet.* 22, 430-436
- 4. Feuerhahn, S., and Egly, J. M. (2008) Trends Genet. 24, 467-474
- Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A. B., Hoeijmakers, J. H., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugasawa, K. (2009) DNA Repair 8, 767–776
- 6. Sugasawa, K. (2009) DNA Repair 8, 969-972
- Guerrero-Santoro, J., Kapetanaki, M. G., Hsieh, C. L., Gorbachinsky, I., Levine, A. S., and Rapić-Otrin, V. (2008) *Cancer Res.* 68, 5014–5022
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H. Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006) *Mol. Cell* 22, 383–394
- 9. Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003) EMBO J. 22, 975-986
- 10. Allison, S. J., and Milner, J. (2003) Cancer Res. 63, 6674-6679
- Rebollar, E., Valadez-Graham, V., Vázquez, M., Reynaud, E., and Zurita, M. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 642–648
- 12. Sims, R. J., 3rd, and Reinberg, D. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 815-820
- 13. Probst, A. V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009) Nat. Rev. Mol. Cell

Biol. 10, 192–206

- 14. Shukla, A., Chaurasia, P., and Bhaumik, S. R. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1419–1433
- Li, F., Huarte, M., Zaratiegui, M., Vaughn, M. W., Shi, Y., Martienssen, R., and Cande, W. Z. (2008) *Cell* **135**, 272–283
- 16. Nicholson, T. B., and Chen, T. (2009) Epigenetics 4, 129-132
- 17. Klose, R. J., Kallin, E. M., and Zhang, Y. (2006) Nat. Rev. Genet. 7, 715–727
- 18. Klose, R. J., and Zhang, Y. (2007) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 307–318
- Horton, J. R., Upadhyay, A. K., Qi, H. H., Zhang, X., Shi, Y., and Cheng, X. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 38–43
- Bostelman, L. J., Keller, A. M., Albrecht, A. M., Arat, A., and Thompson, J. S. (2007) DNA Repair 6, 383–395
- 21. Nag, R., and Smerdon, M. J. (2009) Mutat. Res. 682, 13-20
- 22. Chaudhuri, S., Wyrick, J. J., and Smerdon, M. J. (2009) *Nucleic Acids Res.* **37,** 1690–1700
- 23. Sogame, N., Kim, M., and Abrams, J. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4696–4701
- 24. Castro, J., Merino, C., and Zurita, M. (2002) DNA Repair 1, 359-368
- Merino, C., Reynaud, E., Vázquez, M., and Zurita, M. (2002) *Mol. Biol. Cell* 13, 3246–3256
- Reynaud, E., Lomelí, H., Vázquez, M., and Zurita, M. (1999) *Mol. Biol. Cell* 10, 1191–1203
- 27. Tjeertes, J. V., Miller, K. M., and Jackson, S. P. (2009) *EMBO J.* 28, 1878–1889
- 28. Petesch, S. J., and Lis, J. T. (2008) Cell 134, 74 84
- Lin, C. H., Li, B., Swanson, S., Zhang, Y., Florens, L., Washburn, M. P., Abmayr, S. M., and Workman, J. L. (2008) *Mol. Cell* 32, 696–706
- Lloret-Llinares, M., Carré, C., Vaquero, A., de Olano, N., and Azorín, F. (2008) Nucleic Acids Res. 36, 2852–2863
- Fregoso, M., Lainé, J. P., Aguilar-Fuentes, J., Mocquet, V., Reynaud, E., Coin, F., Egly, J. M., and Zurita, M. (2007) *Mol. Cell. Biol.* 27, 3640–3650
- Aguilar-Fuentes, J., Fregoso, M., Herrera, M., Reynaud, E., Braun, C., Egly, J. M., and Zurita, M. (2008) *PLoS. Genet.* 4, e1000253
- Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M., and Abrams, J. M. (2000) *Cell* **101**, 103–113
- Sun, H., Zhou, X., Chen, H., Li, Q., and Costa, M. (2009) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237, 258–266
- 35. Teng, Y., Yu, Y., and Waters, R. J. (2002) J. Mol. Biol. 316, 489-499
- 36. Peng, J. C., and Karpen, G. H. (2009) PLoS Genet. 5, e1000435
- 37. Polo, S. E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006) Cell 127, 481-493
- 38. Smerdon, M. J. (1983) Biochemistry 22, 3516-3525
- 39. Green, C. M., and Almouzni, G. (2003) *EMBO J.* **22**, 5163–5174
- 40. Kruse, J. P., and Gu, W. (2009) Cell 137, 609-622
- 41. Warnock, L. J., Adamson, R., Lynch, C. J., and Milner, J. (2008) *Oncogene* **27**, 1639–1644
- 42. Adimoolam, S., and Ford, J. M. (2003) DNA Repair 2, 947–954
- 43. Adamsen, B. L., Kravik, K. L., Clausen, O. P., and De Angelis, P. M. (2007) *Int. J. Oncol.* **31**, 1491–1500
- Wang, Y., Zhang, W., Jin, Y., Johansen, J., and Johansen, K. M. (2001) Cell 105, 433–443





Contents lists available at ScienceDirect

DNA Repair



journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair

Mini Review

Open, repair and close again: Chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage

Zoraya Palomera-Sanchez, Mario Zurita*

Department of Developmental Genetics, Instituo de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av Universidad 2001, Cuernavaca Morelos 22250, Mexico

A R T I C L E I N F O

Article history: Received 27 October 2010 Accepted 27 October 2010 Available online 3 December 2010

Keywords: NER Chromatin-remodeling Nucleosomes p53 Histone-modifications

ABSTRACT

Due to its link with human pathologies, including cancer, the mechanism of Nucleotide Excision Repair (NER) has been extensively studied. Most of the pathway and players have been defined using in vitro reconstitution experiments. However, in vivo, the NER machinery must deal with the presence of organized chromatin, which in some regions, such as heterochromatin, is highly condensed but still susceptible to DNA damage. A series of events involving different chromatin-remodeling factors and histone-modifying enzymes target chromatin regions that contain DNA lesions. CPDs change the structure of the nucleosome, allowing access to factors that can recognize the lesion. Next, DDB1-DDB2 protein complexes, which mono-ubiquitinate histones H2A, H3, and H4, recognize nucleosomes containing DNA lesions. The ubiquitinated nucleosome facilitates the recruitment of ATP-dependent chromatinremodeling factors and the XPC-HR23B-Centrin 2 complex to the target region. Different ATP-dependent chromatin-remodeling factors, such as SWI/SNF and INO80, have been identified as having roles in the UV irradiation response prior to the action of the NER machinery. Subsequently, remodeling of the nucleosome allows enzymatic reactions by histone-modifying factors that may acetylate, methylate or demethylate specific histone residues. Intriguingly, some of these histone modifications are dependent on p53. These histone modifications and the remodeling of the nucleosome allow the entrance of TFIIH, XPC and other NER factors that remove the damaged strand; then, gap-filling DNA synthesis and ligation reactions are carried out after excision of the oligonucleotide with the lesion. Finally, after DNA repair, the initial chromatin structure has to be reestablished. Therefore, factors that modulate chromatin dynamics contribute to the NER mechanism, and they are significant in the future design of treatments for human pathologies related to genome instability and the appearance of drug-resistant tumors. © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

The DNA of eukaryotic organisms is organized in a complex and dynamic structure called chromatin. The fundamental unit of chromatin is the nucleosome, which consists of 147 bp of DNA wrapped

* Corresponding author. Tel.: +52 555 6227659; fax: +52 777 3172388. *E-mail address*: marioz@ibt.unam.mx (M. Zurita). around a histone octamer, which contains two copies of each of histones H2A, H2B, H3 and H4 [1]. Histone H1 binds the linker DNA between each nucleosome and allows the formation of a higher level of organization [2]. The DNA–nucleosome polymer must be flexible in order to permit the various nuclear processes of transcription, replication, recombination and repair. Three mechanisms are involved in this flexibility: histone modifications, chromatin remodeling and the incorporation of histone variants [3]. Eukary-

^{1568-7864/\$ –} see front matter 0 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.dnarep.2010.10.010

Table 1

Different factors that are involved in chromatin dynamics that participate in NER.

Factors that participate in the access in chromatin of the NER machinery DDB1-DDB2-CUL4A/B-RBX1 Recognize-ubiquitinate Mono-ubiquitinates histone H2A at the [19-sites of UV lesions. DDB1-DDB2-CUL4A/B-RBX1 Recognize-ubiquitinate Mono-ubiquitinates histone H2A at the [19-sites of UV lesions. Ibiquitinates histones H3 and H4 at the [19-sites of UV-damaged site in the chromatin. SW1/SNF ATP remodeling complexes Estimulates the renoval of 6-4PPs and [Interacts with XPC-HR23B.] [14.sites of L4A]	-21] ,22-24,32]]
DDB1-DDB2-CUL4A/B-RBX1 Recognize-ubiquitinate complex Mono-ubiquitinates histone H2A at the sites of UV lesions. [19- SW1/SNF ATP remodeling complexes UV-damaged site in the chromatin. Estimulates histone H3 and [4 at the UV-damaged site in the chromatin. [14-	–21] ,22–24,32]
complex sites of UV lesions. Ubiquitinates histones H3 and H4 at the UV-damaged site in the chromatin. SW1/SNF ATP remodeling complexes Estimulates the renoval of 6–4PPs and Interacts with XPC-HR23B. [14.]	,22-24,32]
Ubiquitinates histones H3 and H4 at the UV-damaged site in the chromatin. SW1/SNF ATP remodeling complexes Estimulates the renoval of 6–4PPs and Interacts with XPC-HR23B. [14.]	,22–24,32 <u>)</u>]
UV-damaged site in the chromatin. SW1/SNF ATP remodeling complexes Estimulates the renoval of 6–4PPs and Interacts with XPC-HR23B. [14.]	,22-24,32]]
SW1/SNF AIP remodeling complexes Estimulates the renoval of 6–4PPs and Interacts with XPC-HR23B. 114.]
CPDs]
Mediates UV-dependent histone H3 hyperacetylation.]
INO80ATP remodeling complexesPromotes the removal of UV lesions (CPDs, 6-4PPs) by NER in not transcribed regions.[25]	
Gcn5 Histone acetyl transferase Favours the removal of CPDs. In human Interacts with UV-DDB1-DDB2 [29, cells is recruited by E2F1 at the sites of components.	,31,34]
CBP/p300 Histone acetyl transferase Functions in global genomic repair. It is Associates with DDB1–DDB2 [33, recruitmented to the sites of NER by p53. complex, p53 and ING2. Increases the basal acetylation levels of H3K9 and H3K14 after UV irradiation.	,41,45]
KDM4B Demethylase of trimethylated histone Decreases of the H3K9me3 levels in heterochromatin regions, after UV damage. It is recruitmented to the sites of NER. Favors the removal of CPDs. This process is dependent of p53. [52]]
H3K79me Required for efficient nucleotide excision [53] repair. Might be essential in the correct open-chromatin to repair the UV-DNA damage	1
Other chromatin factors that participate in NER	
HP1 Heterochromatin protein 1 Recruites to UV-induced DNA damage. This Recognizes [55] response is independent of H3K9me3 and proteins that detect UV damage]
p38 MAPK serine/threonine Required for the prompt repair of CPDs by [56] protein kinases a increase of histone acetylation (11/2/14/ac) and shoremetical]
p53 Tumor suppressor Maintains the basal levels of: H3K9Ac, Associates with p300. [41- H3K14Ac, H3K9me3, H3S10p. Evyours the increase of H3K9Ac post-LIV	-43,52]
after UV. Required to increase the dKDM4B levels	
INGs Tumor suppressor Facilitates DNA access to XPA by increasing Associates with p300. [44- the histone acetylation in a p53-dependent manner.	-46]
Factors that participate in the restoration of chromatin structure after NER	
CAF-1 Histone chaperone Incorporates H3.1 postrepair stage at the repaired sites as a memory of the damage event. [57]]
? H2A ubiquitylation Occurs after the incision of the damage Suggests association with [59] strand and dependents on functional NER. CAF-1]

otic organisms can therefore protect their genetic information while their nuclear mechanisms continue to function. However, various genotoxic agents that compromise the integrity of the genome (such as UV irradiation) constantly damage DNA. Therefore, eukaryotic cells have evolved mechanisms to repair DNA in the complex context of chromatin. In this mini-review, we focus on the histone modifications and the chromatin remodeling that may take place after DNA damage by UV irradiation and seem to be necessary for the proper repair of UV-induced DNA lesions (Table 1).

1. UV-induced DNA lesions and repair

As an initial approach to discussing the role of histone modifications and chromatin remodeling in UV-induced DNA damage, we briefly describe what is known, mostly from *in vitro* experiments, about the nucleotide excision repair (NER) mechanism. Excellent reviews about this subject are available from the DNA repair community [4–6].

The two major classes of mutagenic DNA lesion induced by UV irradiation are Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs) and Pyrimi-

dine (6-4) Pyrimidone photoproducts (6-4PPs). These UV-induced photolesions are repaired primarily by NER. In eukaryotic cells, NER can be divided into two pathways: global genomic repair (GGR), which repairs lesions throughout the genome, and transcriptioncoupled repair (TCR), which repairs lesions in the transcribed strand of active genes [4]. In vitro experiments have determined that adducts formed by UV irradiation are initially recognized by the XPC-HR23B-centrin-2 complex and/or by the DDB1-DDB2 heterodimer complex (DNA damage binding protein 1 and 2 complex). However, whether these two complexes act simultaneously and whether they are always involved in damage recognition has not been revealed. Next, the DNA duplex is unwound by the transcription/DNA repair factor TFIIH in a reaction that requires the helicase activity of the XPD subunit and the ATPase activity of the XPB subunits [5,6]. The resulting single strands of DNA are then stabilized by XPA and RPA, and the ends of the resulting DNA bubble are recognized by XPG and ERCC1-XPF, which generate 3' and 5' incisions, respectively, on the damaged strand [7,8]. Finally, DNA polymerases δ and ε fill the gap in the presence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and DNA ligases I and III seal the nick

[9,10]. In the case of TCR, the adduct is recognized by a stalled RNA pol II, and then the same steps as in GGR take place to remove the damaged strand [4–10].

However, *in vivo*, the NER machinery must recognize DNA damage within the context of chromatin. CPDs comprise 70–80% of the DNA damage produced in nucleosomal DNA, and they induce a bend or kink of 7–9° in the DNA helix [11,12]. On the other hand, 6–4PPs comprise 20–30% of DNA damage; in general, they are produced in the DNA linker and induce a bend of 44° in the DNA helix [11,12]. Additionally, it is known that CPDs are repaired more slowly than 6–4PPs; this may be because most CPDs are located in nucleosomal DNA [13]. This suggests that in the case of CPDs, it is necessary to relax the nucleosome to repair the DNA, whereas most of the 6–4PPs (located in the linker region) are more accessible for repair. However, it is also possible that 6–4PPs are recognized faster because the DNA helix is bent, and the NER proteins that recognize the damage identify this type of lesion first [11–13].

2. Access in the context of chromatin

It has been shown that chromatin structure has an inhibitory effect on the repair of both CPDs and 6–4PPs [14]. Therefore, a basic question arises: how do the NER proteins recognize pyrimidine dimers within the context of chromatin? Recent elegant experiments 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 equilibrium of dynamic unwrapping-rewrapping fluctuations switches toward the unwrapped state [15]. These *in vitro* experiments suggest that the distortion of nucleosome structure, eventually permitting access to the NER machinery. However, it is important to recognize that *in vivo*, in the context of all the chromatin factors, recognition may be more complicated.

Although CPDs are repaired more slowly than 6-4PPs, it is known that CPDs are repaired more rapidly in transcriptionally active genes than in inactive regions of the genome [16]. The greater efficiency of TCR over GGR is likely due to the faster recognition of DNA damage by stalled RNA polymerases and to the relaxed chromatin present in transcribed DNA. On the other hand, in non-transcribed regions, the initial step of damage recognition is by XPC-HR23B-centrin 2, which recognizes 6-4PPs but not CPDs [17]. As mentioned before, this is likely due to the fact that 6-4PPs preferentially occur in the linker DNA between nucleosomes. Interestingly, it has been shown that in vivo, the XPC-HR23B-centrin complex requires DDB2 to recognize CPDs [18]. Indeed, the DDB1-DDB2-CULLIN4(A or B)-RBX1 complex (for simplicity referred to here as the DDB1-DDB2 complex) recognizes UV damage in chromatin and can mono-ubiquitinate histone H2A at the sites of UV lesions [19]. Before UV irradiation, the DDB1-DDB2 complex interacts with the negative regulator of cullin-based-ubiquitin ligases CSN, which dissociates from the complex when it binds DNA. In addition to H2A ubiquitination, it has also been reported that the DDB1-DDB2 complex ubiquitinates histones H3 and H4 at sites of UV damage in chromatin [20]. Together, these modifications of H3 and H4 weaken the interaction between histones and DNA, facilitating the action of the NER machinery. In addition, the DDB1-DDB2 complex also ubiquitinates DDB2 and XPC; around damage sites, XPC and the Ku heterodimer (Ku86-Ku70) further regulate this activity in an opposing manner. Ku restrains the ubiquitination of DDB2 and consequently prevents the dissociation of DDB2 from damage sites in chromatin. When XPC, DDB2 and the core histones are ubiquitinated, DDB2 dissociates from the complex and therefore the

damage site. Importantly, this departure facilitates the recruitment of other NER factors to lesions [21]. On the other hand, ubiquitinated XPC shows an enhanced affinity for DNA lesions [21]. Based on this model, a sequential set of reactions from recognition to repair can be proposed, and this will be discussed shortly. Interestingly, Cockeyneis Syndrome A (CSA) protein has been identified in a complex with DDB2, suggesting that TCR may also require histone ubiquitination.

Additionally, it has been reported that the SWI/SNF chromatinremodeling complex stimulates the removal of 6-4PPs, but not CPDs, from nucleosomal DNA, suggesting that the mechanism that provides access for the NER machinery depends on the type of DNA lesion [22]. It has been reported that the Rad4-Rad23 heterodimer in yeast (a homolog of human XPC-HR23B) interacts with the SWI/SNF complex and that this interaction is stimulated by UV irradiation. Moreover, SWI/SNF inactivation leads to slower removal of CPDs from the silent HML locus in yeast [23]. On the other hand, the elimination of Brg1, the ATPase subunit of SWI/SNF, negatively affects the elimination of CPDs in human cells. Interestingly, the incorporation of DDB2 and XPC is not affected; however, the recruitment of downstream NER factors, such as XPG and PCNA, is impaired [24]. Interestingly, Brg 1 interacts with XPC and is recruited to sites of UV damage by XPC and DDB2 [24]. Although these two results seem to be contradictory regarding the role of the SWI/SNF complex in the removal of CPDs versus 6–4PPs [22–24], it seems that when CPDs are recognized, the next step is to relax the chromatin to allow DNA repair. All of this evidence may explain the low rate of repair of CPDs compared to 6-4PPs.

Expanding the role of chromatin-remodeling complexes in NER, a recent report shows that the INO80 chromatin-remodeling complex also promotes the removal of UV lesions by NER in non-transcribed regions [25]. Depletion of the IN80 subunits INO80 and ARP5 reduces the removal of CPDs and 6–4PPs and abolishes the recruitment of NER factors to damaged areas [25]. On the other hand, it has been shown that during development of the nematode *Caenorhabditis elegans*, different chromatin remodeling factors are implicated in the response to UV damage in different developmental stages [26], suggesting that the response to UV irradiation is versatile and uses different chromatin remodeling factors depending on the cell type. Therefore, ATP-dependent chromatin remodeling complexes like SWI/SNF and INO80 are required for efficient NER, although whether the two complexes act simultaneously or independently is not known.

From recent evidence, it is clear that GGR requires different mechanisms to relax chromatin and thus remove CPDs. In addition to chromatin remodelers, histone modifications have been implicated in various mechanisms of DNA repair. Initial experiments in yeast and human cells demonstrated a functional correlation between increased histone acetylation and efficient NER [27,28]. Interestingly, a reduction in the removal of UV-CPDs occurs when the histone acetyltransferase (HAT) GCN5 is depleted in yeast [29]. Moreover, the acetylation of lysine 9 (K9) and lysine 14 (K14) of histone H3 increases after UV irradiation in yeast cells [30]. Interestingly, a recent report shows that E2F1 transcriptional factor in human cells is recruited in the chromatin at sites of induced UVdamage and associates with GCN5 to acetylate H3K9 [31]. It has also been shown that histone hyperacetylation occurs prior to NER in yeast because histone H3 is still hyperacetylated after UV damage in rad4 or rad14 mutant strains, which are deficient in proteins that are essential for the recognition step of NER [30]. On the other hand, Rad16, which shares marked homology with Snf2 (the catalytic subunit of the SWI/SNF complex), mediates UV-dependent histone H3 hyperacetylation [32]. It has also been speculated that the ATPase activity of Rad16 generates superhelical torsion in DNA that has an altered chromatin structure due to UV irradiation. These changes, which are mediated by chromatin-remodeling complexes, might facilitate histone acetylation by certain HATs, facilitating the access of the NER machinery to chromatin [31]. Furthermore, the DDB1-DDB2 complex associates with CBP/p300 family proteins in vitro and in vivo, suggesting that one of the functions of DDB1-DDB2 in global genomic repair is the recruitment of histone acetyl-transferases to damage sites [33]. Indeed, DDB1-DDB2 components interact in vitro and in vivo with human STAGA, a histone acetyltransferase complex; this interaction might target the acetylase activity of GCN5L to damaged chromatin to facilitate NER [34]. Taken together, these reports established the hypothesis that histone acetylation plays an essential role in the opening of chromatin to provide access for the NER machinery. Moreover, it has been reported that in yeast, the acetylation of histones H3 and H4 in response to UV irradiation is less efficient in subtelomeric heterochromatin, and it is dependent on the histone deacetylase Sir2 [35]. This result suggests that the action of the different mechanisms that modify histones to allow NER may depend on the type of chromatin structure and the prevalence of specific factors like Sir2 in subtelomeric heterochromatin.

Although phosphorylation of the variant histone H2AX in response to DNA damage has been studied in relation to the repair of double-strand breaks (DSB), it is also known that H2AX is phosphorylated after UV irradiation [36]. In addition it has been observed that components of the DNA Damage Response (DDR) factors like p-ATM, p-NBS1, Rad51 and FANCD2 co-localize at the CPDs sites after UV irradiation [37]. However, it is important to take into account the fact that excessive DNA damage by UV can also induce double strand breaks (DSBs), and in many reported experiments, the UV dose used is very high. In conclusion, nucleosome remodeling and histone modifications are essential for the correct relaxation of chromatin after UV irradiation to allow the recruitment of the NER machinery to sites of DNA damage.

3. p53 and histone modifications after UV irradiation

When DNA damage occurs in a eukaryotic cell, a series of mechanisms that arrest the cell cycle and induce mechanisms of DNA repair are synchronously activated [38]. A key component that modulates the response to DNA damage from both ionizing radiation and UV irradiation is p53 [39,40]. In recent years, several reports have demonstrated a direct link between p53 and the modulation of histone modifications in response to UV-induced DNA damage. For instance, it has been reported that after UV irradiation, human cells display global chromatin relaxation that is p53-dependent [41]. In that study, it was observed that an increase in histone H3 acetylation is due to the recruitment of p300 (HAT) to NER sites by p53 [41]. In cultured human cells, UV increases the basal acetylation levels of H3K9 and H3K14 [41]. However, in human cancer cell lines with mutations that affect the p53 gene, both basal levels of H3K9 acetylation and their increase are affected, together with a general decrease in histone acetylation [41,42]. A similar situation has been identified in Drosophila. In flies with mutations in the p53 homolog Dmp53, the increase in H3K9 acetylation after UV irradiation is dramatically affected [43]. Thus, in both human and Drosophila cells, p53 has a direct influence on histone acetylation in response to UV irradiation. In addition to their defects in histone acetylation, human p53-deficient cells also show perturbed histone H3-serine-10 phosphorylation patterns before and after UV irradiation [42]. Another family of tumor-suppressor proteins called INGs (inhibitors of growth), participates in NER. INGs are involved in the regulation of chromatin status during transcription, and ING1 and ING2 participate in the repair of UVinduced DNA lesions in a p53-dependent manner [44,45]. ING1b is not recruited to sites of UV damage, but it facilitates XPA's access to DNA by increasing histone acetylation [46]. After UV irradiation, ING2 associates with p300, suggesting that ING2 modulates p53-dependent chromatin remodeling in NER [44–46].

If an increase in histone acetylation is necessary to open chromatin in response to UV-induced DNA damage, then a reduction in histone methylation must occur, at least for the residues in histone tails that are targets of both methylation and acetylation. In recent years, the jumonji family of histone demethylases has been described [47]. This family of proteins can remove the methyl group from all three stages of methylated lysines using Fe (II) and α -ketoglutarate as cofactors [48,49]. KDM4B is a member of this family and is capable of reversing lysine trimethylation of H3K9me3 at pericentric heterochromatin in mammalian cells [49]. A putative ortholog of human KDM4B demethylase, dKDM4B, was recently discovered in the fly [50,51]. Interestingly, in heterochromatic regions in Drosophila cells, there is a decrease in H3K9me3 levels in response to UV-induced DNA damage that is dependent on dKDM4B [52]. This process is dependent on the fly p53 homolog because after UV irradiation, dKDM4B levels rise in a p53-dependent manner, and flies deficient in dKDM4B do not remove CPDs efficiently [52]. Because H3K9me3 is a hallmark of heterochromatin and H3K9 acetylation increases after UV irradiation, then it seems that a histone demethylase would be required to reverse the trimethylation of K9 at heterochromatic damage sites. Taken together, these results establish the hypothesis that crosstalk between histone modifications might be involved in NER. When DNA is damaged by UV, a histone demethylase might first be recruited to reverse the trimethylation and permit an increase of histone acetylation by HATs.

Moreover, it has been recently reported that other histone methylations participate in NER. Histone H3K79 methylation, which is related to chromatin accessibility, is required for efficient NER in a silenced locus of yeast. For instance, yeast H3K79 mutants show a less flexible chromatin structure at the silent HML region, and there is enhanced recruitment of Sir proteins to this locus. Additionally, this yeast mutant shows decreased expression of Rad16 [53]. As mentioned previously, Rad16 is a catalytic subunit of the SWI/SNF remodeling complex that mediates UV-induced acetylation of histone H3 in yeast [32]. The methylation of H3K79 after UV irradiation might therefore also be essential to the correct opening of chromatin to repair DNA damage. In conclusion, histone modifications are essential for correct chromatin relaxation after UV irradiation, thereby allowing recruitment of the NER machinery to damage sites. In animal cells, p53 may be a modulator of some of these chromatin modifications.

4. Other chromatin factors involved in NER

In addition to remodeling complexes and histone modifications, other chromatin proteins connected with various histone modifications play important roles in DNA repair after UV irradiation. For example, Heterochromatin protein 1 (HP1) is preferentially found in heterochromatic regions and recognizes H3K9me3 through its chromodomain [54]. Interestingly, HP1 isoforms alpha, beta and gamma are recruited to UV-induced DNA damage in human cells. This response requires the chromoshadow domain of HP1 and is independent of H3K9 trimethylation and proteins that detect UV damage [55]. The loss of HP1 results in high sensitivity to UV light in C. elegans [55]. Moreover, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), a serine/threonine protein kinase that plays a role in cellular responses to external stress signals (e.g., UV irradiation), is required for the prompt repair of CPDs because it increases histone acetylation (H3K14Ac) and chromatin relaxation. Additionally, p38 MAPK regulates UV-induced DDB2 ubiquitylation and degradation via phosphorylation. As mentioned before, subsequent degradation of DDB2 involves the recruitment of XPC and TFIIH to UV-induced sites of DNA damage [56]. The molecular mechanisms that detect and repair DNA at the chromatin level are diverse and differentially require multiple factors that may depend on the chromatin region.

5. Restoration of chromatin structure after repair

Once UV-damaged DNA is repaired, further steps are necessary to restore the pre-existing chromatin structure. Some changes are involved in the restoration of chromatin after DNA repair by NER. For instance, new H3.1 histones are incorporated in vivo at repaired sites. This incorporation of new H3.1 into new nucleosomes occurs outside of S phase [57]. This histone deposition is dependent on NER, indicating that it occurs post-repair. The chaperone Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1) is directly involved in this histone deposition process in vivo. The incorporation of H3.1 variants into a defined chromatin region can also be viewed as an imprint for newly repaired chromatin, as a memory marker of the damage event [57]. These elegant results show that at sites of DNA damage, new histones are incorporated that do not contain the modifications present in the histones before DNA damage. Thus, a mechanism must exist that reincorporates the initial histone modifications after NER. This is of particular importance in heterochromatic regions. Recent studies on the formation and maintenance of heterochromatin during the cell cycle have shown that the RNAi machinery participates in this process [58]. This mechanism involves transcription of the heterochromatic zones during S phase of the cell cycle [58]. During DNA replication, heterochromatic regions are relaxed to allow transcription; then, the RITS complex is recruited via complementary siRNA and by recognition of tri-methylated H3K9 in the surrounding nucleosomes. This allows the recruitment of histone methyl transferases that tri-methylate H3K9 of the newly incorporated histones [58]. The mechanism of NER also requires DNA synthesis after the removal of the damaged strand. Thus, it will be interesting to determine whether the RNAi machinery also participates in the restoration of heterochromatin after NER.

In addition, the monoubiquitination of histone H2A also occurs after incision of the damaged strand; this is dependent on functional NER [59]. Moreover, the formation of UV-induced ubiguitinated histone H2A (uH2A) foci in cells lacking XPC, DDB2, CSA or CSB, but not in cells lacking XPA, XPG or XPF, indicates that uH2A incorporation is dependent on successful damage repair occurring via either the GGR or TCR sub-pathway [59]. The ubiquitin ligase Ring2 is required for this DNA damage-induced H2A ubiquitination. UV-induced ubiquitination of H2A is also dependent on the DNA damage-signaling kinase ATR (ATM- and Rad3-related). Additionally, knockdown of CAF-1 abolished the formation of uH2A foci. Thus, these data suggest that successful NER and prompt CAF-1-mediated chromatin restoration are involved in uH2A incorporation at sites of damage repair within chromatin [59]. This post-NER ubiquitination of histone H2A seems to occur by a mechanism different from that used by the DDB1-DDB2 complex. It will be informative to develop an experimental protocol that clearly differentiates between the pre- and post-NER ubiquitination of H2A. Nevertheless, these results, together with the role of the DDB1-DDB2 complex in the relaxation of chromatin, suggest that histone ubiquitination is required to facilitate the action of NER and to restore the initial chromatin structure of the damaged region. Another important point in the case of heterochromatic regions is that after the incorporation of new H3.1 histones, the specific histone marks for this type of chromatin must be reestablished, indicating that the restoration processes are dynamic and likely involve the participation of multiple factors, such as histone methyltransferases.

6. A sequential mechanism to modulate chromatin structure in response to UV-induced DNA damage?

All of the studies discussed in this review suggest that synchronous and coordinated events that modulate chromatin structure around the damaged DNA sequence are activated in the initial steps of recognizing and repairing UV-induced DNA damage. Based on this information, a series of events that detect damage and allow NER to occur in the context of chromatin can be proposed (Fig. 1), in which the initial event is the detection of DNA distortions caused by CPDs or 6-4PPs. CPDs tend to unwrap nucleosomal DNA; then, the adduct can be recognized by the DDB1-DDB2 complex. The DDB1-DDB2 complex mono-ubiquitinates histones H2A, H3 and H4, which modifies the structure of the nucleosome to allow the recruitment of chromatinremodeling complexes. Then, histone modification factors, such as histone acetyltransferases, histone lysine demethylases (which demethylate H3K9me3), and histone methyltransferases (which methylate H3K79), are required. These modifications stabilize the damaged DNA region to facilitate the interaction between XPC-HR23B and the lesion, and then NER occurs by the standard mechanism observed in in vitro experiments. This model involves a series of factors that relax the chromatin structure to initiate NER (Fig. 1). However, because several of these factors physically interact (Table 1), it is also possible that they function simultaneously and form a large "repairosome" complex. In addition, other undiscovered modifications, in particular those of histone amino acid residues, may also participate in NER.

7. Perspectives on the role of histone modifications in response to UV irradiation and NER.

In recent years, the study of chromatin dynamics has focused on various chromosomal functions, including DNA damage and repair. Although great advances have been made regarding the role of chromatin in NER, many questions remain to be investigated. For instance, analyses of histone modifications that occur in response to UV-induced damage and during the process of NER have focused only on specific histone tail residues and modifications. Many other modifications may have roles in this process. For example, there is evidence that H4K20 methylation (H4K20me) may have a role during NER [60], but more detailed studies must be performed to verify the response of H4K20me levels to UV irradiation. Moreover, some of these studies have been performed in human cultured cells and yeast, and others have been performed in Drosophila. Therefore, it will be important to determine the universality of these processes in different model systems. In addition, global genomic analyses should be performed to map the responses of histone modifications in all the chromosomes at the same time. This type of approach will provide a global view of the process, and several modifications will be able to be studied at the same time in the same experiment. In addition, the influence of factors that modulate the response to DNA damage, such as p53, still needs to be studied in different cellular systems, as does the activity of genes that may affect histone modifications and nucleosome remodeling. Recent experiments using site-specific UV laser micro-irradiation have found that members of the Polycomb and NurD complexes, which are involved in transcriptional repression, are recruited to damage sites [61]. This recruitment requires the activity of poly (ADP ribose) polymerases 1 and 2 (PARP1, 2), and it suggests that transcriptional repression is required for proper DNA repair. This is an intriguing point because preliminary results of our group show that heterochromatin that is transcribed to maintain its configuration is repressed during NER, and it is possible that the factors that repress transcription are also recruited to UV-induced DNA damage sites. Future experiments



Fig. 1. Sequential model for the recognition, repair and chromatin restore after UV irradiation DNA damage. (1) Once the DNA is damaged by UV irradiation, CPDs and 6–4PP are generated in heterochromatin regions. CPDs generate an unwrapping of the nucleosomal DNA. (2) This distortion is recognized by DDB1–DDB2 complex, that monoubiquitinates histones H2A, H3 and H4. DDB1–DDB2 also allows the incorporation of the XPC-HR23B-Centrin 2 complex and XPC and DDB2 are also ubiquitinated. These reactions permit the release of ubiquitinated DDB2 and stabilize the interaction between XPC and the DNA. (3) Then chromatin-remodeling complexes like SWI/SNF and/or INO80 recognize the nucleosomes around the damaged chromatin Histone modification complexes that include Histone Acetyl Transferases, Histone methyl transferases and demethylases are also recruited in the damaged area at this stage. (4) The coordinated action of these factors, relax the chromatin around the site of damage and may produce the ejection of some nucleosomes. (5 and 6) The XPC-HR23B-Centrin 2 complex is recognized by the rest of the NER machinery to remove the strand that contain the damage and initiate the standard NER mechanism. (7) Once the DNA is repaired, new H3.1 histones are incorporated by CAF-1, probably establishing a memory in the chromatin of the damage event. Finally, this heterochromatin regions have to be reestablished, by restored dynamic process and probably with the participation of multiple factors, like HMTs Su(var)3–9 and other unknown mechanisms.

should be performed to determine whether PARP enzymes and Pc complexes also participate in NER. Eventually, *in vitro* reconstitution experiments including defined chromatin-remodeling and histone-modifying factors, the NER machinery, and nucleosomes containing CDPs and/or 6–4PPs as substrates must be performed. In conclusion, as with other nuclear functions, changes in histone modification patterns in conjunction with chromatin remodelers have important roles in the response to UV-induced DNA damage and in the mechanism of NER. These modifications facilitate the actions of the various factors that participate in both the repair process and chromatin reconstitution. The dramatic advances in this field may make important contributions to our understanding of not only drug-resistant tumors but also the multiple human pathologies, including cancer, that are related to genome stability.

Conflict of interest

None

Acknowledgements

MZ is supported by the PAPIIT-UNAM and IXTLI-UNAM programs.

References

- T.H. Eickbush, E.N. Moudrianakis, The histone core complex: an octamer assembled by two sets of proteinprotein interactions, Biochemistry 17 (1978) 4955–4964.
- [2] N. Happel, I.D. Doenecke, Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function, Gene 431 (2009) 1–12.
- [3] A. Vaquero, A. Loyola, D. Reinberg, The constantly changing face of chromatin, Sci. Aging Knowledge Environ. 14 (1995) RE4.
- [4] P.C. Hanawalt, Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation, Oncogene 21 (2002) 8949–8956.
- [5] T. Riedl, F. Hanaoka, J.M. Egly, The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA, EMBO J. 22 (2003) 5293–5303.
- [6] A. Scrima, R. Konícková, B.K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P.D. Jeffrey, R. Groisman, Y. Nakatani, S. Iwai, N.P. Pavletich, N.H. Thomä, Structural basis of UV DNAdamage recognition by the DDB1–DDB2 complex, Cell 135 (2008) 1213–1223.

- [7] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger, DNA Repair and Mutagenesis, American Society of Microbiology, Washington, DC, 1995.
- [8] S. Feuerhahn, J.M. Egly, Tools to study DNA repair: what's in the box? Trends Genet. 24 (2008) 467–474.
- [9] M. Volker, M.J. Mone, P. Karmakar, A. Van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J.H.J. Hoeijmakers, R. Van Driel, A.A. Van Zeeland, L.H.F. Mullenders, Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo, Mol. Cell 8 (2001) 213–224.
- [10] L. Liu, J. Lee, P. Zhou, Navigating the nucleotide excision repair threshold, J. Cell. Physiol. 224 (2010) 585–589.
- [11] C. Suquet, M.J. Smerdon, UV damage to DNA strongly influences its rotational, J. Biol. Chem. 268 (1993) 23755–23757.
- [12] J.K. Kim, D. Patel, B.S. Choi, Constransting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6–4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity, Photochem. Photobiol. 62 (1995) 44–50.
- [13] M. Tijsterman, R. de Pril, J.G. Tasseron-de Jong, J. Brouwer, RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6–4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast, Mol. Cell Biol. 1 (1999) 934–940.
- [14] K. Ura, M. Araki, H. Saeki, C. Masutani, T. Ito, S. Iwai, T. Mizukoshi, Y. Kaneda, F. Hanaoka, ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes, EMBO J. 20 (2001) 2004–2014.
- [15] M.R. Duan, M.J. Smerdon, UV damage in DNA promotes nucleosome unwrapping, J. Biol. Chem. 285 (2010) 26295–26303.
- [16] V.A. Bohr, C.A. Smith, D.S. Okumoto, P.C. Hanawalt, DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall, Cell 40 (1985) 359–369.
- [17] D. Batty, V. Rapic'-Otrin, A.S. Levine, R.D. Wood, Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites, J. Mol. Biol. 300 (2000) 275–290.
- [18] M.E. Fitch, S. Nakajina, A. Yasui, J.M. Ford, In vivo recruitment of XPC to UVinduced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 Gene Product, J. Biol. Chem. 278 (2003) 46906–46910.
- [19] J. Guerrero-Santoro, M.G. Kapetanaki, C.L. Hsieh, I. Gorbachinsky, A.S. Levine, V. Rapic'-Otrin, The cullin 4B-based UV-damage DNA-binding protein ligase binds to UV-damage chromatin and ubiquitinates histone H2A, Cancer Res. 68 (2008) 5014–5022.
- [20] H. Wang, L. Zhai, J. Xu, H.Y. Joo, S. Jackson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Xiong, Y. Zhang, Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage, Mol. Cell. 22 (2006) 383–394.
- [21] A. Takedachi, M. Saijo, K. Tanaka, DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku and contributes to the recruitment of XPA, Mol. Cell Biol. 30 (2010) 2708–2723.
- [22] R. Hara, A. Sancar, Effect of damage type on stimulation of human excision nuclease by SWI/SNF chromatin remodeling factor, Mol. Cell. Biol. 23 (2003) (2003) 4121–4125.
- [23] F. Gong, D. Fahy, J.M. Smerdon, Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide exicision repair, Nat. Struct. Mol. Biol. 13 (2006) 902–907.
- [24] Q. Zhao, Q.E. Wang, A. Ray, G. Wani, C. Han, K. Milum, A.A.J. Wani, Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex, J. Biol Chem. 284 (2009) 30424–33432.
- [25] Y. Jiang, X. Wang, S. Bao, R. Guo, D.G. Johnson, X. Shen, L. Li, INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 17274–17279.
- [26] H. Lans, J.A. Marteijn, B. Schumacher, J.H. Hoeijmakers, G. Jansen, W. Vermeulen, Involvement of global genome repair, transcription coupled repair, and chromatin remodeling in UV DNA damage response changes during development, PLoS Genet. 6 (6) (2010) e1000941.
- [27] M.J Smerdon, S.Y. Lan, R.E. Calza, R. Reeves, Sodium butyrate stimulates DNA repair in UV-irradiated normal and xeroderma pigmentosum human fibroblastos, J. Biol. Chem. 257 (1982) 13441–13447.
- [28] B. Ramanathan, M.J. Smerdon, Enhanced DNA repair sythesis in hyperacetylated nucleosomes, J. Biol. Chem. 264 (1989) 11026–11034.
- [29] Y. Teng, Y. Yu, R. Waters, The Saccharomyces cerevisiae histone acetyltrasferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UVinduced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene, J. Mol. Biol. 316 (2002) 489–499.
- [30] Y. Yu, Y. Teng, H. Liu, S.H. Reed, R. Waters, UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus, Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (2005) 8650–8655.
- [31] R. Guo, J. Chen, D.L. Mitchell, D.G. Johnson, GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage, Nucleic Acid Res. (2010) [Epub ahead of printing].
- [32] Y. Teng, H. Liu, H.W. Gill, Y. Yu, R. Waters, S.H. Reed, Saccharomyces cerevisiae Rad 16 mediates ultraviolet-dependent histone H3 acetylation required for efficient global genome nucleotide-excision repair, EMBO Rep. 9 (2008) 97–102.
- [33] A. Datta, S. Bagchi, A. Nag, P. Shiyanov, G.R. Adami, T. Yoon, P. Raychaudhuri, The p48 subunit of the damage-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase, Mutat. Res. 486 (2001) 89–97.
- [34] E. Martinez, V.B. Palhan, A. Tjernberg, E.S. Lymar, A.M. Gamper, T.K. Kundu, B.T. Chait, R.G. Roeder, Human STAGA comlplex is a chromatin-acetylating

transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo, Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 6782–6795.

- [35] A. Irizar, Y. Yu, S.H. Reed, E.J. Louis, R. Waters, Silenced yeast chromatin is maintained by Sir2 in preference to permitting histone acetylations for efficient NER, Nucleic Acids Res. 38 (2010) 4675–4686.
- [36] T. Marti, E. Hefner, L. Feeney, V. Natale, J.E. Cleaver, H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks, Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (2006) 9891–9896.
- [37] K.S. Oh, M. Bustin, S.J. Mazur, E. Appella, K.H. Kraemer, UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells, DNA Rep. (2010) [Epub ahead of print].
- [38] D. Branzei, M. Foiani, Regulation of DNA repair throughout the cell cycle, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 297–308.
- [39] Y. Kiyotsugu, M. Yoshio, The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage, Cancer Sci. 101 (2010) 831–835.
- [40] S.A. Gatz, L. Wiesmüller, p53 in recombination and repair, Cell Death Differ. 13 (2006) 1003–1016.
- [41] C.P. Rubbi, J. Milner, p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage, EMBO J. 22 (2003) 975–986.
- [42] S.J Allison, J. Milner, Loss of p53 has site-specific effects on histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy, Cancer Res. 15 (2003) 6674–6679.
- [43] E. Rebollar, V. Valadez-Graham, M. Vázquez, E. Reynaud, M. Zurita, Role of the p53 homologue from Drosophila melanogaster in the maintenance of histone H3 acetylation and response to UV-light irradiation, FEBS Lett. 580 (2006) 642–648.
- [44] K.J. Cheung, D. Mitchell, P. Lin, G. Li, The tumor suppressor candidate p33 (ING1) mediates repair of UV-damage DNA, Cancer Res. 61 (2001) 4974–4977.
- [45] Y. Wang, J. Wang, G. Li, Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis, FEBS Lett. 580 (2006) 3787–3793.
- [46] W.H. Kuo, Y. Wang, R.P. Wong, E.I. Campos, G. Li, The ING1b tumour suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA, Exp. Cell Res. 313 (2007) 1628–1638.
- [47] J.R. Whetstine, A. Nottke, F. Lan, M. Huarte, S. Smolikov, Z. Chen, E. Spooner, E. Li, G. Zhang, M. Colaiacovo, Y. Shi, Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases, Cell 125 (2006) 467–481.
- [48] Y. Zhang, R.J. Klose, Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 (2007) 307–318.
- [49] B.D. Fodor, S. Kubicek, M. Yonezawa, R.J. O'Sulliva, R. Sengupta, L. Perez-Burgos, S. Opravil, K. Mechtler, G. Schotta, T. Jenuwein, Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells, Genes Dev. 20 (2006) 1557–1562.
- [50] M. Lloret-Llinares, C. Carré, A. Vaquero, N. de Olano, F. Azorín, Characterization of Drosophila melanogaster JmjC+N histone demethylases, Nucleic Acids Res. 36 (2008) 2852–2863.
- [51] C.H. Lin, B. Li, S. Swanson, Y. Zhang, L. Florens, M.P. Washburn, S.M. Abmayr, J.L. Workman, Heterochromatin protein 1a stimulates histone H3 lysine 36 demethylation by the Drosophila KDM4A demethylase, Mol. Cell. 32 (2008) 696–706.
- [52] Z. Palomera-Sanchez, A. Bucio-Mendez, A.V. Valadez-Graham, E. Reynaud, M. Zurtia, Drosophila p53 is required to increase the levels of the Dkdm4B demethylase alter UV induced DNA damage to demethylate histone H3 lysine 9, J. Biol. Chem. 285 (2010) 31370–31379.
- [53] S. Chaudhuri, J.J. Wyrick, M.J. Smerdon, Histone H3 Lys79 methylation is required for efficient nucleotide excision repair in a silenced locus of Sacharomyces cerevisiae, Nucleic Acids Res. 37 (2009) 1690–7000.
- [54] C. Maison, G. Almouzni, HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 (2004) 296–304.
- [55] M.S. Luijsterburg, C. Dinant, H. Lans, J. Stap, E. Wiernasz, S. Lagerwerf, D.O. Warmerdam, M. Lindh, M.C. Brink, et al., Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage, J. Cell Biol. 185 (2009) 577–586.
- [56] Q. Zhao, B.M. Barakat, S. Qin, A. Ray, M.A. El-Mahd, G. Wani, E. Arafa, S. Mir, Q. Wang, A.A. Wani, The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation, J. Biol. Chem. 283 (2008) 32553–325561.
- [57] S.E. Polo, D. Roche, G. Almouzni, New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells, Cell 127 (2006) 481–493.
- [58] I. Djupedal, K. Ekwall, Epigenetics: heterochromatin meets RNAi, Cell Res. 19 (2009) 282–295.
- [59] Q. Zhu, G. Wani, H.H. Arab, M.A. El-Mahdy, A. Ray, A.A. Wani, Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damage genomic sites, DNA Rep. 8 (2009) 262–273.
- [60] G. Schotta, R. Sengupta, S. Kubicek, S. Malin, M. Kauer, E. Callén, A. Celeste, M. Pagani, S. Opravil, I.A. De La Rosa-Velazquez, A. Espejo, M.T. Bedford, A. Nussen-zweig, M. Busslinger, T. Jenuwein, A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse, Genes Dev. 22 (2008) 2048–2061.
- [61] D.M. Chou, B. Adamson, N.E. Dephoure, X. Tan, A.C. Nottke, K.E. Hurov, S.P. Gygi, M.P. Colaiácovo, S.J. Elledge, A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2010) [Epub ahead of print].