



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**Determinación de las modificaciones epigenéticas
inducidas por enlaces covalentes cruzados, en células de
Anemia de Fanconi A**
TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Cecilia Ayala Zambrano

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Sara Frías Vázquez

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM/
Instituto Nacional de Pediatría

COMITÉ TUTOR: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Instituto Nacional de Cancerología

COMITÉ TUTOR: Dra. Alessandra Carnevale Cantoni

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad Universitaria, CDMX, febrero 2017



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de noviembre del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **AYALA ZAMBRANO CECILIA** con número de cuenta **409061877** con la tesis titulada **"Determinación de las modificaciones epigenéticas inducidas por enlaces covalentes cruzados, en células de Anemia de Fanconi A"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO
Secretario: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLIS
Suplente: DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
Suplente: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de enero del 2017.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Gracias al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.

Gracias a CONACYT-SEP 243102, PAPIIT IA202615 y Recursos Fiscales del Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Citogenética, Modalidad A que financiaron parcialmente el proyecto y a CONACYT por otorgar beca, con número de registro 330469, a Cecilia Ayala Zambrano.

Gracias a la Dra. Sara Frías Vázquez, la Dra. Alessandra Carnevale Cantoni, al Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y a la Dra. Benilde García de Teresa por su participación en el comité tutorial.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, CP 04530, Ciudad de México

Agradecimientos personales:

Soy el producto de una serie de eventos afortunados, desde la recombinación de genes que dio origen a mis primeras células, hasta el haber crecido en el entorno que me otorgó las mejores herramientas para llegar hasta donde estoy hoy. Mi primer encuentro con el mundo estuvo marcado por un ambiente de paz y amor construido por una gran familia, el núcleo conformado por mis padres y hermanas me dieron y siguen dando las bases sólidas de principios y valores que trató practicar en el día a día. Complementado por la familia extendida, los abuelos, los tíos y primos, ellos reforzaron las bases y han sido ejemplo de fortaleza, amor, responsabilidad y felicidad. Junto con mi núcleo, me han nutrido e instruido. He sido tan afortunada que la familia ha ido creciendo en cada etapa de mi vida, hasta un marido maravilloso encontré.

Crecí en una hermosa privada que me brindó de amigos para toda la vida, la primaria y secundaria estuvo llena de música y arte. La prepa me dio la oportunidad de conocer historias nuevas, la Universidad fue el primer encuentro con la vida, el primer reto que me obligó a apelar a mis bases para levantarme tras cada caída y ahora el posgrado que ha sido una constante fuente de alegrías, angustias, frustraciones y logros. Este proyecto me regaló una familia académica hermosa en el INP y otra en el INCan, no podría estar más agradecida con ellos.

En cada una de las etapas de mi vida me encontré con gente maravillosa que ahora es parte de la construcción y realización de mis sueños. Gracias por acompañarme, aconsejarme, gracias por tenerme paciencia, escucharme, consolarme, divertirme. Gracias por hacer este camino, una travesía feliz.

“Here’s to the fool who dream
Crazy as they may seem
Here’s to the hearts that break
Here’s to the mess we make”

“Audition (the fool who dream)”
By Benj Pasek and Justin Paul. *La la land*

Índice

RESUMEN	1
1. Anemia de Fanconi.	3
1.1. Generalidades	3
1.2. Reparación de ICL	5
1.3. Vía FA/BRCA	6
1.4. Relación entre la vía FA/BRCA y el cáncer.....	15
1.5. Causas de ICL	15
1.6. La anemia de Fanconi como modelo de estudio y sus limitantes.....	20
2. Cromatina	21
3. Reparación de DSB por NHEJ o HR.	24
3.1. La reparación de DSB en un contexto de cromatina	26
3.1.1. Señalización epigenética de DSB.....	26
3.1.2. Modificaciones epigenéticas que permiten el reclutamiento de efectores de NHEJ y HR	28
OBJETIVO	31
ANTECEDENTES	31
DISEÑO EXPERIMENTAL	31
METODOLOGÍA	32
1. Cultivos celulares	32
2. Generación línea celular HEK293 FANCA ^{-/-}	32
3. Tratamiento con mitomicina C (MMC)	32
4. Análisis de ciclo celular	33
5. Western Blot	33
6. Ensayo de aberraciones cromosómicas.....	34
7. Tratamiento TMP-UVA	34
8. Citometría de flujo	34
9. Inmunofluorescencias	35
1. Análisis estadístico	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1. Obtención de línea celular HEK293 FANCA ^{-/-}	40
2. Se pueden detectar DSB en la mayoría de las células 15min después del tratamiento con TMP+UVA.....	41
3. El número de foci de la γ H2AX y γ H2AX-H3K9me3 por célula es el mismo en las células WT y FANCA ^{-/-}	41
5. La inducción de ICL incrementa el número de células con PTM asociadas con HR en células WT, mientras que en las células en las que la vía FA/BRCA está comprometida se favorece la NHEJ.....	46
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DAÑO Y MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DNA.	3
FIGURA 2. VIA FA/BRCA.	9
FIGURE 3. RESOLUCIÓN INTERMEDIARIOS DE HOLLIDAY.	14
FIGURA 4. FORMACIÓN DE ICL POR ACETALDEHÍDO.	17
FIGURA 5. FORMACIÓN DE ICL POR FORMALDEHÍDO.	18
FIGURA 6. FORMACIÓN DE ICL A PARTIR DE PSORALENOS.	19
FIGURA 7 RELACIÓN ANTAGONISTA DE 53BP1 Y BRCA DURANTE LA REPARACIÓN DE DSB EN UN CONTEXTO DE CROMATINA.	30
FIGURA 8. EJEMPLO DE CÓMO SE LLEVÓ A CABO EL ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.....	37
FIGURA 9. CORROBORACIÓN FENOTIPO CELULAR FANCONI EN LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	40
FIGURA 10. LA SEÑALIZACIÓN DE DSB POR LAS PTM A) γ H2AX Y LA B) H3K9me3 NO VARÍA POR LA FUNCIONALIDAD DE LA VÍA FA/BRCA NI POR LA INDUCCIÓN DE ICL.	42
FIGURA 11. EL NÚMERO DE FOCI POR CÉLULA QUE FAVORECE LA NHEJ DISMINUYE EN LAS CÉLULAS HEK293 WT DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DE ICL.....	45
FIGURA 12. TRAS EL TRATAMIENTO CON TMP+UVA INCREMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS QUE FAVORECEN LA HR EN LAS CÉLULAS WT, MIENTRAS QUE EN LAS FANCA-/- LA SE ENRIQUECEN LAS CÉLULAS CON PTM QUE SE ASOCIAN A NHEJ.	47
FIGURA 13. EL TRATAMIENTO CON TMP+UVA DISMINUYE EL NÚMERO DE CÉLULAS CON PREDOMINIO DE MARCAS ASOCIADAS A NHEJ EN LAS CÉLULAS CON FOCI MIXTO WT, E INCREMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS SIN PREDOMINIO.	48
FIGURA 144. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE RESULTADOS.....	49

RESUMEN

La vía FA/BRCA es el mecanismo especializado encargado de reparar los enlaces covalentes formados entre las dos hebras del DNA (ICL por sus siglas en inglés). La falla de esta vía provoca fragilidad cromosómica espontánea e inducida por agentes alquilantes y condiciona una enfermedad llamada anemia de Fanconi (AF).

La vía está compuesta por 21 genes Fanconi (*FANC*) que codifican proteínas las cuales coordinan los procesos requeridos para la reparación por recombinación homóloga de los ICL. Estas lesiones se reconocen durante la fase S del ciclo celular, debido a que impiden el paso de la maquinaria de replicación, condicionando el estancamiento de la horquilla. Las figuras radiales, que son aberraciones consecuencia de la reunión de extremos cromosómicos sin homología, son características de esta enfermedad y constituyen una evidencia de que las células AF, en quienes la recombinación homóloga está afectada, utilizan vías alternas de reparación no fidedignas como la unión de extremos no homólogos para reparar las rupturas de doble hebra (DSB por sus siglas en inglés) intermediarias en la reparación de los ICL.

La señalización del daño a nivel de cromatina es esencial para la coordinación de la identificación y reparación del DNA. El proceso encargado de esto se conoce como (DDR por sus siglas en inglés, DNA damage response) y hace uso de modificaciones postraduccionales de histonas (PTM), que son reconocidas por factores que median o efectúan la reparación. Estudios realizados en sistemas en los que la lesión modelo a reparar es la DSB han identificado PTM relevantes para la señalización (γ H2AX, H3K9me3) y otras que contribuyen en la elección de la reparación de la DSB por recombinación homóloga (H4K16ac) o unión de extremos no homólogos (H4K20me2). La presencia de estas modificaciones en la reparación coordinada por la vía FA/BRCA no había sido reportada antes de este estudio.

Método: Utilizando el tratamiento compuesto por la fotoactivación del trimetilpsoraleno (TMP), se indujeron ICL en células HEK293 con una vía FA/BRCA íntegra (WT) o alterada (*FANCA*^{-/-}) y se analizaron por microscopía de fluorescencia las diferencias entre estas células en la colocalización de las marcas γ H2AX, H3K9me3, H4K20me2 y H4K16ac

Resultados: En células WT, la inducción de ICL incrementa el número de células con DSB en los que la γ H2AX colocaliza con la H4K16ac, mientras que pocas células presentan la colocalización de γ H2AX y H4K16ac en las zonas de daño cuando la vía FA/BRCA es disfuncional.

Conclusión: La inducción de ICL incrementa el número de células WT con PTM asociadas a HR, mientras que en el grupo con la vía FA/BRCA afectada aumentan las células con PTM asociadas a NHEJ.

ABSTRACT

The FA/BRCA pathway coordinates the repair of DNA interstrand crosslinks (ICL). The deficiency of this pathway results in Fanconi anemia (FA), a disease that shows spontaneous chromosome fragility that is exacerbated by exposition to alkylating agents.

At least 21 proteins encoded by *FANC* genes cooperate in this pathway in order to coordinate the repair of ICL using homologous recombination. The FA/BRCA pathway recognizes these lesions during the S phase of the cell cycle following replication fork arrest due to the encounter between the ICL and the replication machinery. Radial chromosomes are a particular kind of chromosome aberration in which non-homologous chromosomal fragments are joined. These aberrations are a pathognomonic finding in FA cells in which the mechanism of homologous recombination is compromised and, error prone alternate repair pathways, particularly non-homologous end-joining, are used to repair the intermediary double strand breaks (DSB) resulting from ICL processing.

The DNA damage response (DDR) is responsible for signaling at the chromatin level to coordinate the identification and actual repair of DNA. One of the main mechanisms used by the DDR are histone posttranslational modifications (PTM) that can be recognized by mediators or effectors of DNA repair. Previous research using DSB as the model lesion have identified PTM relevant in damage signaling (γ H2AX, H3K9me2) as well as other PTM that have a role in the decision of the pathway that will be used to repair the DSB; either homologous recombination (H4K16ac) or non homologous end joining (H4K20me2). Previous to this study, the role of these PTM in the repair dependent on the FA/BRCA pathway has not been reported.

Methods: ICL using photoactivated trimethylpsoralen (TMP) were induced in HEK293 cells with a functional or deficient FA/BRCA pathway. Fluorescent microscopy was used to evaluate the colocalization of γ H2AX, H3K9me3, H4K20me2 and H4K16ac, the differences between the cell types and the effect of treatment were identified.

Results. In a WT setting, ICL induction increases the number of DSB where γ H2AX and H4K16ac colocalize, whereas few cells with a deficient FA/BRCA pathway have γ H2AX and H4K16ac colocalization upon damage.

Conclusion: ICL induction increases the number of WT cells bearing PTM associated with HR, meanwhile cells with an affected FA/BRCA pathway have a larger amount of cells with PTM associated to NHEJ.

INTRODUCCIÓN

1. Anemia de Fanconi.

1.1. Generalidades.

El DNA es la molécula que almacena la información que un ser vivo requiere para sobrevivir, razón por la cual es indispensable protegerlo. Se estima que una célula humana presenta entre 10^4 - 10^5 lesiones en el genoma por día a través de fuentes endógenas y exógenas (factores físicos, químicos y biológicos), que provocan diferentes tipos de lesiones en el DNA (rupturas de hebra sencilla o de doble hebra, enlaces intra/inter hebra, etc.) que no pueden ser ignoradas. Esto ha llevado a las células a desarrollar mecanismos especializados en la reparación de distintos tipos de lesiones para mantener la integridad del genoma (Fig. 1) [1].

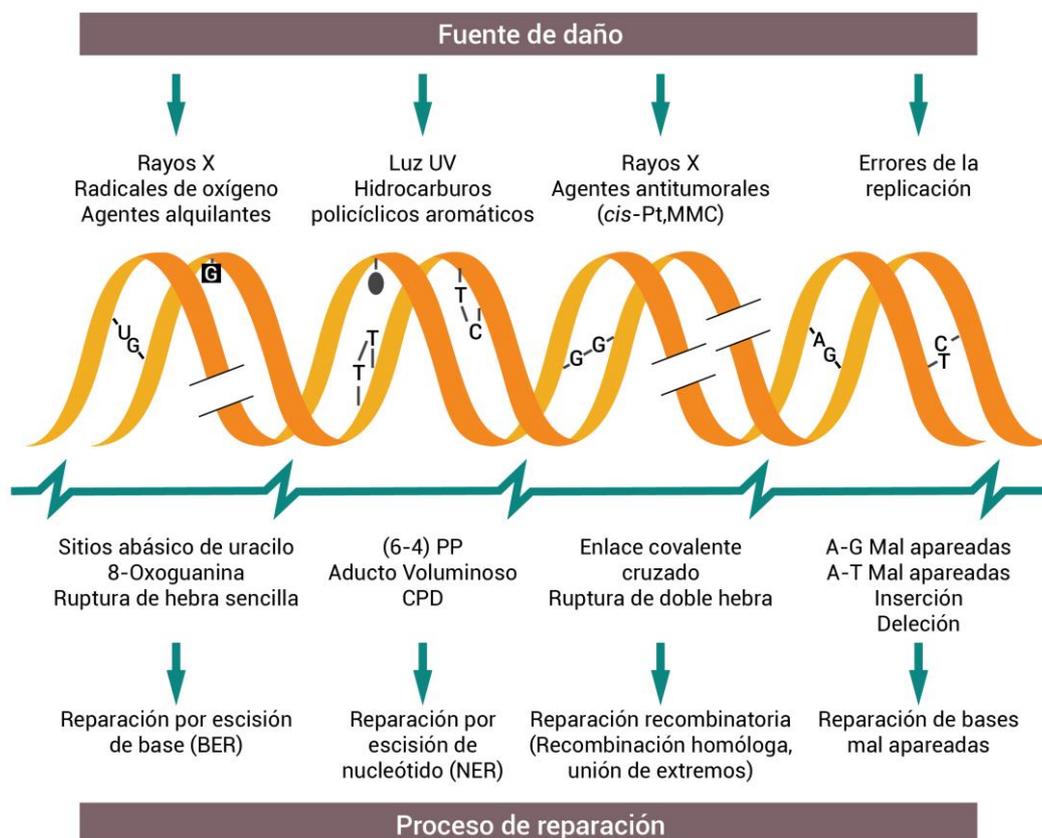


Figura 1. Daño y mecanismos de reparación del DNA.

La figura ejemplifica la manera como los agentes físicos, químicos y biológicos (parte superior) inducen diferentes tipos de daño (en medio). Estas lesiones son reparadas por mecanismos específicos (parte inferior) que devuelven la integridad al DNA. Imagen modificada de [2].

Una forma común de daño en el DNA es la que se presenta cuando se genera la unión covalente de las dos hebras (inter hebra), a este tipo de lesión se le conoce como enlace covalente cruzado (ICL por sus siglas en inglés). La genotoxicidad de

los ICL se centra en la afectación de procesos clave para la célula como la replicación, transcripción y la recombinación debido a que dicha unión covalente impide la apertura de la doble hebra [3, 4]. Este tipo de lesión se induce por un sin número de compuestos, entre los que figuran aldehídos productos del propio metabolismo celular como el acetaldehído, por lo que, su reconocimiento y correcta reparación es indispensable. La principal vía de reparación encargada de corregir este tipo de lesión es la vía FA/BRCA.

Al igual que muchos sistemas bioquímicos, la existencia de esta vía de reparación se vislumbró cuando se identificaron individuos que presentaron enfermedad debido a la deficiencia de dicha vía. Para el caso particular de la vía FA/BRCA, la historia comienza en 1927, cuando el pediatra suizo Guido Fanconi describió a tres hermanos con defectos de nacimiento y anemia perniciosa. La enfermedad que compartían fue nombrada en honor a su descubridor como anemia de Fanconi (AF) [5].

La AF afecta de 1 a 3 de cada 500,000 recién nacidos vivos [6], se trata de una enfermedad genética provocada por mutaciones de alguno de los 21 genes *FANC* descritos hasta el momento, 19 de éstos tienen un patrón de herencia autosómico recesivo, uno autosómico dominante (*RAD51/FANCR*) y uno ligado al X recesivo (*FANCB*) [7-9].

El fenotipo clínico de los pacientes con AF es muy variable. Algunas de las características físicas más comunes incluyen hiperpigmentación en la piel, talla baja, defectos radiales, atresia del canal auditivo, anomalías en riñón, corazón, pulmones malformaciones urogenitales y sistema digestivo [10, 11]. Los pacientes con AF pueden manifestar presencia o ausencia de una, varias o todas las características enlistadas en este párrafo, lo que complica el diagnóstico oportuno y en muchos de los casos no se identifica la enfermedad hasta que se manifiestan alteraciones hematológicas como pancitopenia, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico o falla medular.

A pesar de la heterogeneidad en el cuadro clínico, el fenotipo celular en la AF es muy constante: hay arresto de las células en la fase G2 del ciclo celular, estado proapoptótico e incremento en la fragilidad cromosómica espontánea e inducida por agentes alquilantes como la mitomicina C (MMC). Esta última característica se aprovecha para hacer el diagnóstico clínico de la enfermedad por medio de un

ensayo de aberraciones cromosómicas que busca evidenciar la sensibilidad a presentar rupturas en los cromosomas de manera espontánea y al exponerlos a agentes alquilantes bifuncionales. Las figuras radiales, que son aberraciones cromosómicas consecuencia de la reunión de extremos cromosómicos sin homología, son características de esta enfermedad y constituyen una evidencia de que las células con AF, en quienes la recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés) está alterada, utilizan vías alternas de reparación no fidedignas como la unión de extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés) para reparar el daño como se explica más adelante [3, 12].

Los pacientes con AF tienen un riesgo incrementado para desarrollar cáncer, destacando leucemia mieloide aguda en jóvenes (800 veces más que población general) y tumores sólidos epiteliales de cabeza y cuello (500 veces) y de aparato genital en adultos [10, 11]. La identificación de la AF antes de comenzar tratamientos quimioterapéuticos es de vital importancia, ya que muchos de los fármacos frecuentemente utilizados, como la MMC y el cisplatino, basan su acción antineoplásica en la inducción de ICL [4, 13]. Estos fármacos afectan a todas las células del paciente en cuestión, por lo que, ser administrados a un individuo en cuyas células la vía FA/BRCA se encuentra comprometida es contraproducente.

1.2. Reparación de ICL.

Se han descrito al menos dos formas diferentes de reparar ICL en la mayoría de los organismos vivos, que se distinguen principalmente por el uso o no del mecanismo de recombinación homóloga y por ende de la fase del ciclo celular en la que actúan.

La vía independiente de recombinación homóloga está ampliamente descrita en *E. coli* y juega un papel menor en las células de mamíferos, donde participa en la reparación de ICL en células quiescentes en fase G0/G1. La reparación requiere de una primera ronda de dos incisiones, una a cada lado del ICL, generando discontinuidad de la hebra donde se hicieron los cortes y un monoadocto en la hebra complementaria. La discontinuidad de la hebra se repara por síntesis translesión y posteriormente el monoadocto se remueve por una segunda escisión. La discontinuidad generada en la segunda ronda de cortes se repara por una polimerasa, usando como molde la hebra complementaria previamente reparada [3, 13]. Tanto en procariontes como en eucariontes la vía de reparación encargada de

dirigir las nucleasas que realizan las dos rondas de cortes sobre el DNA es la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés). La síntesis translesión se lleva a cabo por la polimerasa II en procariontes y por alguna de las polimerasas de síntesis translesión (η , ι , κ , ζ y REV1) en eucariontes [3, 13].

La vía dependiente de recombinación homóloga es la utilizada preferentemente por las células de los mamíferos [3]. Sucede durante la fase S del ciclo celular, cuando la horquilla se encuentra con el ICL. El proceso es muy complejo y es coordinado por la vía FA/BRCA [13]. En bacterias y algunas levaduras el proceso es más sencillo y la reparación es dirigida por NER [3, 14].

1.3. Vía FA/BRCA.

La vía FA/BRCA es compleja ya que coordina diferentes mecanismos de reparación (NER, síntesis translesión y recombinación homóloga) y en la que participan diversas proteínas, entre las que destacan las codificadas por los llamados genes *FANC*. Hasta el momento se han descrito 21 genes *FANC* (Tabla 1) y no se descarta la posibilidad de que existan más [15]. Para que un gen se defina como *FANC* debe cumplir alguno de los siguientes criterios:

- Existir registro de mutaciones generalmente bialélicas que condicionen la pérdida de función de la proteína en el mismo gen de dos o más pacientes no relacionados [15].
- Identificación de mutaciones bialélicas en un solo paciente y corrección del fenotipo celular relacionado con la AF tras la expresión exógena del gen/cDNA candidato [15].

Todos los pacientes con diagnóstico de AF presentan la fragilidad cromosómica característica independientemente del gen *FANC* responsable de la enfermedad. Sin embargo, los genes *FANC* pueden clasificarse como genes “AF auténticos” y genes “similares a AF”, dependiendo de si su pérdida de función condiciona o no el fenotipo clásico de falla medular. Los genes AF auténticos son 16 (*FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, N, P, Q, T y V*), en ellos, las mutaciones que causan pérdida de función de la proteína correspondiente han sido descritas en al menos 2 pacientes con falla medular y fragilidad cromosómica. Mientras que la ausencia de las proteínas codificadas por los 4 genes “similares a AF” (*FANCO, FANCR, FANCS, FANCU*) genera fragilidad cromosómica y malformaciones relacionadas con la AF, pero no falla de la médula ósea [6, 7, 15].

Tabla 1. Generalidades genes FANC

Gen mutado	Localización Cromosómica	Frecuencia de mutación del gen en pacientes con anemia de Fanconi	Función	Referencia
<i>Genes que causan un fenotipo clásico de anemia de Fanconi</i>				
FANCA	16q24.3	66%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[17]
FANCB	Xp22.31	2%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[18]
FANCC	9q22.3	10%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[19]
FANCD1/BRCA2	13q12.13	<2%	Recombinación homóloga y estabilización de horquilla	[20]
FANCD2	3p25.3	2%	Unión a FANCI, tiene múltiples funciones	[21]
FANCE	6p21.22	2%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[22]
FANCF	11p15	2%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[22]
FANCG/XRCC9	9p13	9%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[22]
FANCI	15q25.16	<2%	Se une a FANCD2; tiene múltiples funciones	[23]
FANCJ/BRIP1	17q22-q24	<2%	Recombinación homóloga y síntesis translesión	[24]
FANCL	2p16.1	<2%	Ubiquitin ligasa E3 del complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	[25]
FANCN/PALB2	16p12.1	<2%	Recombinación Homóloga	[26]
FANCP/SLX4	16p13.3	<2%	Andamiaje de nucleasas	[27]
FANCQ/XPF o ERCC4	16p13.12	<2%	Endonucleasa	[28]
FANCT/UBE2T	1q32.1	<2%	E2 se conjuga con E3 y cataliza la ubiquitinación de proteínas;	[29]
FANCV/REV7 o MAD2L2	1p36	<2%	Síntesis translesión (TLS)	[7]
<i>Genes que causan un fenotipo similar a anemia de Fanconi</i>				
FANCO/RAD51C	17q25.1	<2%	Recombinación Homóloga	[30]
FANCR/RAD51	15q15.1	<2%	Recombinación Homóloga	[9]
FANCS/BRCA1	17q21.31	<2%	Recombinación Homóloga y estabilización de horquilla	[31]
FANCU/XRCC2	7q36.1	<2%	Recombinación homóloga	[15]
FANCM	14q21.3	<2%	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi, reconocimiento de la lesión	[32]

FANCM, es una excepción ya que no puede clasificarse en ninguno de estos dos grupos. Se trata de un caso atípico debido a que en el único paciente registrado

con mutaciones bialélicas en ese gen y características de AF se encontraron también, mutaciones bialélicas en *FANCA* [16]. Aunado a eso, la reversión del fenotipo celular Fanconi se concretó con la complementación genética de *FANCA* y no con la de *FANCM* [16] y la pérdida de la función de variantes de *FANCM* se ha descrito en al menos dos individuos sanos sin problemas hematológicos Esta información ha puesto en entredicho la autenticidad de *FANCM* como un verdadero gen *FANC* [6].

Existen otras proteínas que participan en la vía FA/BRCA que se han clasificado como “relacionadas con AF” (MHF1, FAAP20, FAAP24, FAAP100, USP1 y UAF1). Éstas no se consideran genes *FANC* debido a que a pesar de que su inactivación simula el fenotipo celular de la AF, no se cumple el requisito de que se hayan identificado mutaciones bialélicas en algún paciente por lo que no se les puede asignar un grupo *FANC* [14].

Para facilitar el estudio de los componentes de la vía FA/BRCA, las proteínas que la integran se han clasificado en tres grupos de acuerdo a su actividad durante la reparación: Complejo core, heterodimero FANCI-FANCD2 y factores de reparación. En conjunto, los grupos completan la reparación del ICL llevando a cabo el reconocimiento del ICL, la ubiquitinación del complejo FANCD2-I, la incisión en el DNA, el *bypass* del aducto y la reparación por recombinación homóloga de la lesión (Fig. 2)[14].

El reconocimiento del ICL se lleva a cabo durante la fase S, cuando la horquilla de replicación se encuentra con la unión covalente y la separación de la doble hebra no es posible, lo que condiciona el arresto de la horquilla (Fig. 2)[14]. Ante este estímulo, las proteínas que componen la horquilla se mantienen sobre el DNA a una distancia de 20 a 40 pb del ICL y generan estructuras aberrantes que forman parte de la señalización que alerta a los puntos de monitoreo (*checkpoints*) que la replicación esta siendo afectada [14, 33].

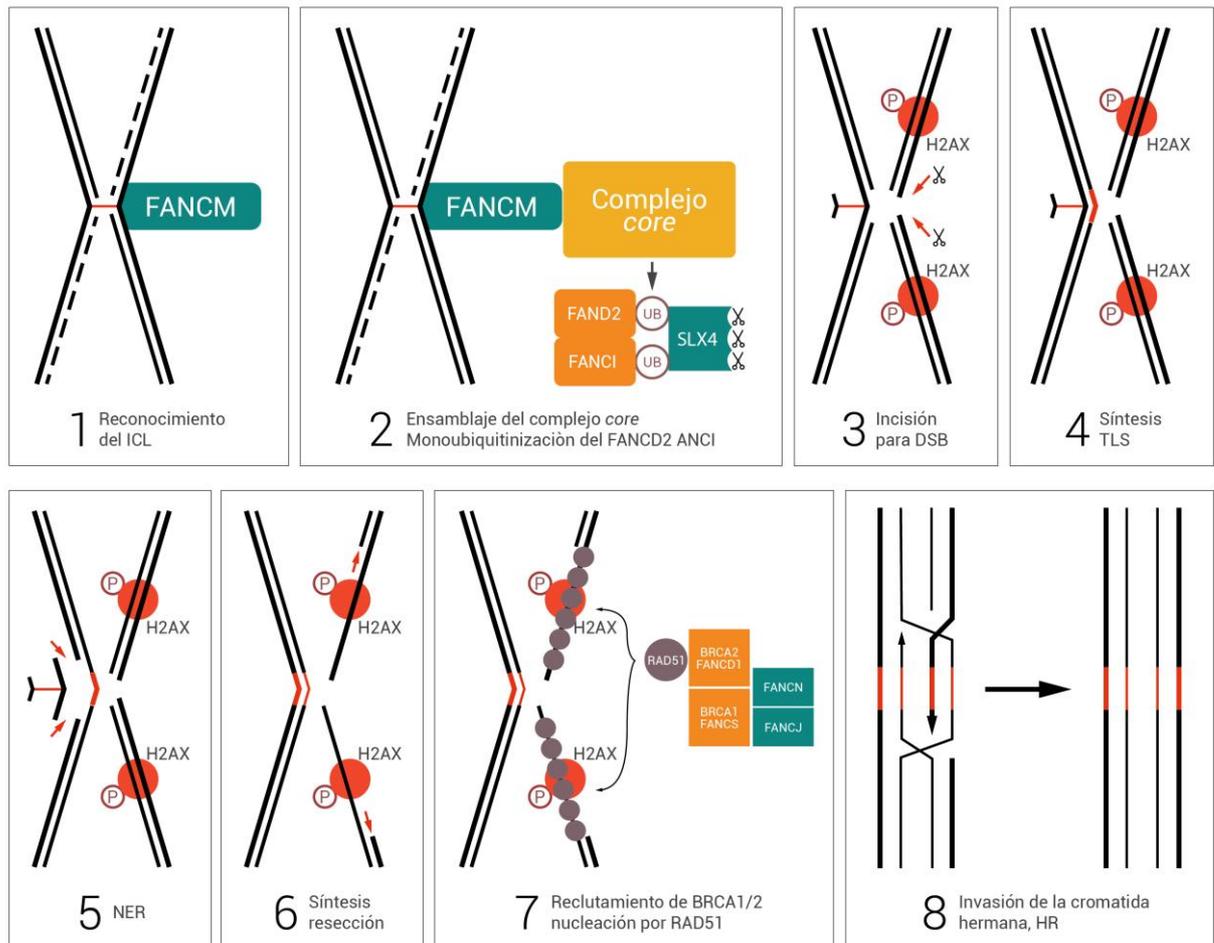


Figura 2. Via FA/BRCA.

Ilustración que esquematiza los diferentes pasos de la vía FA/BRCA. Imagen modificada de [34]

La activación de la vía FA/BRCA resulta del reconocimiento de la estructura formada por el colapso de dos horquillas de replicación a cada lado de un ICL [13]. El complejo encargado del reconocimiento de la estructura ramificada resultante incluye a las proteínas FANCM que debe ser fosforilada por la cinasa serina/treonina ATR (ATR) del *checkpoint* [14], la proteína asociada a la anemia de Fanconi 24 (FAAP24), y las proteínas S y X de centrómero (CENPS, FAAP16 o MHF1 y CENPX, FAAP100 o MHF2, respectivamente), la identificación de este tipo de estructura permite el reclutamiento del primer grupo de proteínas que conforman la vía FA/BRCA conocido como el complejo *core* [6, 14].

El establecimiento de FANCM-FAAP24-MHF1-MHF2 en la cromatina sirve como sitio de andamiaje para el resto del complejo *core*. Una vez que las 14 proteínas que conforman el heteromultímero (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, MHF1, MHF2, FAAP20 y FAAP24) se encuentran

juntas, forman una unidad funcional con actividad E3 ubiquitin ligasa que reside en FANCL y en acción conjunta con su correspondiente E2 (UBE2T/FANCT), monoubiquitinan a las proteínas que forman el heterodímero FANCD2-I: FANCD2 y FANCI (Fig. 2)[6].

El ensamblaje correcto del complejo *core* no es el único evento necesario para que se lleve a cabo la ubiquitinación de FANCD2-I. Además es necesaria la fosforilación de los componentes del dímero por ATR o la cinasa serina/treonina ATM (ATM) [35], así como la monoubiquitinación del antígeno de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés) por la proteína ubiquitin ligasa E3 RAD18 (RAD18). Experimentos en los que se elimina la expresión de RAD18 reportan que no hay detección de PCNA-Ub y existe una marcada disminución de la monoubiquitinación de FANCD2 en respuesta a agentes que dañan el DNA. Se han identificado dos vías por las cuales PCNA-Ub promueve la monoubiquitinación de FANCD2: 1- facilitando el reclutamiento de FANCD2 por interacción física y 2- promoviendo el reclutamiento de FANCL al complejo *core*, favoreciendo su acción sobre FANCD2 [14].

Los grupos ubiquitin de FANCD2-I-Ub no sólo permiten su anclaje en la zona de daño, sino que también posibilitan la incorporación de la proteína que sirve de andamiaje de nucleasas a la cromatina: la subunidad endonucleasa estructura-específica SLX4 (SLX4, también denominada como FANCP). SLX4 se ensambla al heterodímero FANCD2-I-Ub a través del dominio dedo de zinc 4 de unión a ubiquitina (UBZ4 por sus siglas en inglés) y funciona como un cinturón de herramientas que organiza y regula endonucleasas específicas de estructura como XPF/FANCP/ERCC4-ERCC1, MUS81-EME1 y SLX1 en el sitio de daño [6]. Otra nucleasa específica de estructura es la nucleasa asociada a Fanconi 1 (FAN1), la cual puede interactuar directamente con FANCD2-I-Ub a través de su dominio UBZ. *FAN1* fue identificado en 2010 y en su momento, se presentaba como candidato perfecto para ser gen *FANCD2*, ya que, la disminución de su expresión produce sensibilidad a agentes alquilantes. Sin embargo, más tarde se demostró que la actividad de nucleasa de FAN1 no es necesaria para la incisión del ICL, por lo que se ha sugerido que su papel en la vía FA/BRCA podría ser redundante [14].

Estas nucleasas hacen dos incisiones nucleolíticas a ambos lados de un ICL sobre alguna de las hebras parentales, una vez que continúa la replicación, se

producen tres tipos de lesiones: una ruptura de doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés) en la cromátida originada de la hebra donde las endonucleasas hicieron el corte, una ruptura de hebra sencilla y un aducto en la cromátida originada de la hebra opuesta (Fig. 2); a este proceso se le conoce como “desenganche” (*unhooking*) [14]. Cada uno de estos daños es reparado por diferentes vías de reparación.

En la cromátida que no fue afectada por la acción de las nucleasas, la ruptura de hebra sencilla y el aducto son reparados por síntesis translesión (TLS por sus siglas en inglés) y NER, respectivamente. Primero la polimerasa de síntesis translesión incorpora los nucleótidos tomando como molde la hebra complementaria con el aducto. Estas polimerasas, a diferencia de las de replicación, cuentan con un sitio catalítico de mayor tamaño, lo que les permite acomodar bases voluminosas o modificadas como los aductos que resultan del procesamiento del ICL. Sin embargo, esta característica tiene un costo en la fidelidad de la replicación ya que conlleva la probable introducción de mutaciones en el nuevo templete [14, 36, 37].

Se han identificado varias polimerasas de síntesis translesión en mamíferos que incluyen la familia Y (POL κ , POL η , POL ι y REV1) y la polimerasa de la familia B, POL ζ (compuesta por las subunidades REV3 y REV7) [37]. Uno de los modelos que explica el funcionamiento de la TLS en células durante fase S es el llamado modelo de intercambio de polimerasas. En éste, las polimerasas de TLS interaccionan con PCNA-Ub estimulando el intercambio de la polimerasa replicativa por las de TLS [14]. Las polimerasas de TLS cooperan para lograr el paso de la lesión, siendo REV1-POL ζ la dupla con mayor actividad en mamíferos [36] [37]. REV1 inserta dCMPs (desoxicitidin mono fosfato) en la nueva hebra, y juega un papel principal estructural, facilitando el intercambio de polimerasas, además, interacciona con la subunidad accesoria de la POL ζ : REV7 (*FANCV*) [7]. La otra subunidad que compone a la POL ζ es REV3, en esta última recae la actividad catalítica de la enzima [14, 37].

Las polimerasas de síntesis translesión se reclutan al sitio de daño por PCNA-Ub y el complejo *core* de la AF. El complejo *core* contiene a la proteína FAAP20, la cual interactúa con REV1 a través del dominio UBZ4 de FAAP20. Éste reconoce al dominio BRCT (BRCA1 C terminal) de REV1 esté o no ubiquitinado [14].

Para completar la vía FA/BRCA, la DSB producto del “desenganche” del ICL, debe ser reparada. La correcta resolución de esta lesión es clave, ya que errores en este punto pueden llevar a mutaciones y re-arreglos cromosómicos que predisponen a organismos multicelulares al desarrollo de cáncer [38].

La vía que resuelve preferentemente las DSB durante las fases S/G2 debido a que hay disponibilidad de la cromátida hermana, es la reparación por recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés) [39, 40]. La reparación HR de las DSB funciona como un mecanismo de copiar y pegar la información que contiene la cromátida hermana y consta básicamente de tres pasos: la señalización y resección de los extremos 5' de la DSB, la invasión de hebra y la resolución de los intermediarios de Holliday (Fig. 2) [38-40].

ATM y ATR son dos de las primeras proteínas en activarse cuando existe presencia de DSB. Estas cinasas fosforilan a proteínas clave durante la DDR que incluyen a la cinasa 2 del *checkpoint* (CHEK2), la cinasa 1 del *checkpoint* (CHEK1), la proteína de tumor p53 (TP53), la proteína asociada a reparación de DNA BRCA1 (BRCA1) y la variante de histona H2AX [41]. La fosforilación de ésta última es conocida con el nombre de gamma H2AX (γ H2AX) y se ha asociado por excelencia a la existencia de una DSB [76]. La γ H2AX, junto con la proteína mediadora del daño a DNA *checkpoint* 1 (MDC1) y la proteína de dedo en anillo 8 (RNF8) se encargan de señalizar para reclutar a las proteínas encargadas de reparar el daño y activar los *checkpoints* del ciclo celular [42].

Una vez señalizado el daño, el complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) en colaboración con la proteína de unión a retinoblastoma 8 (RBBP8 por sus siglas en inglés, también conocida como CtIP) inicia la resección nucleolítica sobre la hebra 5' de ambos extremos de la DSB. Posteriormente, la resección se extiende por la actividad conjunta de la exonucleasa 1 (EXO1), la proteína parecida a helicasa RecQ del síndrome de Bloom (BLM), la helicasa ATP dependiente del síndrome de Werner (WRN) y la DNA helicasa/nucleasa 2 de replicación dependiente de ATP (DNA2), generando extremos 3' de DNA de hebra sencilla (ssDNA) que son recubiertos por la proteína de replicación A (RPA por sus siglas en inglés). Es entonces cuando la proteína asociada a reparación del DNA BRCA2 con asistencia de su proteína compañera y localizadora (BRCA2/FANCD1 y PALB2/FANCN, respectivamente) se recluta a la zona de daño y con ayuda de los parálogos C y D de RAD51

(RAD51C/FANCO y RAD51D respectivamente), facilitan la remoción activa de RPA al mismo tiempo que se carga la recombinasa RAD51 (RAD51/FANCR) a los extremos salientes de ssDNA [14, 40, 41].

La estructura núcleo-proteica conformada por el ssDNA-RAD51/FANCR es conocida como filamento presináptico, éste se une al DNA dúplex receptor y busca la secuencia homóloga, formando una molécula compuesta por la ssDNA invasora y el DNA recombinante conocida como bucle D. La formación de este heteroduplex permite la síntesis del DNA iniciando a partir de los extremos 3' de las hebras invasoras y se extiende hasta capturar el segundo extremo de la ruptura formando una estructura con dos intermediarios de Holliday [43].

La resolución de la estructura formada por el doble intermediario de Holliday está a cargo de resolvasas como GEN1, SLX4-MUS81-EME1 y SLX1 [40]. Éstas pueden hacer incisiones sobre las intersecciones en dos orientaciones diferentes. Si la ruptura se introduce en la hebra complementaria a la ssDNA, los brazos que flanquean la intersección son intercambiados, en contraste, si el corte se lleva a cabo en el otro par de hebras el resultado de la RRH no genera intercambio entre los cromosomas (Fig 3.A) [44].

De manera alternativa existen otros dos mecanismos de reparación por HRy en los que se generan exclusivamente recombinates no entrecruzadas durante la reparación de DSB. En uno la ssDNA invasora simplemente es desplazada de la hebra templete, evitando la generación de la doble intersección de Holliday y apareada con su hebra complementaria en una vía conocida como síntesis dependiente del alineamiento de la hebra (SDSA por sus siglas en inglés) (Fig. 3B) [39, 43]. El segundo mecanismo, al igual que en la vía canónica, resuelve el doble intermediario de Holliday a través de la acción combinada de BLM y la topoisomerasa III (TopoIII), éstas llevan a los intermediarios de Holliday hacia adentro en un proceso llamado migración de la ramificación, hasta formar una estructura hemicatenaria que es resuelta por la Topo III disolviendo así los intermediarios (Fig 3. C) [43-45].

La otra vía, alternativa a la HR, que frecuentemente se encarga de reparar las DSB es la unión de extremos no homólogos (NHEJ), ésta reúne los dos extremos de la DSB por ligación directa y tiene la característica de poder actuar durante cualquier fase del ciclo celular ya que no requiere de la existencia de cromátida

hermana para la búsqueda de homología. La NHEJ es la vía que repara la mayoría de las DSB debido a que no requiere de un templete homólogo, sin embargo, tiene la gran desventaja de hacer una reparación no fidedigna que en muchas ocasiones puede introducir mutaciones y rearrreglos cromosómicos [38]. De hecho, se considera que las figuras radiales, que son las aberraciones cromosómicas clásicas en las células con AF, son evidencia de que la reparación de las DSB, generadas a partir del ICL, se está llevando a cabo por la NHEJ en lugar de por la HR [3, 12]. El mecanismo molecular por el cual se elige emplear una vía u otra para la reparación de DSB durante la fase S del ciclo celular no está del todo claro, aunque se sabe de algunas proteínas clave como la proteína asociada a cáncer de mama 1 (BRCA1 por sus siglas en inglés, también denominada como FANCS) y la proteína de unión a p53 (53BP1 por sus siglas en inglés) que dirigen la reparación de la DSB por HR o NHEJ, respectivamente. La regulación de la toma de decisión entre la reparación por HR o NHEJ se abordará más adelante.

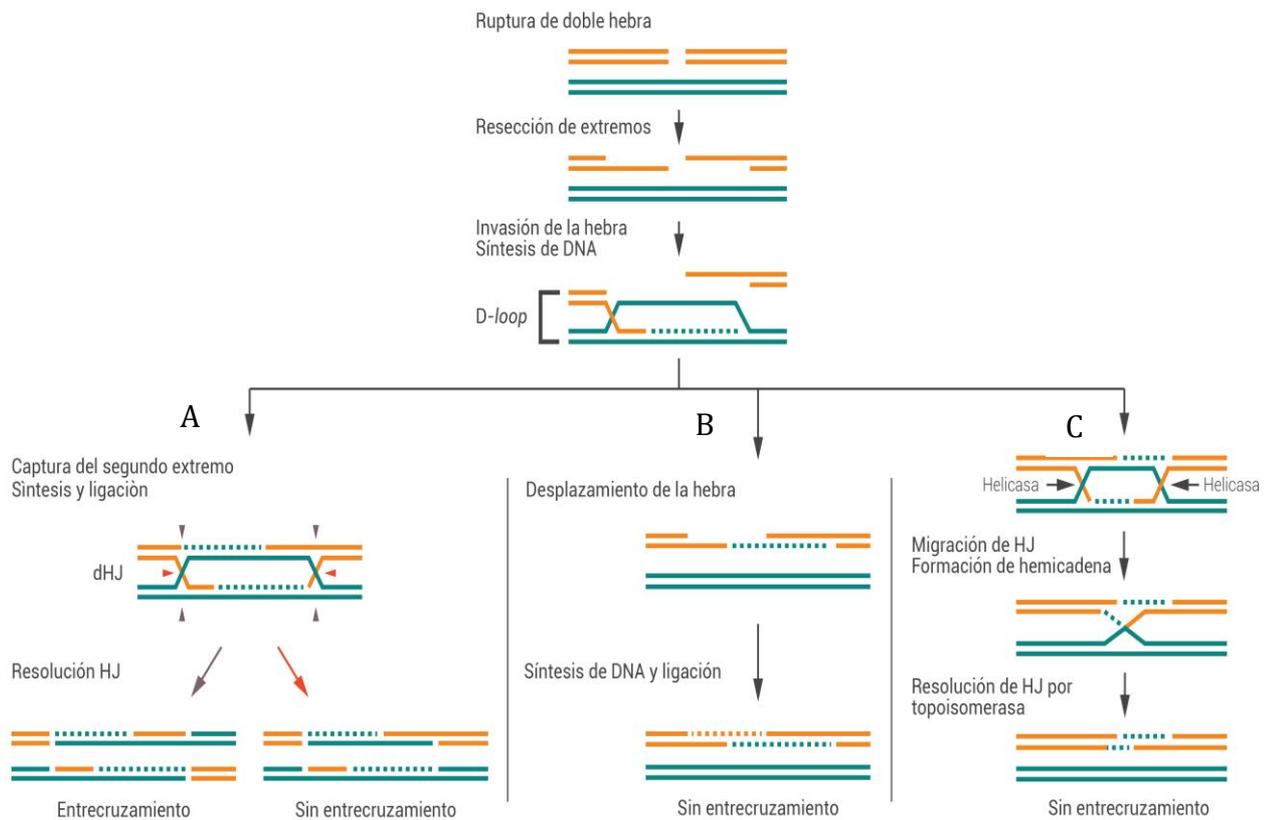


Figure 3. Resolución intermediarios de Holliday. Imagen modificada de [43].

1.4. Relación entre la vía FA/BRCA y el cáncer.

Además de la asociación previamente descrita entre la AF y el riesgo incrementado para desarrollar leucemia mieloide aguda y tumores sólidos de cabeza y cuello y aparato genital, también se ha descrito relación entre genes *FANCC* y otras neoplasias como las neoplasias de mama y ovario [40].

Recientemente, se ha reportado que dos mutaciones diferentes en *FANCM*, que generan variantes sin sentido (c.5101C>T y c.5791C>T), se asocian con el incremento de susceptibilidad de cáncer de mama. Asimismo, portadores de mutaciones monoalélicas en el gen *FANCC* y *FANCI* tienen un modesto incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario, respectivamente [40]. Mientras que individuos con mutaciones en los genes de la HR (*BRCA2/FANCD1*, *BRCA1/FANCS*, *BRIP1/FANCI*, *PALB2/FANCF*, *RAD51C/FANCO*) que participan río abajo en la vía FA/BRCA presentan un franco incremento en el riesgo de desarrollo de tumores de mama y ovario [6, 40].

1.5. Causas de ICL.

1.5.1. Endógenas.

El motivo por el cual los pacientes con anemia AF presentan falla medular y predisposición a leucemias, aun sin haber estado expuestos a agentes alquilantes, fue una incógnita durante muchos años. Se asumía la existencia de una fuente endógena de ICL, sin embargo, no fue hasta hace relativamente poco que se identificó y aceptó su identidad: aldehídos reactivos productos del metabolismo, destacando el acetaldehído y el formaldehído [5]. Llegar a esta conclusión no fue sencillo a pesar de que la capacidad de los aldehídos para formar ICL en diferentes ensayos *in vitro* se demostró desde principios de los noventa [46]. La evidencia presentada por estos grupos de estudio no era suficiente para definir la participación de los aldehídos en la etiología de la AF [5]. Fue hasta el año 2007, en el que ensayos en células linfoblastoides de pollo DT40 y células epiteliales de colon humano RKO demostraron la participación necesaria de las proteínas de la vía FA/BRCA y HR, pero no las de la NHEJ, para reparar el daño ocasionado por concentraciones normales de formaldehído [47].

La información publicada por este grupo fue apoyada con evidencia obtenida de otros modelos celulares y animales. Se demostró que el reto de formaldehído a linfocitos B humanos NALM-6 con mutaciones inducidas en *FANCB* promueve la

acumulación de rupturas cromosómicas, formación de estructuras radiales y fosforilación de la variante de histona H2AX (γ H2AX), todas estas características presentes en las células con AF retadas con agentes alquilantes bifuncionales [48]. En otros experimentos se reportó que la combinación de la mutación conjunta del gen que codifica a la enzima que metaboliza el formaldehído, *ADH5*, y genes *FANCL* río arriba (*FANCL*) o abajo (*FANCD2*) resulta en una combinación letal en células de pollo DT40 [48].

En el siguiente nivel, dos experimentos diferentes realizados en ratones transgénicos demostraron la importancia de la actividad de la enzima que media el metabolismo del acetaldehído (alcohol deshidrogenasa 2, *Aldh2*) en ratones con mutaciones bialélicas en genes *Fanc*. El primer ensayo reportó que los ratones *Aldh2^{-/-}Fancd2^{-/-}* no son viables si la madre también es deficiente para la *Aldh2*, sin embargo, cuando la madre es heterocigota *Aldh2^{+/-}*, la función metabólica materna es suficiente para rescatar a la descendencia y permite el nacimiento de las crías doble mutantes. Estos ratones *Aldh2^{-/-}Fancd2^{-/-}* desarrollan leucemia aguda y anemia aplásica [49]. El segundo experimento se realizó mutando el gen *FANCL* inhabilitado con mayor frecuencia en los pacientes con AF (*FANCA*). Se desarrollaron ratones transgénicos *Aldh2^{-/-}Fanca^{-/-}*, en esta ocasión, el rescate de la letalidad embrionaria requirió de madres WT con catabolismo de aldehídos intacto. Al momento del nacimiento, los ratones *Aldh2^{-/-}Fanca^{-/-}* mostraron números bajos de células hematopoyéticas, indicando que la *Aldh2* fetal es esencial para que haya una hematopoyesis adecuada [50].

La información ofrecida por los modelos animales ayudó a dar fuerza a la hipótesis de los aldehídos como fuente endógena de los ICL, sin embargo, como todos los modelos animales, los eventos observados en el ratón no necesariamente retratan lo que sucede en el ser humano, aunado a esto, hay que considerar que la simple mutación bialélica de genes *Fanc* en estos animales no replica la falla de médula ósea observada en los paciente Fanconi AF, por lo que aún faltaba algún hecho contundente que no dejara espacio a la duda sobre la participación de los aldehídos como fuente endógena de ICL en seres humanos [51].

Una mutación dominante para uno de los alelos que codifican la acetil deshidrogenasa 2 (*ALDH2*, sustitución Glu504Lys) presente en aproximadamente 50% de la población japonesa fue pieza clave para concluir con el tema. Esta

mutación compromete la actividad enzimática de la ALDH2 durante el metabolismo del alcohol, generando la acumulación de acetaldehído en la célula. Un estudio realizado en pacientes con AF japoneses determinó que aquellos individuos con mutaciones de *ALDH2* presentan progresión acelerada de la enfermedad, probando que la actividad de la ALDH2 impacta en la patogénesis de la AF [51].

El acetaldehído es un monoaldehído generado durante el catabolismo de la treonina y es intermediario durante el metabolismo del alcohol [52]. La reacción completa requiere de dos moléculas de acetaldehído, en un primer paso, el acetaldehído reacciona con el grupo amino exocíclico de la guanina para formar el N²-etiliden-2'-desoxiguanina, el cual al reaccionar con la segunda molécula de acetaldehído forma el intermediario 1, N²-propano-2'-desoxiguanina, que existe en equilibrio entre su forma abierta y cerrada. La primera favorece el enlace covalente cruzado al reaccionar con la otra desoxiguanosina presente en la hebra complementaria. Este mismo intermediario puede reaccionar con aminas primarias de proteínas (Fig. 4) [5].

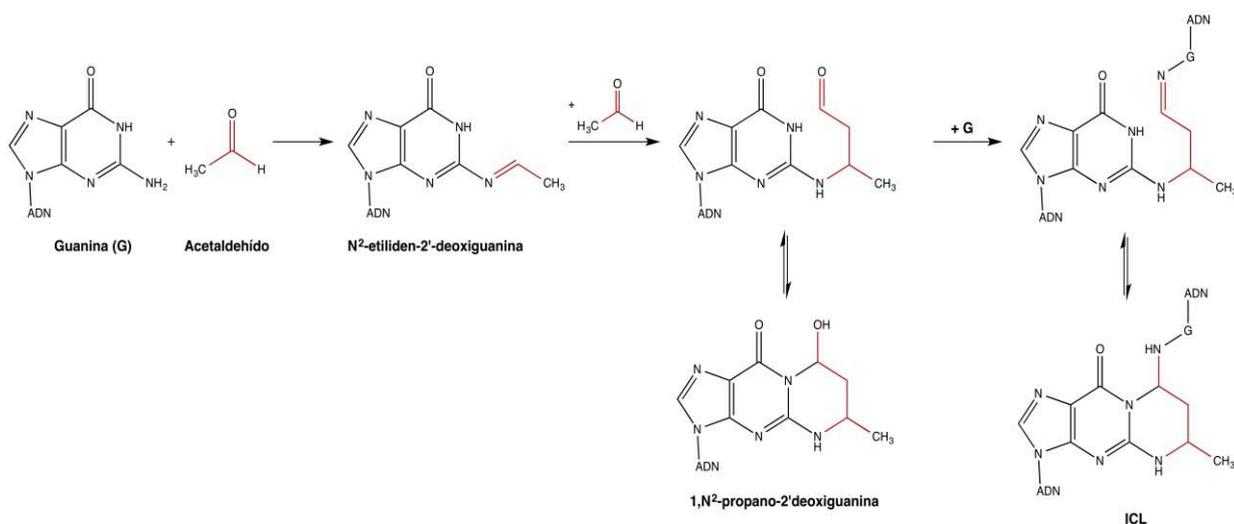


Figura 4. Formación de ICL por acetaldehído. Imagen modificada de [5]

Otro monoaldehído con capacidad de inducir la formación de ICL relativamente abundante en seres humanos (concentración promedio en plasma de 13-97 μmol/l) es el formaldehído [47]. En el núcleo, existen algunos procesos bioquímicos que producen formaldehído, tal es el caso de la desmetilación de histonas por desmetilasas Jumonji y la desalcalinización de bases de DNA metiladas por ortólogos de AlkB. Sin embargo la célula previene la acumulación de este producto químico a través de la acción de la enzima ADH5 [48].

El formaldehído genera ICL a través un puente metileno formado entre dos grupos amino exocíclicos de las bases de DNA adyacentes. En la primera reacción el formaldehído reacciona con las aminas primarias de las bases del DNA para formar un aducto metilol. La deshidratación de este producto resulta en la constitución de una base de Schiff, este intermediario puede reaccionar con otra base para establecer un ICL o con una lisina para conformar un enlace covalente DNA-proteína (Fig. 5) [5].

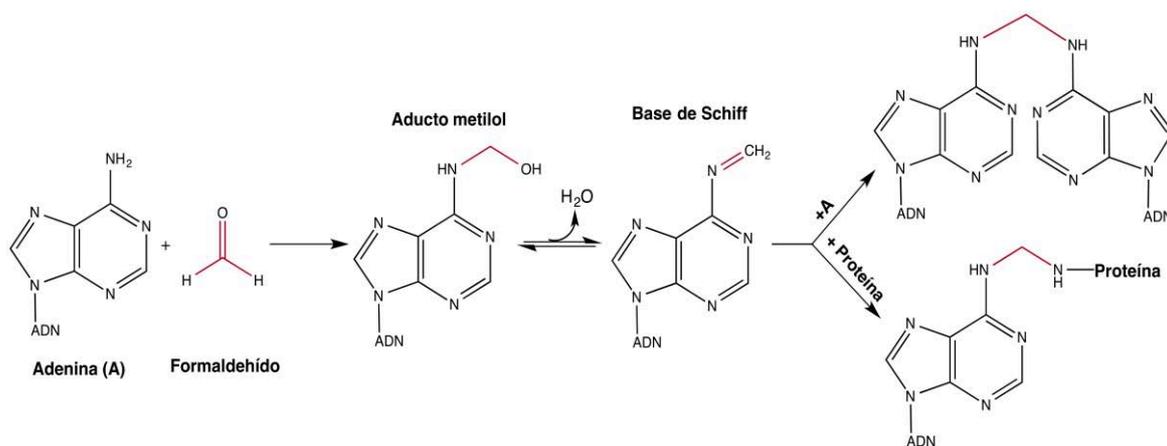


Figura 5. Formación de ICL por formaldehído. Imagen modificada de [5].

1.5.2. Exógenas.

Existe gran número de compuestos que generan ICL, muchos de ellos son frecuentemente empleados para tratamientos médicos como el cisplatino, las mostazas nitrogenadas, la mitomicina C (MMC) y los psoralenos. Aunque todos estos son agentes alquilantes bifuncionales que generan ICL, la estructura del entrecruzamiento del DNA producida difiere dependiendo de la química del compuesto, generando diferentes grados de distorsión de la doble hebra. Además, los compuestos alquilantes no producen sólo ICL, sino también monoadductos, diadductos, enlaces covalentes DNA-proteína, etc. Esto es importante tenerlo en cuenta cuando se selecciona el compuesto a usarse en procesos experimentales, ya que en los casos en los que la alteración estructural es mayor, puede promover la reparación por vías diferentes a la FA/BRCA [53]. La tabla 2 muestra algunas generalidades de agentes bifuncionales comúnmente usados.

Los psoralenos son moléculas tricíclicas que tienen preferencia por secuencias AT y como característica particular, requieren de la foto-activación con luz UVA (320-400nm) para controlar la reacción y formar el ICL [53].

Aunque existen muchos tipos de psoralenos, todos tienen el mismo mecanismo de acción. La formación del ICL requiere de la reacción con dos fotones, el primero soporta la unión entre el anillo furano del psoraleno y la timina, formando un monoadducto que absorbe el segundo fotón y reacciona con la timina de la otra hebra creando el enlace inter hebra (Fig. 6) [53-55]. Cuando la primer ciclo-adición se lleva a cabo entre el anillo pirona del psoraleno y la timina, el monoadducto formado no es capaz de absorber el segundo fotón y por lo tanto no se concluye la reacción. La frecuencia con la que se genera la unión con el anillo furano o pirona depende de las particularidades del anillo central del psoraleno, siendo el 4, 5', 8 trimetil psoraleno (TMP) el psoraleno que forma una mayor cantidad de monoadductos con el furano (98%) [53].

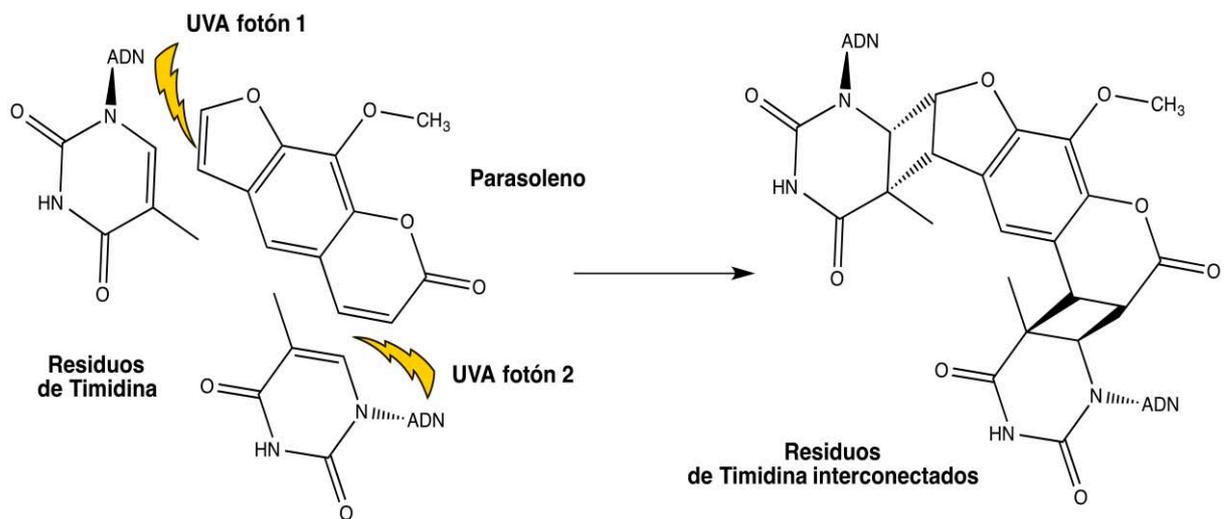


Figura 6. Formación de ICL a partir de psoralenos. Imagen modificada de [54].

Algunos estudios examinados por migración en gel, resonancia nuclear magnética (NMR por sus siglas en inglés) y cristalografía de rayos X han tratado de determinar el grado de distorsión que el DNA sufre tras la formación de ICL a partir de psoralenos, concluyendo que ésta depende de la secuencia donde se realiza el entrecruzamiento, en la cual las secuencias menos estables son sujetas a mayor deformación (aprox. 28°) [3, 53].

Tabla 2. Generalidades de agentes inductores de ICLs

Compuesto	Uso	Tipo de reacción	Bases con las que preferentemente reacciona para formar ICL	Porcentaje de ICL creados	*Distorsión hebra	Referencia
Cisplatino	Antineoplásico en cáncer testicular y ovario	Desplazamiento de dos iones cloruro	Guaninas en secuencia 5'GC	Enlaces intra-hebra: GpG 65% y ApG 25% ICL 8%	45-80°	[3, 53]
Mostazas nitrogenadas	Antineoplásicos en linfoma, mieloma múltiple, melanoma, etc	Desplazamiento de dos iones cloruro	Guaninas en secuencia 5'GNC	90-95% monoadducto 5% ICL	12.4-16.8°	[3, 53]
Mitomicina C	Antineoplásico en cáncer esofágico y de vejiga	Reacción de reducción	Guaninas en secuencia 5'CG	10% ICL	Mínima-14.6°	[3, 53]
Psoralenos	Linfoma cutáneo de células T	Fotoactivación	Timinas secuencias 5'TA y 5'AT	Depende del psoraleno: TMP 98% ICL 8-MOP 80% ICL	Mínima-25°	[3, 53]

*La distorsión generada en la estructura del DNA es menor cuando el DNA se encuentra superenrollado y mayor cuando está desenrollado.

1.6. La anemia de Fanconi como modelo de estudio y sus limitantes.

La complejidad de la vía FA/BRCA y de la consecuente inactivación de ésta, han situado a la anemia de Fanconi AF como un buen modelo de estudio para tratar de esclarecer con detalle el funcionamiento y coordinación de la respuesta al daño al DNA DDR y la reparación de ICL. Además, su participación en la estabilidad genómica y la tumorigénesis han ayudado a entender mejor algunos aspectos del cáncer [14].

Es importante tener en cuenta las limitantes de los modelos en los que los resultados reportados han sido obtenidos al momento de querer equiparar lo que se observa con lo que realmente sucede en un individuo. La inmortalización de células provenientes de pacientes con anemia de Fanconi permite tener un modelo sobre el cual trabajar *in vitro*, sin embargo, la transformación realizada para inmortalizar las células implica la pérdida de especificidad y relevancia fisiológica. Otro sistema *in vitro* que ha sido muy útil en el estudio molecular de la bioquímica de los pasos en la reparación de ICL en las horquillas de replicación es el que utiliza

extractos de *Xenopus*, obteniéndose información muy importante, pero con la limitante de ser una especie diferente a la del ser humano [14].

Los modelos murinos en los que se inactiva la vía han sido un intento por escalar los resultados, sin embargo, la mayor limitante que presentan los ratones a los que se les ha inactivado la vía, como ya se mencionó previamente, es que no presentan el fenotipo completo de la enfermedad [14].

2. Cromatina

El núcleo de una célula humana contiene aproximadamente 3 mil millones de pares de bases de DNA distribuidas y organizadas en 23 pares de cromosomas [56]. El almacenamiento de esta información es sumamente complejo ya que debe cumplir con dos funciones fundamentales; por un lado guardar los 3×10^9 pares de bases dentro del núcleo, lo que implica acomodar una molécula cuya longitud lineal se estima en 2 metros dentro de una estructura cuyo diámetro promedio es de 5-10 μm , al tiempo que mantiene la accesibilidad de la información de manera estrictamente regulada y dinámica, permitiendo a la célula llevar a cabo funciones especializadas (replicación, transcripción, reparación, etc.) y respuesta rápida a cambios ambientales [56, 57]

La compactación y organización del DNA dentro del núcleo sucede gracias a su asociación con proteínas en una estructura llamada cromatina, cuya unidad funcional es el nucleosoma. Cada nucleosoma está formado por ocho proteínas básicas llamadas histonas (dos copias de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4), las cuales por afinidad de cargas se unen fuertemente al DNA [56, 58].

Las 8 histonas se organizan en un tetrámero compuesto por dos dímeros de las histonas H3-H4, flanqueado por dos dímeros separados de las histonas H2A-H2B para formar la parte central del nucleosoma [59, 60]. Este funciona como un carrete de hilo alrededor del cual, 146 pares de bases se “enredan” dando aproximadamente 1.7 vueltas al cilindro formado por histonas [61, 62]. Los nucleosomas se enlazan unos con otros a través 20 pares de bases de DNA conector en una estructura parecida a un collar de perlas llamada fibra de 11nm, siendo este éste el primer nivel de compactación de la cromatina [57, 63]. Los siguientes niveles de compactación (fibra de 30, 300, 700 nm) son consecuencia de la interacción de esta estructura con otras proteínas, como las histonas H1 y H5 [58, 63].

La estructura dinámica de la cromatina no solo depende de la asociación DNA-histonas, en esto también intervienen elementos reguladores de la cromatina, como las enzimas modificadoras de DNA e histonas, los factores remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, las chaperonas de histonas, RNAs no codificantes etc., que interactúan con los nucleosomas para establecer arreglos con significado funcional de tal suerte que la célula pueda sobrevivir y ser funcional [64]. La interacción armónica de estos componentes establece un lenguaje complejo que aún no se comprende cabalmente, pero es evidente que la perturbación de alguno de los elementos puede interferir con el destino de la célula. La relación entre cromatina y sus modificadores en procesos vitales como la respuesta al daño al DNA ha sido objeto de estudio de muchos grupos que poco a poco han aportando piezas que permiten comprender mejor el funcionamiento de este proceso vital.

Durante la respuesta al daño al DNA, es indispensable la remodelación de la cromatina en la zona de daño para permitir el acceso a los factores de reparación. Las modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés) de histonas, el intercambio de histonas y la participación de complejos remodeladores son algunos de los elementos que permiten crear el entorno adecuado para que se lleve a cabo la reparación del DNA [65].

2.1. Las histonas

Las histonas son pequeñas proteínas básicas cuya secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada desde levaduras hasta humanos, por lo que se cree, han evolucionado de una proteína ancestral común [56, 66]. Además de compartir similitudes en su composición, se ha descrito que estas proteínas participan de funciones críticas parecidas en estos organismo, como es la regulación transcripcional [66].

Las histonas adoptan una forma primordialmente globular de la que protruyen dos estructuras de aproximadamente 40 aminoácidos que corresponden a los extremos carboxilo y amino terminal [59, 64]. Los extremos carboxilo y amino representan 38% de la masa de las histonas y son ricas en residuos básicos, que pueden ser modificados por enzimas específicas y que constituyen una plataforma flexible y dinámica para la regulación de la cromatina [56, 60, 64, 67]. A estas modificaciones químicas se les conoce como modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés).

Hasta el momento se han descrito un sin número de PTMs con diferentes funciones en los extremos amino y carboxilo terminales de las histonas que incluyen la acetilación de lisinas, metilación de lisinas y argininas, fosforilación de serinas, teroninas y tirosinas, sumoilación de lisinas, ubiquitinación de lisinas, glicosilación de serinas y treoninas, ADP-ribosilación de lisinas, crotonilación de lisinas, entre otras (la tabla 3 resume algunas de las modificaciones más comunes y las funciones a las que se les ha asociado) [56, 68]. La mayoría de estas PTM se encuentran tanto en los dominios de los extremos N-terminal, como en los C-terminal, aunque, cabe aclarar que también se han descrito algunas en los dominios globulares que regulan las interacciones histona-histona e histona-DNA [68]. En la tabla 3 se resumen algunas de las modificaciones más comunes y las funciones a las que se les ha asociado. Para identificarlas se emplea una nomenclatura mundial que inicia con la histona en la que sucede la modificación abreviada como “H” más el número de la histona (H1, H2A, H2B, H3 o H4), seguido del aminoácido (lisina: K, serina: S; etc.), su ubicación ubicación en la cadena peptídica (iniciando la numeración por el extremo amino terminal) y el tipo de modificación química presente (metilación: me; acetilación: ac; fosforilación: p; etc.).

Tabla 3. Resumen de algunas PTM a las que se les ha asociado función.

PTM	Función asociada
H3K4ac	Activación transcripcional
H3K9ac	Activación transcripcional
H3K9me3	Represión transcripcional, heterocromatina constitutiva
H3S10p	Mitosis, activación transcripcional
H4K5ac	Activación transcripcional, reparación DNA
H4K12ac	Silenciamiento de telómeros, reparación DNA, activación transcripcional
H4K16ac	Eucromatina
H2AS139p	Reparación de DNA
H2BS10p	Apoptosis

Se ha identificado que el significado funcional de las PTM no radica únicamente en la modificación química, sino que engloba la maquinaria que incorpora o

“escribe” la PTM, la identifica y se une a ella o la “lee”, y la que la remueve o “borra”, por lo que comprender la interacción entre las PTM y las proteínas que las escriben, leen y borran se vuelve indispensable para percibir su funcionamiento en la regulación de la cromatina [68]. Existen cuatro grandes grupos de sistemas enzimáticos que catalizan la escritura de PTMs: las acetil transferasas de histonas (HAT por sus siglas en inglés), las cinasas, las proteína metiltransferasas de arginina (PRMT por sus siglas en inglés) y las lisina metiltransferasas (KMT). Estos complejos, al igual que su contraparte (los borradores) actúan sobre su blanco con alta especificidad en el número de residuo y el contexto celular [56].

Con frecuencia, las modificaciones de las histonas no funcionan de forma aislada, su establecimiento y función requiere de la presencia o ausencia de otras PTMs [56]. Esto ha dado pie a la formulación de una hipótesis que propone la existencia de un código de histonas en el que PTM pueden influenciar otras PTM de forma sinérgica o antagónica generando ambientes que establezcan procesos específicos como la progresión del ciclo celular, la replicación del DNA, la reparación del DNA, etc. [60]. Hasta el momento se han descrito algunos ejemplos que apoyan la existencia de éste código, siendo el más característico el representado en la región amino terminal de la histona H3, donde la fosforilación de la serina 10 (S10) evita la metilación de la lisina 9 (K9) y junto con la acetilación de las lisinas 14 y 9 definen zonas transcripcionalmente activas [60]. Un ejemplo de código de histonas en la reparación del DSB identifica a las PTM H4K20me2, H2AK15ub y H4K16ac como participantes fundamentales en la selección de vía de reparación de estas lesiones por NHEJ o HR, este se explica a detalle más adelante [69].

3. Reparación de DSB por NHEJ o HR.

Las DSB son rupturas que pueden ser producto de eventos celulares programados (como la recombinación V(D)J durante la maduración de linfocitos T y B, donde son parte de un proceso necesario para generar variedad) u ocasionadas por la interacción del DNA con el ambiente como los productos del metabolismo oxidante, la radiación, el colapso de las horquillas de replicación, etc.[70]. De cualquier manera, sin importar que la etiología sea programada o accidental, las DSB deben ser reparadas, ya que no hacerlo puede derivar en muerte celular o en el crecimiento desregulado y el desarrollo de cáncer [70, 71]. Durante la reparación de

las DSB la cromatina adyacente al sitio del rompimiento sufre cambios que son integrales con la respuesta al daño al DNA (DDR por sus siglas en inglés) que señalizan, promueven el control de compactación de la cromatina y la unión de moléculas de reparación [70].

Existen dos vías principales de reparación de DSB: la recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Ambas han sido ampliamente estudiadas (sus características principales se encuentran resumidas en la Tabla 4) y, se sabe que la decisión de utilizar una u otra vía depende de la resección de los extremos de la DSB, la HR la promueve mientras que la NHEJ la previene. Esto está fuertemente ligado con la fase del ciclo y se han identificado proteínas clave en el procesamiento de la DSB, entre las que destacan 53BP1 y BRCA1/FANCS [70-72].

Las proteínas 53BP1 y BRCA1/FANCS, en asociación con sus efectoras RIF1 y UHRF1, respectivamente, juegan papeles antagónicos en la resección de los extremos de la DSB y su posicionamiento en la zona de daño es determinante para el favorecimiento de la reparación por NHEJ y HR, respectivamente [72, 73].

Tabla 4. Características generales de la NHEJ y la HR.

NHEJ	HR
Puede participar en la reparación durante cualquier fase del ciclo celular.	Sólo activa durante las fases S y G2 del ciclo celular.
Es una vía propensa a error	Se considera una vía libre de error
Inicia con el reclutamiento de las proteínas Ku70 y Ku80, seguido del procesamiento limitado de los extremos de la DSB por el complejo MRN.	Inicia con el procesamiento de los extremos en dos pasos: MRN y CtIP remueven algunos oligonucleótidos de los extremos de la DSB.
Tras el establecimiento de KU70-80, se reclutan la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs), Artemis (nucleasa) y el complejo ligasa (DNA ligasa IV-XRCC4-XLF) que unen los extremos de la DSB.	El resto de la resección está a cargo de Exo1 y/o BLM y Dna2. Éstas generan trectos extensos de ssDNA que posteriormente serán recubiertos por Rad51 para llevar a cabo la invasión de la hebra que concluye con la reparación por RH.

3.1. *La reparación de DSB en un contexto de cromatina.*

El daño en el DNA ocurre en un contexto de cromatina. Lo que significa que la maquinaria de reparación trabaja en coordinación con la cromatina para poder reparar las DSB. El proceso de reparación lleva al menos cuatro pasos según el modelo de acceso-reparación-restauración: 1) detección del daño en las diferentes estructuras de la cromatina, 2) remodelación de la arquitectura cromatínica para poder acceder al daño, 3) reorganización del molde nucleosoma-DNA para el procesamiento y reparación del daño, y 4) restauración de la organización de la cromatina después de reparar el daño [74].

3.1.1. *Señalización epigenética de DSB.*

La reparación de las DSB se inicia siempre por la detección y señalización del daño. Uno de los primeros eventos en la cascada de señalización es la fosforilación de la serina 139 de la variante de histona H2AX (γ H2AX) [75]. Esta modificación, colocada principalmente por la cinasa ATM es característica de las DSB y se propaga a lo largo de una megabase sobre la cromatina flanqueando el sitio donde se encuentra la ruptura (Tabla 5) [75, 76]. Esta característica ha permitido que la γ H2AX sea considerada como el marcador por excelencia de DSB [76] y, por lo mismo, se utilice con frecuencia para identificar y localizar DSB experimentalmente a través de técnicas como inmunofluorescencia (IF), Western blot (WB por sus siglas en inglés), inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP por sus siglas en inglés), etc [76].

La γ H2AX no solo tiene una función de señalización del daño, sino que también ejerce un papel fundamental en el reclutamiento de factores de reparación que incluyen modificadores de la cromatina. Un ejemplo de esto es el reclutamiento a la zona de daño de la HAT NuA4 que se encarga de agregar grupos acetilos en las histonas favoreciendo la accesibilidad a la lesión. Así mismo, la γ H2AX también sirve como sitio de unión de la proteína MDC1, que a su vez permite el anclaje de proteínas efectoras de la reparación como MRN, BRCA1 y 53BP1 [76].

ATM es la cinasa que se encarga de establecer y propagar la γ H2AX. Para poder ejercer dicha función, ATM debe ser activada por medio de 2 modificaciones postraduccionales secuenciales: una acetilación y una fosforilación. La secuencia de eventos para que esto se lleve a cabo es la siguiente: durante las primeras etapas de

la respuesta al daño por DSB, ATM forma un dímero con la acetil transferasa de lisinas 5 (KAT5 también conocida como TIP60), este heterocomplejo es reclutado a la cromatina dañada por medio del cromodominio de TIP60 que puede unirse a la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3), una marca estructural de heterocromatina constitutiva que se encuentra frecuentemente en la cromatina [76-78]. La interacción TIP60-H3K9me3 promueve la acetilación de ATM por TIP60, esta primera modificación de ATM activa la función cinasa de dicha proteína favoreciendo su autofosforilación. Una vez completada la activación de ATM, la función cinasa de dicha proteína puede ejercerse sobre otros blancos como H2AX, MDC1, NBN, 53BP1, BRCA1, etc. [76, 77].

Existe mucha información acerca de H3K9me3 como marca característica de la heterocromatina constitutiva, pero su papel y regulación durante la reparación de DSB apenas está siendo investigada. Por el momento lo que es evidente es que tiene un papel importante para permitir la adecuada activación de ATM, uno de los primeros eventos en la señalización de daño. En 2014, Ayrapetov y colaboradores, describieron que la inducción de DSB promueve el reclutamiento de la metil transferasa homóloga 1 del supresor de variegación 3-9 (SUV39H1) en complejo con la proteína de unión a heterocromatina 1 (HP1) [78]. SUV39H1 metila a la H3K9, esto facilita la unión del complejo que contiene a HP1-SUV39H1 a la cromatina y promueve la propagación de la marca hasta por 10 kb [78]. En las células donde se eliminó a SUV39H1 se encontraron fallas en la reparación de DSB, incremento a la radiosensibilidad y defectos en la activación de TIP60 y ATM (Tabla 5) [78].

Tabla 5. PTM asociadas a la señalización de DSB

Variante de histona o PTM	Enzima que coloca la PTM	Características	Referencia
γH2AX	ATM/ATR/DNA-PK	Reparación <i>Colocación de la marca:</i> La H2AX es fosforilada por una PIK cinasa y convertida en γH2AX como respuesta celular ante un DSB. <i>Función:</i> Biomarcador de daño celular. Se asocia a regulación de la accesibilidad de la cromatina y el reclutamiento de factores de respuesta al daño del DNA.	[75, 76]
H3K9me3	SUV39H1	Reparación <i>Colocación de la marca:</i> Es establecida por SUV39H1 y leída por HP1 <i>Función:</i> Marca característica de heterocromatina constitutiva. Aunque se asocia con cromatina cerrada, se encuentra distribuida a lo largo del genoma. Existe evidencia de que en DSB la interacción de H3K9me3 y Tip60 activa a ésta última, dando inicio a una cascada de señalización que promueve la fosforilación de ATM y H2AX.	[78, 86]

3.1.2. *Modificaciones epigenéticas que permiten el reclutamiento de efectores de NHEJ y HR*

Las PTM en las histonas pueden impactar tanto en la estructura de la cromatina, alterando la afinidad del core de histonas por el DNA y en consecuencia facilitando la accesibilidad de los participantes durante la reparación, como en el reclutamiento de los factores de reparación como 53BP1 y BRCA1/FANCS [65, 87].

53BP1 contiene un dominio Tudor necesario para que sea reclutado a la cromatina. Este dominio reconoce y se une a la forma dimetilada de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me₂). Esta marca, a diferencia de la γ H2AX, no es exclusiva de reparación y se encuentra presente en más de 80% de los nucleosomas en células asincrónicas, esto implica que la mayoría de los nucleosomas son sitios potenciales de reparación por NHEJ [69]. ¿Entonces por qué las DSB no se reparan siempre por NHEJ? La realidad es que la H4K20me₂ es un requisito para que la unión 53BP1-H4K20me₂ se lleve a cabo, pero no es el único. La regulación de este evento requiere de la accesibilidad de la marca y de la comunicación coordinada de 53BP1 con las maquinarias de acetilación y ubiquitinación en la DSB (Tabla 6)[69].

Existen otras proteínas de unión a H4K20me₂ que compiten con 53BP1 por la incorporación a la cromatina como L3MBTL1 y JMJD2A. En ausencia de daño, éstas proteínas enmascaran la presencia de la marca y disminuyen la probabilidad de que la interacción 53BP1-H4K20me₂ ocurra. Como consecuencia de la activación de la respuesta al daño en el DNA, L3MBTL1 y JMJD2A se remueven en un evento dependiente de ubiquitinación, dejando expuesta la marca. Sin embargo, esto no es suficiente, el establecimiento de la unión estable de 53BP1 con la cromatina requiere la ausencia de la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) y la presencia de la ubiquitinación de la lisina 15 de la histona H2A (H2AK15ub) [69].

La unión 53BP1-H4K20me es necesaria pero no suficiente para la acumulación de 53BP1 en la DSB, se necesita además la ubiquitinación dependiente de daño de la histona H2A (H2AK15ub). 53BP1 interacciona con H2AK15ub a través de un pequeño motivo UDR, localizado junto al dominio Tudor. Para que la unión de 53BP1 a cromatina ocurra, es necesario que el nucleosoma en el que ocurrirá la unión contenga ambas modificaciones (Fig. 7).

Tabla 6. PTM asociadas con el reclutamiento de proteínas asociadas con HR y NHEJ

Variante de histona o PTM	Enzima que coloca la PTM	Características	Referencia
H4K20me2	SUV20H4-1 MMSET	Reparación HR <i>Colocación de la marca:</i> Al término de la mitosis se dimetila la H4K20me. <i>Función:</i> Junto con H2AK15ub, estabiliza la unión de 53BP1 (proteína promotora de reparación celular por NHEJ). No se altera debido a la progresión del ciclo celular ni ante la inducción de daño ya que se encuentra aproximadamente en el 80% de las histonas H4.	[79-81]
H4K16ac	TIP60	Reparación NHEJ <i>Colocación de la marca:</i> Hiperacetilación en respuesta al daño. <i>Función:</i> En sitios de DSB la hiperacetilación de la H4 promueve la HR. Además se ha descrito una asociación negativa entre la presencia de H4K16ac y el reclutamiento de 53BP1, ya que provoca interferencia en la interacción entre esta proteína y la H4K20me2 (la H4K16ac y la H4K20me2 suelen presentarse juntas). La desacetilación de la lisina 16 es necesaria para que la NHEJ se lleve a cabo con éxito.	[82-85]

TIP60 es la HAT responsable de colocar la H4K16ac, una PTM frecuentemente relacionada con la respuesta al daño. La cercanía entre los residuos 16 y 20 en la histona H4 es un inconveniente estérico para el reclutamiento de 53BP1 cuando la lisina 16 (K16) se encuentra acetilada, ya que interfiere directamente con el puente salino que se forma durante la asociación entre 53BP1 y la K20me2 (Tabla 6). Como consecuencia, la asociación estable de 53BP1 con la cromatina metilada requiere también de la participación de las desacetilasas de histonas HDAC1 y HDAC2. La acetilación y desacetilación dinámica sobre la H4K16 en las DSB contribuye a la elección de vía de reparación, al regular el balance entre la asociación de 53BP1 y BRCA1 con la cromatina (Fig. 7) [69].

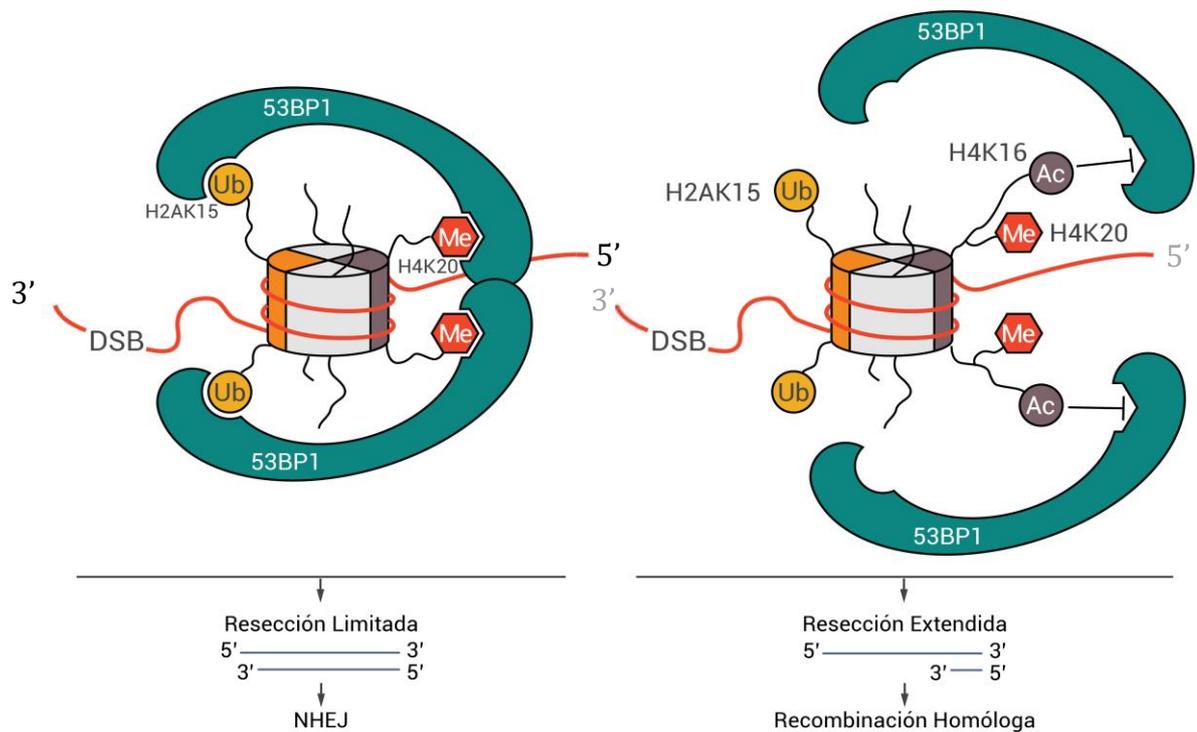


Figura 7 Relación antagonista de 53BP1 y BRCA durante la reparación de DSB en un contexto de cromatina. Imagen modificada de [69]

A pesar de que desde hace muchos años se sabe que en las células con AF la reparación de la DSB intermediaria en la reparación de ICL no se repara por la HR, no existe información sobre las marcas epigenéticas en la ruptura. De acuerdo con la información previamente presentada es probable que las DSB intermediarias en la reparación de ICL en las células normales y las células AF tengan marcas epigenéticas diferentes. Esta hipótesis se apoya con el reporte reciente que describe la acumulación de 53BP1 en células deficientes en proteínas del *core* o FANCD2 debido a la falla en la retención de la acetil transferasa TIP60, enzima clave en la respuesta al daño. Como consecuencia se observó hipoacetilación de la cromatina, especialmente de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) y se propuso a FANCD2-Ub como el mediador clave entre la K16 y TIP60 [4]. Este primer reporte permite suponer que las DSB producto de la reparación de ICL están siendo marcados epigenéticamente diferente en las células con AF, comparado con las células con la vía FA/BRCA íntegra, y esto podría estar afectando la decisión de la vía de reparación que se va a emplear para reparar la lesión.

OBJETIVO

Comparar el patrón de las modificaciones postraduccionales de histonas relacionadas con reparación de DSB (γ H2AX, H3K9me3, H4K16ac, H4K20me2) entre células HEK *FANCA*^{-/-} y células HEK con la vía de reparación FA/BRCA íntegra en respuesta a rupturas de doble hebra producto del procesamiento de enlaces covalentes cruzados.

ANTECEDENTES

Durante muchos años, el laboratorio de citogenética del INP ha sido el centro de referencia nacional para el diagnóstico de anemia de Fanconi, lo que ha incentivado el estudio de la vía FA/BRCA y su regulación, así como aspectos clínicos de la enfermedad. La complejidad de la vía de reparación FA/BRCA y su inactivación ha llevado a dirigir la atención del laboratorio a buscar entender el funcionamiento de la vía desde diferentes enfoques.

La participación de la epigenética en la vía FA/BRCA, a pesar de ser un componente central durante la reparación, no ha sido abordada, por lo que surge el interés de hacer una primera aproximación a partir de este trabajo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron las células HEK293 WT y células HEK293 con el gen *FANCA* editado mediante CRISPR/CAS9 para tener un modelo de células AF y su contrapartida WT isogénica

La inducción de ICL se realizó utilizando el tratamiento de TMP+UVA, debido a que es el agente alquilante bifuncional reportado que genera la mayor proporción de ICL (98%). Se buscaron PTM de histonas relacionadas con la señalización de DSB (γ H2AX, H3K9me3) y asociadas a la reparación de estas lesiones por HR (H4K16ac) o NHEJ (H4K20me2).

Para la identificación de PTM se utilizó inmunolocalización porque permite analizar la distribución de las marcas en la ruptura.

Finalmente se analizaron los resultados mediante las pruebas de Ji cuadrada y la prueba de Kruskal-Wallis.

METODOLOGÍA

1. Cultivos celulares

Se realizaron cultivos de la línea celular embrionaria de riñón HEK293 silvestre (HEK293 WT) y su isogénica *Knock Out* de *FANCA* (HEK293 *FANCA*^{-/-}). Los cultivos se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado (10%), L-glutamina (1%), piruvato de sodio (1%), aminoácidos no esenciales (1%) y gentamicina (0.5%). Se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.

2. Generación línea celular HEK293 FANCA^{-/-}.

La generación de la línea celular HEK293 *FANCA*^{-/-} se realizó a través de transfección del sistema comercial de “CRISPR/Cas9 doble nickasa” (Santa Cruz, cat. sc-403205) contra el exón 4 del gen *FANCA* en células HEK293.

Se sembraron 0.2x10⁶ células en un pozo de 9.5 cm² de área un día antes de la transfección para permitir la adhesión de las células al fondo del pozo. Previo a la adición del plásmido, las células se lavaron con PBS y se dejaron en 700 µL de medio Opti-Mem. Se mezcló 1 µg del plásmido en 300 µL de medio Opti-Mem con 12 µL de lipofectamina y 5 minutos después, se goteó sobre las células tratando de abarcar toda el área en el proceso. La transfección duró 18 h y concluido este tiempo, las células se lavaron y se dejaron en incubación con medio RPMI durante 48 h.

El plásmido contiene un casete de resistencia a puromicina, por lo que, para la selección, el cultivo se incubó en medio RPMI suplementado con puromicina 3 µg/µL durante 5 días. Concluido este periodo, las células supervivientes se cultivaron en medio RPMI suplementado libre de antibiótico. Veinte días después de la transfección, se realizó un ensayo para seleccionar colonias provenientes de una sola célula, se expandieron y se corroboró el fenotipo celular Fanconi por análisis de ciclo celular, WB contra *FANCA* y ensayo de aberraciones cromosómicas.

3. Tratamiento con mitomicina C (MMC)

El tratamiento con mitomicina C se llevó a cabo en los experimentos de análisis de ciclo celular y el ensayo de aberraciones cromosómicas. El tratamiento consta de la exposición continua a 4ng/mL de MMC por 48 horas .

4. *Análisis de ciclo celular*

Para el análisis de ciclo celular, se sembraron por duplicado 0.5×10^6 células HEK293 WT y HEK293 transfectadas. Posterior a la adhesión de las células a la base del pozo, se agregó MMC a uno de los pozos de cada línea celular. Concluido el tratamiento, se despegaron las células, se fijaron con etanol helado al 70% y se almacenaron a -20°C . 2 horas antes de la adquisición, las células fueron lavadas con PBS y teñidas con DAPI (0.1%).

La adquisición se llevó a cabo en un clitómetro Attune azul-violeta (Life technologies). Se adquirieron un total de 20,000 eventos por experimento y se analizaron con el software FlowJo® versión 10 (<https://www.flowjo.com/>).

5. *Western Blot.*

Se extrajo proteína de las células HEK293 WT y HEK293 transfectadas en $200\mu\text{L}$ de TLB más inhibidores de proteasas y se almacenaron a -70°C . Previo a la electroforesis se cuantificó por el método de Bradford la cantidad de proteína extraída y se calculó el volumen requerido para tener $5\mu\text{g}$ de proteínas.

Se mezclaron los $5\mu\text{g}$ de proteína con el amortiguador de carga (40% glicerol, 240 mM tris/HCl, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol, 5% beta-mercaptoetanol), se incubaron en condiciones desnaturalizantes (10 min/ 90°C) y se cargaron en un gel al 10% de acrilamida – bisacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 90 min. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en húmedo y frío a 250 V durante 2 horas.

La transferencia se corroboró al teñir la membrana con rojo Ponceau. Tras la eliminación del colorante de la membrana por lavados con agua, se llevó a cabo el bloqueo (leche al 5% en TBS-T) por 1 hora en agitación a temperatura ambiente, seguido de la incubación del anticuerpo anti FANCA (1:3,000) a 4°C durante toda la noche en agitación.

Al día siguiente, se recuperó y guardó el anticuerpo primario, a la membrana se le realizaron un ciclo de 3 lavados con TBS-T (10 min cada uno). Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente en movimiento. Finalmente, la membrana se reveló con el agente de detección ECL exponiéndola a una película para rayos X. Se utilizó a la tubulina como testigo de carga.

6. *Ensayo de aberraciones cromosómicas.*

Una hora previa a que concluyera el tratamiento con MMC, se añadió al medio de crecimiento, colchicina a una concentración final de 0.1 µg/mL. Concluido el tiempo, las células se levantaron y trataron con solución hipotónica durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se fijaron con solución de Carnoy (metanol:ácido acético 3:1). Se prepararon laminillas y se cuantificó la cantidad de rupturas cromosómicas y figuras radiales.

7. *Tratamiento TMP-UVA.*

A células previamente sembradas en cajas Petri o cajas de 6, 12 o 24 pozos (no botellas de cultivo, ya que es importante que no haya elementos que alteren el paso de la luz UVA), se les añadió una solución 55.3 µM de TMP, se incubó durante 4 min a 37 °C. La formación de los ICL en el DNA se indujo exponiendo las células a 3.6 kJm⁻² de luz UVA (365 nm de longitud de onda).

8. *Citometría de flujo*

Para evaluar la presencia de DSB consecuencia del procesamiento de los ICL ocasionados por el tratamiento TMP-UVA y a la exposición de las células a los testigos experimentales (vehículo del TMP (etanol), TMP (sin fotoactivación) y luz UVA (en ausencia de TMP)). Se evaluó la presencia de la fosforilación de la serina 139 de la histona H2AX (γH2AX) por citometría de flujo. Quince minutos después de haber sido tratadas, las células se levantaron y fijaron con CytoFix CytoPerm (BD) durante 30 minutos, posteriormente, se lavaron con PermWash buffer (BD). Para la permeabilización del núcleo, se incubaron durante 10 minutos con CytoFix CytoPerm Plus y se lavaron nuevamente con PermWash buffer. La incubación del anticuerpo anti-gamma H2AX (marcado con el fluorocromo APC) se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 40 minutos.

Los experimentos fueron realizados en un citómetro Attune azul-rojo. Se adquirieron un total de 20,000 eventos por experimento y se analizaron en el software FlowJo ® versión 10 (<https://www.flowjo.com/>).

9. *Inmunofluorescencias.*

Se sembraron 8,000 células de cada tipo celular en 6 cubreobjetos de 12 mm de diámetro y 3 de éstos se trataron con TMP+UVA. Al grupo sin tratamiento (los tres sobrantes) en lugar de TMP se le colocó PBS 1X durante todo el tratamiento y se colocaron fuera del alcance de la luz UVA.

Concluido el tratamiento, se lavaron gentilmente las células y se les añadió (gota a gota sobre el cubreobjetos) una solución helada de etanol 70%-glicina 30 mM y se incubaron durante 20 min a -20 °C. Se lavaron tres veces con PBS y se repitió la fijación, cambiando la solución de etanol-glicina por metanol:acetona (1:1). Se repitió el ciclo de lavado y las células se permeabilizaron con PBS-Tritón 2% durante 20 minutos. Previo a la incubación de los anticuerpos primarios, las células se lavaron tres veces con PBS.

Los anticuerpos contra las marcas γ H2AX (Biorbit cat orb195374), H3K9me3 (Abcam cat, ab6001), H4K16ac (Diagenode, cat c15410300) y H4K20me2 (Genetex, cat. GTX48878) se diluyeron (1:50, 1:20, 1:30 y 1:40, respectivamente) en PBS-SFB 1%, se añadieron a los cubreobjetos y se incubaron durante 20 h a 4 °C. Las células se lavaron tres veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 90 min a 37 °C. El ciclo de lavados se repitió y los cubreobjetos se colocaron con Vectashield® (Vector laboratorios) sin DAPI sobre un portaobjetos (las células de cara al portaobjetos). Los anticuerpos secundarios utilizados para identificar la γ H2AX, H3K9me3, H4K16ac y H4K20me2 fueron FITC Anti-Chicken (Novex, cat A16055), Texas Red Anti-Mouse (Molecular Probes, Cat. T6390), Pacific Blue Anti-Rabbit (Molecular Probes, Cat. P10994) y Alexa Fluor 647 Anti-Rat (Molecular Probes, Cat. A21472), respectivamente.

El análisis al microscopio de las inmunofluorescencias se realizó, con el objetivo de 100X en un microscopio Carl Zeiss Axio Imager Z1, bajo los siguientes criterios: células positivas a la histona γ H2AX, no amontonadas, con señal de los fluorocromos dentro del núcleo.

10. *Análisis de inmunofluorescencias.*

De cada campo en el que había una o más células con foci positivos para la γ H2AX se capturaron imágenes independientes con los filtros respectivos para ver cada uno

de los fluorocromos y con contraste de fases. Se identificaron con un número de foto y la PTM marcada con el fluorocromo correspondiente (ej. 1123 γ H2AX FITC, así para cada uno de los fluorocromos). De cada cubreobjeto se analizaron aproximadamente 75 células.

Las imágenes se analizaron en el programa ZEN2012 (blue edition, Carl Zeiss), donde se abrieron las 5 imágenes correspondientes a cada campo capturado y se creó un archivo en el que se empalmaron todas las señales. El programa permite observar en la pantalla todos los canales por separado y el *merge* o empalme (Fig. 8A). Además, es posible hacer zoom al mismo tiempo en todas las imágenes lo que permitió acercamientos a cada una de las DSB (reconocidos como foci positivos para la γ H2AX) para identificar la combinación de marcas presentes sobre dicho foci (Fig. 8B).

Según la presencia/ausencia de PTM evaluadas en el foci de la γ H2AX, una DSB podía catalogarse en alguno de los siguientes grupos:

- γ H2AX: cuando no había ninguna otra señal sobre la DSB.
- γ H2AX- H3K9me3.
- γ H2AX- H4K20me2.
- γ H2AX- H3K9me3- H4K20me2.
- γ H2AX- H4K16ac.
- γ H2AX- H3K9me3- H4K16ac.
- γ H2AX -H4K20me2-H4K16ac
- γ H2AX- H3K9me3-H4K20me2-H4K16ac.

Al finalizar el conteo, se construyó una base de datos en la que se capturó siguiente la información: el número de la foto, el número de la célula dentro de la foto (en caso de haber más de una célula con foci positivo para la γ H2AX) y el número de foci positivos para cada combinación (Tabla 7A). Este análisis se repitió en cada una de las células de los tres cubreobjetos evaluados para cada condición. Se calculó el número de DSB por célula en cada una de las condiciones y el de las DSB que fueron señalizadas por la combinación de PTM γ H2AX -H3K9me3.

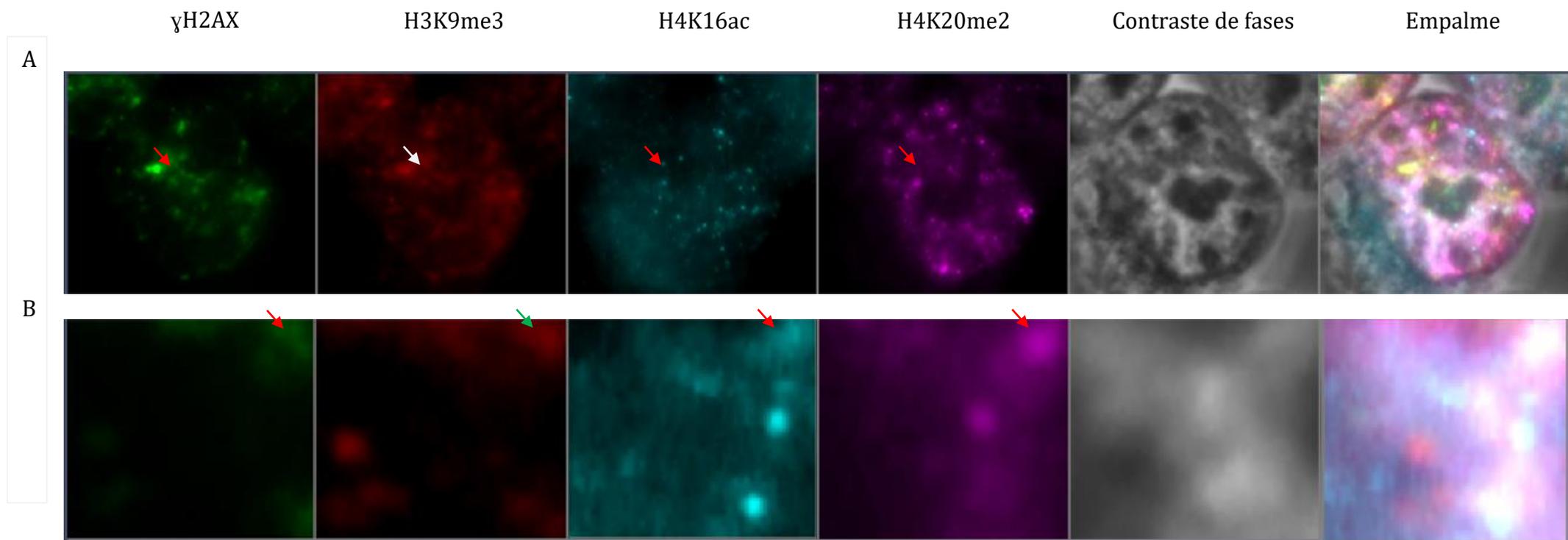


Figura 8. Ejemplo de cómo se llevó a cabo el análisis de las imágenes.

A) Se muestra las imágenes obtenidas de los diferentes filtros utilizados de una célula HEK293 *FANCA*^{-/-}, se señala con una flecha el focus hacia donde se hará el acercamiento para el análisis. B) Acercamiento de la zona señalada con la flecha. Se coloca el focus por analizar cerca de la esquina superior derecha para poder identificar las marcas presentes en esa zona. Se puede ver que todas las marcas colocalizan en este focus. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo 100X, se utilizó un microscopio Carl Zeiss Axio Imager Z1

Para la interpretación de los datos relacionados con el reclutamiento de proteínas efectoras se señalaron con verde las combinaciones de PTM favorecedoras de la NHEJ (γ H2AX-H4K20me2, γ H2AX-H3K9me3-H4K20me2) y las combinaciones que facilitan la reparación por HR (γ H2AX-H4K16ac, γ H2AX-H3K9me3-H4K16ac, γ H2AX-H4K20me2-H4K16ac, γ H2AX-H3K9me3-H4K20me2-H4K16ac) con azul. Con estos datos se clasificó a cada célula según la presencia/ausencia de las combinaciones de PTM relacionadas con la NHEJ y/o con la HR sobre la DSB en:

- Células con PTM que favorecen a la NHEJ (+NHEJ).
- Células con PTM que favorecen a la HR (+HR).
- Células en las que se identificaron foci con combinación de PTM que favorecen a la NHEJ + foci que favorecen a la HR (+mixta).

Se calculó el porcentaje de células en las que se encontró cada una de estas cuatro categorías y para el caso de las células de la categoría mixta, se identificó si existía predominio de combinaciones de PTM asociadas con NHEJ o HR y, de hallarse, se marcaron con anaranjado (Tabla 7B), se contaron y analizaron.

1. *Análisis estadístico*

Se utilizó la prueba D' Angostino-Pearson para analizar y determinar si los datos seguían una tendencia normal. Los datos obtenidos de número de foci por célula se compararon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn en el programa GraphPad Prism 7. Se usó la prueba Ji cuadrada para comparar el número de células con PTM asociadas sólo a HR, NHEJ o ambas (mix), y en el foci mixto el número de células con los diferentes predominios empleando la página <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>. La diferencia fue considerada significativa si $p < 0.05$.

Tabla 7. Ejemplo base de datos.

Ejemplo de cómo se colocaron los datos colectados de las imágenes en una base de datos para su posterior análisis.

A

Número de Foto	Célula en la foto	Total foci γ H2AX	Total foci γ H2AX-H3K9me3	Total foci γ H2AX-H4K20me2	Total foci γ H2AX-H3K9me3-H4K20me2	Total foci γ H2AX-H4K16ac	Total foci γ H2AX-H3K9me3-H4K16ac	Total foci γ H2AX-H3K16ac-H4K20me2	Total foci γ H2AX-H3K9me3-H4K16ac-H4K20me2
1951	1	7	5	1	0	0	0	0	0
	2	25	16	0	0	1	1	0	0
1956	2	9	3	0	3	0	1	0	0

B

Número de Foto	Célula en la foto	+ NHEJ		+ HR		mixta		
		¿pertenece a la categoría? Sí (1) No (0)	Total foci	¿pertenece a la categoría? Sí (1) No (0)	Total foci	¿pertenece a la categoría? Sí (1) No (0)	Total foci HR	Total foci NHEJ
1951	1	1	1	0	0,00	0	0	0
	2	0	0	1	2,00	0	0	0
1956	2	0	0	0	0,00	1	1	3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de línea celular HEK293 FANCA^{-/-}

De las células transfectadas y seleccionadas se eligieron y expandieron tres colonias provenientes de una célula única. De estas, la línea etiquetada como HEK293p2.1 mostró arresto en la fase del ciclo celular G2, incremento de aberraciones cromosómicas ante el reto con MMC y ausencia de la proteína FANCA corroborando el fenotipo celular característico de las células Fanconi (Fig. 9). A esta línea celular se le llamó: HEK293 FANCA^{-/-}.

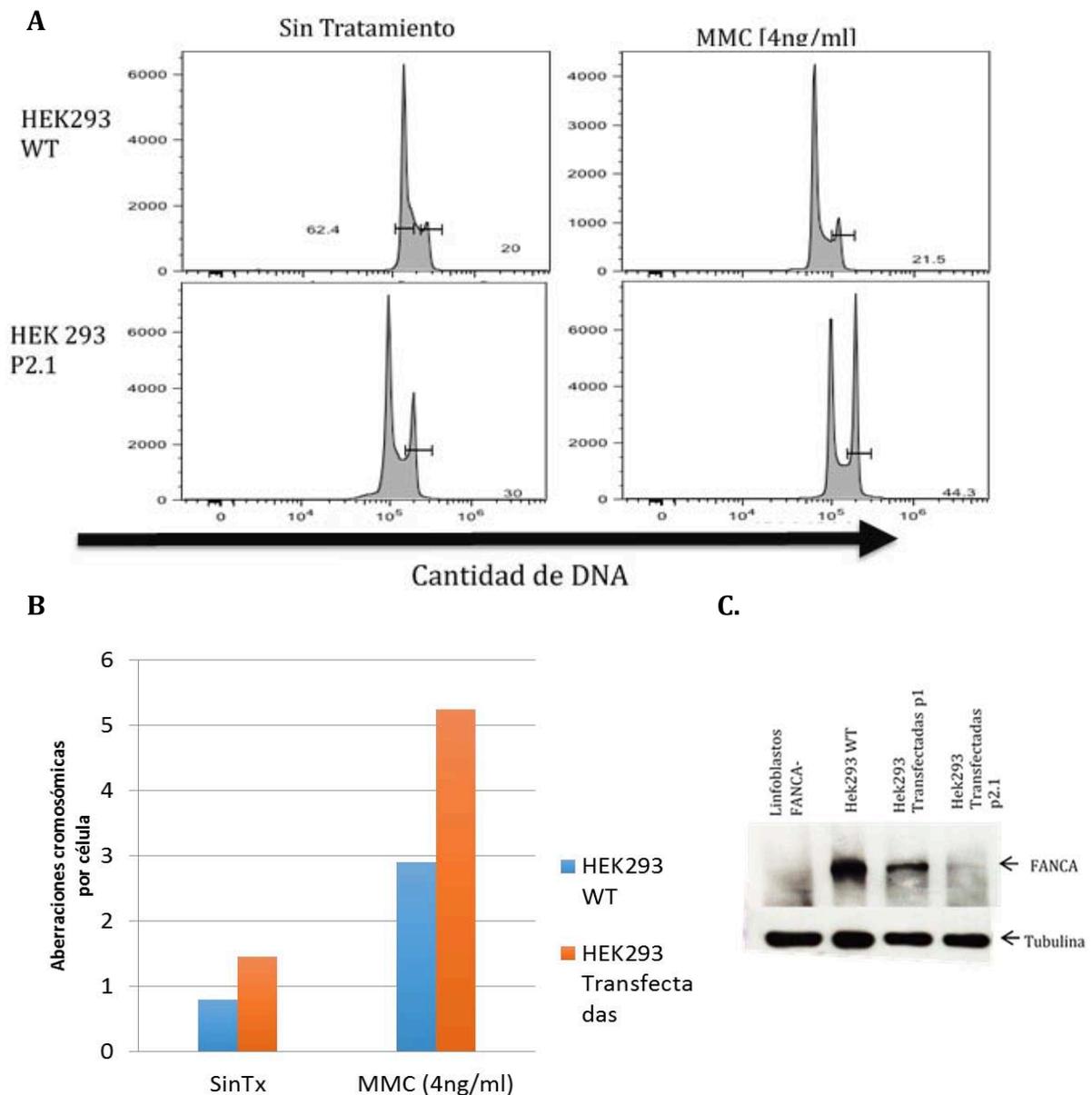


Figura 9. Corroboración fenotipo celular Fanconi en las células transfectadas

a.) Histogramas resultados de la citometría de flujo, la cantidad de DNA, en el eje de las abscisas. El primer pico representa las células en fase G1 (1N dosis de DNA), mientras que el segundo representa las células en G2/M (células con 2N de dosis de DNA). El eje de las ordenadas representa el número de células registradas. b) Número de aberraciones cromosómicas por célula en células HEK293 WT y transfectadas con y sin tratamiento con MMC. c) Western blot realizado contra la proteína FANCA.

2. *Se pueden detectar DSB en la mayoría de las células 15min después del tratamiento con TMP+UVA.*

La citometría de flujo confirmó la presencia de DSB en 63.81% de las células HEK293 WT 15 minutos después de haber sido tratadas con TMP-UVA, mientras que las células sin tratamiento, el testigo del vehículo (etanol), TMP y UVA, el porcentaje de células positivas para la γ H2AX fue de 10.3%, 0.81%, 1.67% y 2.24%, respectivamente. Este último resultado confirma que 15 min es suficiente tiempo para obtener DSB y que las rupturas son causadas por el tratamiento conjunto de TMP+UVA.

3. *El número de foci de la γ H2AX y γ H2AX-H3K9me3 por célula es el mismo en las células WT y FANCA^{-/-}.*

La γ H2AX se ha caracterizado como la marca asociada a DSB por excelencia y a diferencia de la H3K9me3, sólo está presente en este tipo de lesiones. No se encontraron diferencias en el número de foci positivos para γ H2AX por célula asociada a la funcionalidad de la vía FA/BRCA o al tratamiento con TMP+UVA (Fig. 10A). Como se demostró anteriormente, el número de células con presencia de γ H2AX incrementó más del 50% tras el tratamiento, por lo que es probable que el tipo de lesión que se está induciendo (ICL) no provoca la ruptura inmediata, como sucede por ejemplo con la radiación ionizante; en este caso, hay que esperar a que el ICL se detecte y se procese para que se generen las DSB [53]. Los ICL formados en sitios cercanos a donde se está llevando la replicación serán reconocidos y procesados rápidamente y se incrementará el número de células con DSB, mientras que los ICL formados en zonas no activas en replicación, se traducirán en rupturas tardíamente.

Como se explicó previamente, la H3K9me3, es una marca característica de heterocromatina constitutiva que se ubica principalmente en periferia nuclear y nucleolar, sin embargo en el contexto de daño en el DNA, de acuerdo con lo publicado por el grupo de B. D. Price [78, 86], la presencia de la H3K9me3 en las DSB, además de facilitar la acetilación y activación de ATM y de la H4K16ac [86], promueve la formación de un templete cromatínico crítico para establecimiento de la maquinaria de reparación [78]. En los experimentos del presente trabajo se observó que la combinación de PTM percibida en la mayoría de los foci marcados

con la γ H2AX en todas las células (independientemente de la condición experimental), fue la compuesta por la γ H2AX-H3K9me3 sin importar que la ruptura se localizara fuera de zonas ricas en heterocromatina (Figs. 10 A y B). Además, en todos los casos de colocalización de la γ H2AX con alguna de las otras PTM (H4K20me2 y/o H4K16ac) se notó la presencia de la H3K9me3. Esto refuerza la importancia de la H3K9me3 durante el procesamiento de las DSB y dado que coexiste con marcas tanto de HR como de NHEJ, parece no tener un papel en la selección de la vía que será empleada por la célula para reparar la lesión, sino cumplir una función más arriba en la vía, probablemente en la señalización de la lesión.

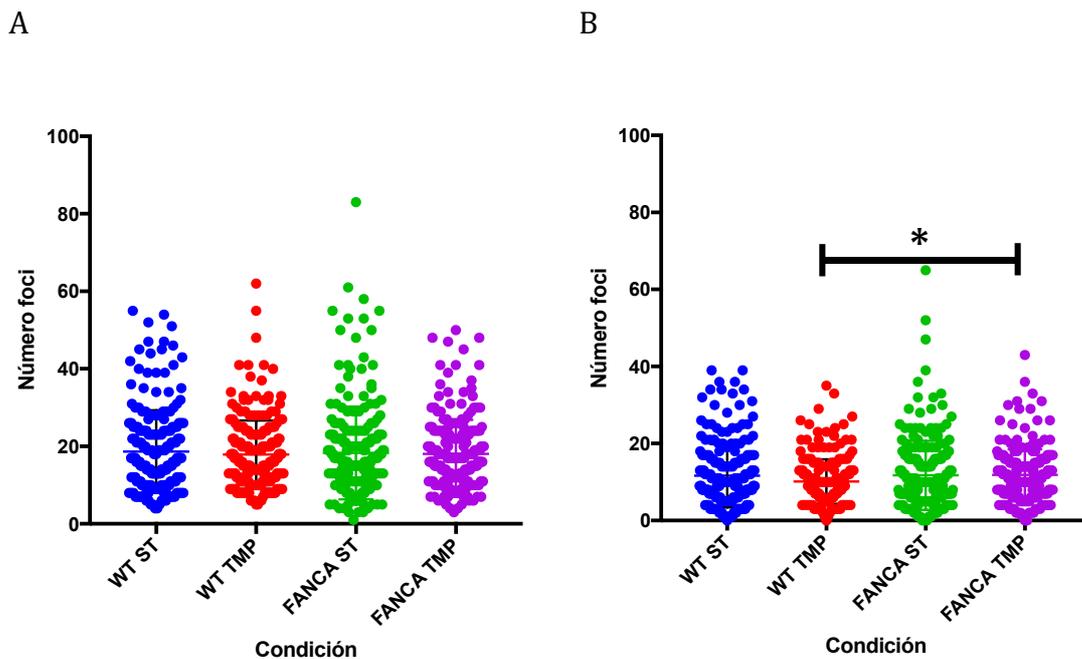


Figura 10. La señalización de DSB por las PTM A) γ H2AX y la B) H3K9me3 no varía por la funcionalidad de la vía FA/BRCA ni por la inducción de ICL.

Se contaron el número de foci de la γ H2AX y la γ H2AX-H3K9me3 en 216 células WT sin tratamiento (azul), 225 células WT con TMP+UVA (rojo), 225 células FANCA^{-/-} Sin tratamiento (verde) y 224 células FANCA^{-/-} con TMP+UVA (morado). A) Foci de γ H2AX por célula; en promedio se contaron 18.66, 17.88, 18.3 y 18.05 B) foci de γ H2AX-H3K9me3; en promedio se encontraron 11.61, 10.13, 11.75 y 11.86 en los grupos WT Sin Tx, WT TMP+UVA, FANCA^{-/-} Sin Tx y FANCA^{-/-} TMP+UVA, respectivamente. * p<0.05.

Se consideró que los foci en los que la γ H2AX y la H3K9me3 no se encontraron acompañados por alguna de las otras marcas (H4K16ac y/o H4K20me2) son rupturas señalizadas, pero no dirigidas hacia alguna de las vías HR

o la NHEJ. No se detectaron diferencias significativas entre el número de foci γ H2AX-H3K9me3 por célula entre los grupos HEK293 WT y HEK293 *FANCA*^{-/-} ni con sus respectivos tratamientos (Fig. 10A), sin embargo, entre los grupos HEK293 WT y HEK293 *FANCA*^{-/-} tratados con TMP+UVA sí las hubo: las células WT tienen un menor número de foci γ H2AX-H3K9me3 que las HEK293 *FANCA*^{-/-} cuando se les trata con TMP+UVA (10.13 vs. 11.86). Teniendo en cuenta que no hubo diferencias asociadas a la funcionalidad de la vía FA/BRCA o al tratamiento en el número de DSB señalizados por la γ H2AX (Fig 10 A) y considerando que el arresto en fase G2 característico observado en las células Fanconi se asocia con la reparación más lenta de los ICL [88], se puede interpretar que la disminución de la combinación γ H2AX-H3K9me3 se debe a que la resolución de las DSB está siendo más rápida en las células en las que la vía FA/BRCA se encuentra funcional, y como consecuencia se notan menos foci preparados para el reclutamiento de la maquinaria porque ya la reclutó. Sin embargo, la diferencia no es obvia, no se observa entre el tipo celular y el tratamiento y no hay información en la literatura que especifique la cinética de estas PTM durante la reparación de DSB provenientes de ICL, por lo que es indispensable corroborar el resultado estudiando el comportamiento de estos foci en transcurso del tiempo.

Estos resultados indican que la señalización de las DSB por la γ H2AX y la H3K9me3 parecieran no estar alteradas en las células HEK293 *FANCA*^{-/-} y sugieren que la alteración podría encontrarse más abajo en la cadena de señalización.

4. *El número de foci que favorecen a la NHEJ en las células HEK293 WT tras la inducción de ICL disminuye.*

Como se explica en el método, los foci de la γ H2AX en las diferentes combinaciones de PTM se agruparon y contaron según la vía de reparación con la que se asocian, y se clasificaron como HR o NHEJ con los siguientes criterios:

- NHEJ: γ H2AX-H4K20me2, γ H2AX-H3K9me3-H4K20me2.
- HR: γ H2AX-H4K16ac, γ H2AX-H3K9me3-H4K16ac, γ H2AX-H4K20me2-H4K16ac, γ H2AX-H3K9me3-H4K20me2-H4K16ac.

La figura 11 muestra que la señalización de las DSB, marcadas por la γ H2AX, que favorece la reparación por HR no se promueve después del tratamiento aplicado

y que tampoco existe diferencia estadística entre las células HEK293 WT y las HEK293 *FANCA*^{-/-}. En cambio, las marcas asociadas con la vía NHEJ sí se ven afectadas ante la inducción de ICL en las células HEK293 WT, mostrándose una importante disminución de estos foci en las DSB de las células tratadas. Esto podría significar que, aunque no se identificó un favorecimiento de las marcas relacionadas con la HR en las DSB, la disminución en PTM asociadas con la NHEJ en células HEK293 WT tras la inducción de ICL en las DSB es un evento previo a la aparición de las marcas que favorecen la HR, lo que no se observa en las células HEK293 *FANCA*^{-/-} porque la vía FA/BRCA falla y las DSB provenientes de ICL se reparan preferentemente por la NHEJ [89, 90] y/o a que la reparación es más lenta [88]. Sin embargo, no es posible descartar que lo observado sea un efecto de trabajar en un cultivo asincrónico en el que las células se encuentran en diferentes fases del ciclo celular.

La fase del ciclo celular en el que está la célula es uno de los determinantes para definir la vía de reparación que será empleada para resolver las DSB. Puesto que la NHEJ no utiliza homología, es la vía de reparación de DSB que predomina en más fases [73, 91], por lo que no sorprende que existan más marcas asociadas a la NHEJ que a la HR colocalizando con la γ H2AX, sobre todo en las células sin tratar (Fig. 11). En cambio, las DSB intermediarias en la reparación de ICL requieren de la detección del enlace intercatenario, principalmente durante la fase S del ciclo celular [53]. Por lo que se espera que la mayoría de las células tratadas con TMP+UVA positivas para la γ H2AX se encuentren en fase S y en consecuencia la disminución de foci positivos asociados a la reparación por NHEJ se deba a un enriquecimiento de células con DSB en fase S que debería coincidir con un incremento en foci positivos asociados a reparación por RH. Para determinar si el efecto observado se debe a la cinética de reparación o es ruido consecuencia de la metodología empleada, es importante realizar experimentos complementarios en los que se evalúen las marcas en diferentes tiempos post tratamiento para definir si eventualmente hay un enriquecimiento de PTM asociadas con la reparación por HR. Asimismo, sería conveniente limitar las observaciones a aquellas células que se encuentran en fase S, por medio de la sincronización de los cultivos o la detección en paralelo de proteínas asociadas a la fase S del ciclo celular como la ciclina A [92].

Estos resultados demuestran que si bien las células en las diferentes condiciones experimentales tienen la misma cantidad de foci positivos para la γ H2AX (Fig. 10A), las PTM que los acompañan no son las mismas, lo que sugiere que, en efecto los DSB que provienen de ICL se señalizan de manera diferente en las células HEK293 en las que la vía FA/BRCA no es funcional comparadas con las HEK293 WT.

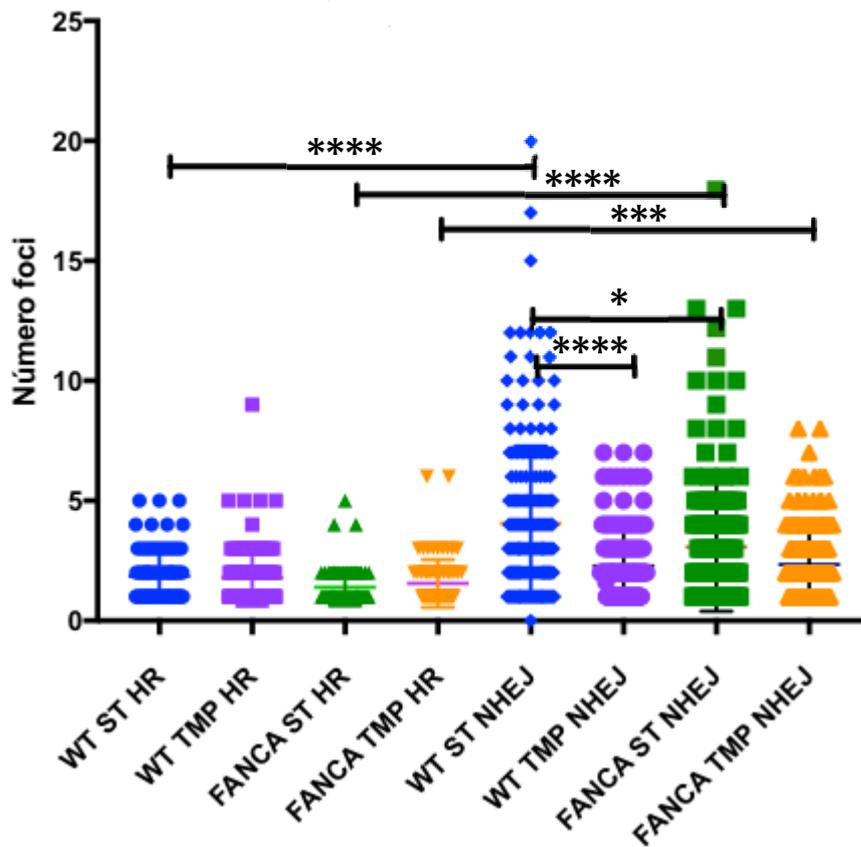


Figura 11. El número de foci por célula que favorece la NHEJ disminuye en las células HEK293 WT después de la inducción de ICL.

Se analizó la presencia de PTM que favorecen la reparación por HR o NHEJ en los foci positivos para la γ H2AX por célula. En azul se encuentran representadas las células WT sin tratamiento, en círculos en las que se encontró presencia de foci asociados a HR (n=86) y con rombos en las que se observó combinación de PTM que favorecen la NHEJ (n=203). En morado se encuentran representadas las células WT con TMP+UVA, en cuadrados en las que se encontró presencia de foci asociados a HR (n=115) y con círculos en las que se observó combinación de PTM que favorecen la NHEJ (n=147). En verde se encuentran representadas las células FANCA^{-/-} sin tratamiento, con triángulos en las que se encontró presencia de foci asociados a HR (n=65) y con cuadrados en las que se observó combinación de PTM que favorecen la NHEJ (n=173). En anaranjado se encuentran representadas las células FANCA^{-/-} con TMP+UVA, con triángulos orientados hacia abajo en las que se encontró presencia de foci asociados a HR (n=80) y con triángulos orientados hacia arriba en las que se observó combinación de PTM que favorecen la NHEJ (n=186). * p<0.05, *** p<0.0002, ****p<0.00001

5. *La inducción de ICL incrementa el número de células con PTM asociadas con HR en células WT, mientras que en las células en las que la vía FA/BRCA está comprometida se favorece la NHEJ.*

Cada focus positivo para la γ H2AX podía colocalizar con una, varias, todas o ninguna de las PTM que se evaluaron en este trabajo (H3K9me3, H4K16ac, H4K20me2) siendo la combinación más representada la compuesta por la γ H2AX y la H3K9me3. Durante el análisis se observó que una célula, además de la colocalización γ H2AX-HEK9me3 podía tener foci positivos para la γ H2AX con marcas asociadas sólo a la reparación por HR, por NHEJ o en algunos casos ambas (mix) (Fig. 12).

El número de células en el que se identificaron DSB, señalizadas por la γ H2AX, sólo con PTM asociadas a la reparación por HR es mayor en las células HEK293 WT tratadas con TMP+UVA que en las no tratadas, este efecto no es evidente en las células HEK293 *FANCA*^{-/-} (Fig 12). Lo observado concuerda con que en las células en las que la vía FA/BRCA se encuentra alterada, la reparación de las DSB provenientes del procesamiento de ICL no se hace preferentemente por HR [6] y que la deficiencia en alguna de las proteínas FANC que participan previa la ubiquitinación de FANCD2-I disminuye el reclutamiento y activación de la acetil transferasa TIP60, cuyo blanco es la H4K16 [4]. Esto va de la mano con el decremento de células HEK293 WT tratadas con TMP+UVA, cuyas marcas son características de la reparación por NHEJ cuando se le compara con las mismas células sin tratamiento y con el efecto inverso en las células HEK293 *FANCA*^{-/-} (Fig. 12). El incremento en las células con marcas asociadas a la NHEJ en las células HEK293 *FANCA*^{-/-} tratadas con TMP+UVA apoya la hipótesis de que lo observado es efecto de la funcionalidad de la vía.

Existe una mayor cantidad de células HEK293 con la vía FA/BRCA funcional en los que encontraron foci DSB con PTM que favorecen la reparación por HR y NHEJ (foci mix) comparadas con las células HEK293 *FANCA*^{-/-} (Fig. 12). Es probable que esta diferencia se deba a que, al haber menos reparación por HR en las células con deficiencia en la vía, hay menos foci mixtos, y que en estos últimos, se señalice para ambas vías de reparación ya sea porque se están trabajando en diferentes DSB y/o porque estas células se encuentran en un punto intermedio de decisión en el que aún no se completa la señalización de las PTM en las rupturas. Ambas hipótesis son probables y hasta podrían estar sucediendo al mismo tiempo, ya que, aunque ciertos

foci podrían estar en transición para incrementar y favorecer alguno de los tipos de reparación, es posible que una célula tenga las dos vías de reparación activas [93]. Este modelo experimental no nos permite discernir lo que está sucediendo en estas células, sin embargo, podemos analizar las proporciones en las que las PTM asociadas con la NHEJ y la HR se encuentran en cada célula.

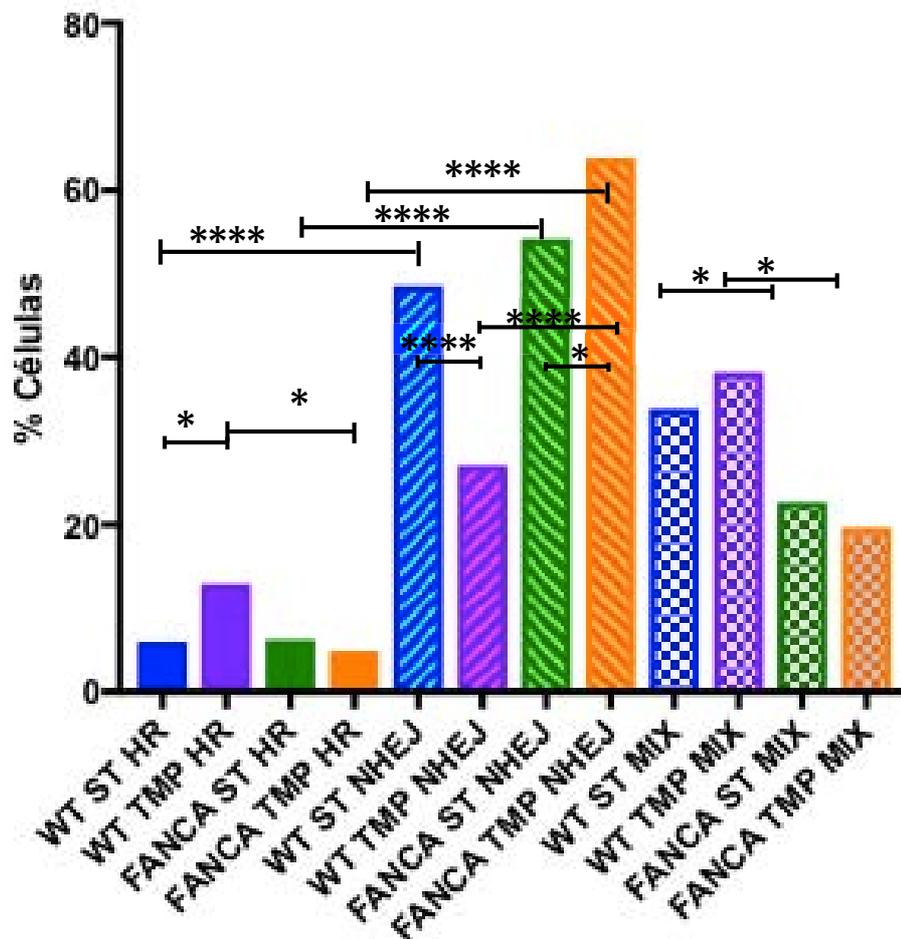


Figura 12. Tras el tratamiento con TMP+UVA incrementa el número de células que favorecen la HR en las células WT, mientras que en las FANCA^{-/-} la se enriquecen las células con PTM que se asocian a NHEJ.

Se agruparon y analizaron las células en las que sólo había marcas que favorecieran la HR (color sólido), la NHEJ (diagonales) o ambas (cuadros) En azul y morado representan las células WT sin y con tratamiento con TMP+UVA, respectivamente, mientras que el verde y amarillo a las FANCA^{-/-} sin y con tratamiento, respectivamente. La N de cada grupo se enlista a continuación por orden de aparición: 13, 29, 14, 11, 105, 61, 122, 143, 73, 86, 51, 44. * p<0.05, **** p<0.00001.

Dentro de las células con foci mixtos se encuentran células con predominio de señal para HR, células con predominio de señal para NHEJ o células en las que no hay predominio de señal para ninguna de las dos vías (Fig. 13). Para su análisis se identificó en cada célula con foci mixtos la existencia del predominio de marcas asociadas a alguna de las vías y se agruparon bajo este criterio. En la figura 13 es posible observar las barras pertenecientes a los grupos HEK293 WT y FANCA^{-/-} con y sin tratamiento con foci mixto de la figura 12 divididas en tres secciones que

muestra el porcentaje de células con o sin predominio para alguna de las vías; en la parte inferior en color sólido se esquematizan las células en las que predominan foci relacionados con la HR, en la parte central con patrón de rayas se representan las células en las que predominan foci relacionados con la NHEJ y en la parte superior de la barra, con patrón de cuadros, se encuentran las células en las que no se identificó predominio de ninguna vía.

En las células HEK293 WT sin tratamiento la mayoría de las células con foci mixto se halla favorecida la NHEJ, esta proporción disminuye con el tratamiento y la fracción en la que no hay predominio incrementa. Esto podría apoyar la hipótesis de que las células con señalización para ambas vías, se encuentran en un punto medio de la respuesta al daño en el que aún no se termina de comprometer a un tipo de reparación y por eso al inducir la formación de ICL en las células HEK293 WT se promueve que estas células dirijan la reparación hacia alguna de las dos vías.

Contrario a lo observado en las células HEK293 WT, en las células HEK293 *FANCA*^{-/-} no se observó diferencia entre los grupos con y sin tratamiento con TMP+UVA, en estos casos, la mayoría de las células tienen un predominio de las marcas asociadas a la NHEJ (Fig 13). Esto se debe a que la vía FA/BRCA no es funcional y por lo tanto la HR está alterada, por lo que las células HEK293 *FANCA*^{-/-} señalizan preferentemente hacia NHEJ.

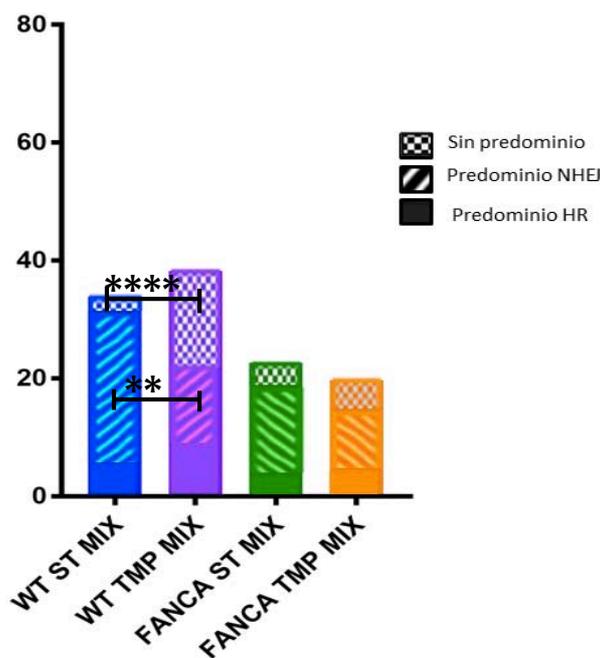


Figura 13. El tratamiento con TMP+UVA disminuye el número de células con predominio de marcas asociadas a NHEJ en las células con foci mixto WT, e incrementa el número de células sin predominio.

La gráfica retoma las últimas 4 barras de la figura 12 y esquematiza el porcentaje de células en las que hay predominio de las marcas asociadas a la HR (color sólido), NHEJ (patrón en diagonal) o sin predominio (cuadros). En las células WT sin tratamiento se contaron 12, 54 y 7 células con predominio HR, NHEJ y mix respectivamente. En las células WT TMP+UVA se contaron 20, 30 y 36 células con predominio HR, NHEJ y mix respectivamente. En las células *FANCA*^{-/-} sin tratamiento se contaron 8, 33 y 10 células con predominio HR, NHEJ y mix respectivamente. En las células *FANCA*^{-/-} TMP+UVA se contaron 10, 22 y 12 células con predominio HR, NHEJ y mix respectivamente. ** p<0.002, **** p<0.00001

CONCLUSIONES

En este estudio demostramos que la señalización a nivel de cromatina tras la inducción de ICL, dada por las PTM γ H2AX y H3K9me3, en las células HEK293 en las que la funcionalidad de la vía FA/BRCA se encuentra afectada es similar a la observada en las WT. Sin embargo, las PTM asociadas a la HR se incrementan en las células HEK293 WT tras la inducción de daño, lo que no sucede con las células HEK293 FANCA^{-/-}, donde la mayoría de las células muestran PTM asociadas a NHEJ (Fig. 14). Esto indica que la señalización de las DSB en las células HEK293 FANCA^{-/-} podría estar influyendo en el tipo de reparación que se lleva a cabo en las rupturas, promoviendo la reparación propensa a errores, y en consecuencia alteraciones cromosómicas de los pacientes con Fanconi como las figuras radiales.

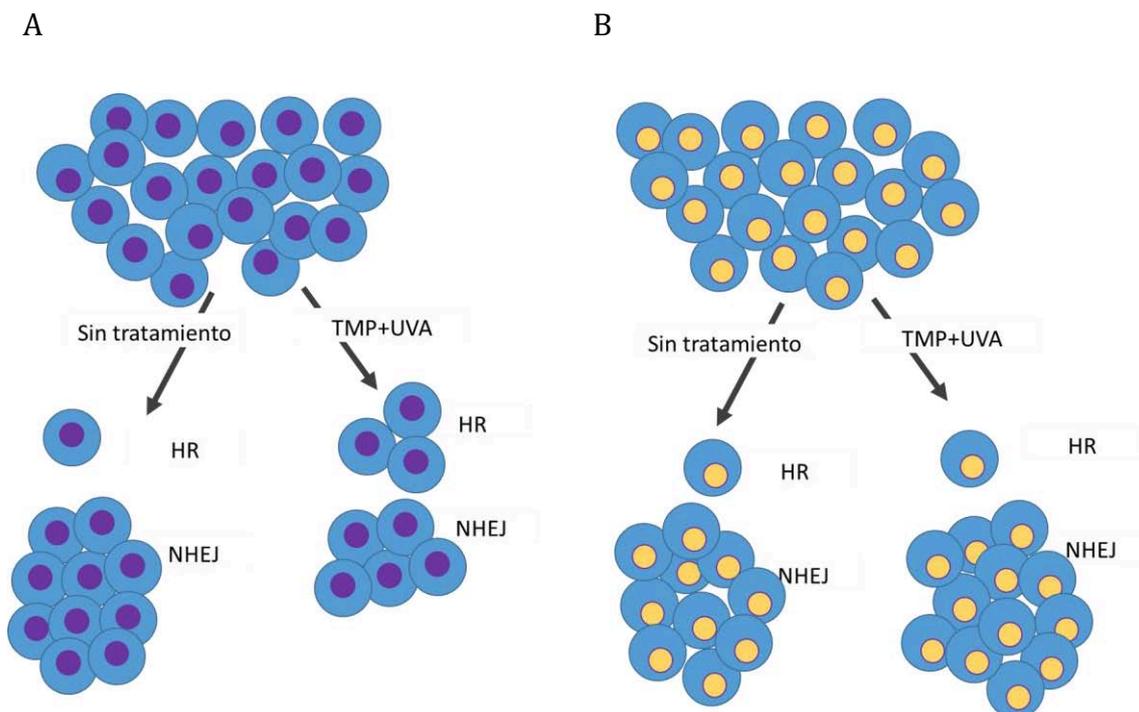


Figura 144. Representación esquemática de resultados.

Representación esquemática de la distribución de las PTM asociadas con HR y NHEJ en células HEK293 WT (A) y FANCA^{-/-} (B) con y sin inducción de ICL por TMP+UVA.

PERSPECTIVAS

Este trabajo demuestra que existen diferencias en las PTM sobre las DSB en las células con deficiencia en la proteína FANCA comparada con las células en las que la vía FA/BRCA se encuentra íntegra, sin embargo, hace falta complementar con experimentos que permitan identificar, también, la presencia de proteínas clave en la reparación por HR y NHEJ (como BRCA1 y 53BP1, respectivamente) para concretar que las marcas en las histonas están dirigiendo la reparación hacia alguna de las vías. Además de complementar experimentos observando estas PTM en diferentes tiempos después del tratamiento y preferentemente en fase S, para describir la cinética de reparación.

REFERENCIAS

1. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ: **Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, **15**:465-481.
2. Hoeijmakers JHJ: **Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.** *Nature* 2001, **411**:366-374.
3. Legerski RJ: **Repair of DNA interstrand cross-links during S phase of the mammalian cell cycle.** *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2010, **51**:540-551.
4. Renaud E, Barascu A, Rosselli F: **Impaired TIP60-mediated H4K16 acetylation accounts for the aberrant chromatin accumulation of 53BP1 and RAP80 in Fanconi anemia pathway-deficient cells.** *Nucleic Acids Research* 2016, **44**:648-656.
5. Duxin JP, Walter JC: **What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia?** *Current Opinion in Cell Biology* 2015, **37**:49-60.
6. Bogliolo M, Surralles J: **Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics.** *Current Opinion in Genetics & Development* 2015, **33**:32-40.
7. Bluteau D, Masliah-Planchon J, Clairmont C, Rousseau A, Ceccaldi R, Dubois d'Enghien C, Bluteau O, Cuccuini W, Gachet S, Peffault de Latour R, et al: **Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia.** *The Journal of Clinical Investigation* 2016, **126**:337-349.
8. McCauley J, Masand N, McGowan R, Rajagopalan S, Hunter A, Michaud JL, Gibson K, Robertson J, Vaz F, Abbs S, Holden ST: **X-linked VACTERL With Hydrocephalus Syndrome: Further Delineation of the Phenotype Caused by FANCB Mutations.** *American Journal of Medical Genetics Part A* 2011, **155A**:2370-2380.
9. Ameziane N, May P, Haitjema A, van de Vrugt HJ, van Rossum-Fikkert SE, Ristic D, Williams GJ, Balk J, Rockx D, Li H, et al: **A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51.** *Nature Communications* 2015, **6**:1-11.

10. Shindler D, Hoehn H (Eds.): **Fanconi Anemia: A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging**. Basel, Switzerland S. Karger AG; 2007.
11. [<http://lab.rockefeller.edu/smogorzewska/families/>]
12. Kee Y, D'Andrea AD: **Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia**. *Journal of Clinical Investigation* 2012, **122**:3799-3806.
13. Hashimoto S, Anai H, Hanada K: **Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders**. *Genes and Environment* 2016, **38**:1-8.
14. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD: **The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016, **17**:337-349.
15. Park J-Y, Virts EL, Jankowska A, Wiek C, Othman M, Chakraborty SC, Vance GH, Alkuraya FS, Hanenberg H, Andreassen PR: **Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene**. *Journal of Medical Genetics* 2016, **53**:672-680.
16. Singh TR, Bakker ST, Agarwal S, Jansen M, Grassman E, Godthelp BC, Ali AM, Du CH, Rooimans MA, Fan Q, et al: **Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M**. *Blood* 2009, **114**:174-180.
17. Apostolou S, Whitmore SA, Crawford J, Lennon G, Sutherland GR, Callen DF, Ianzano L, Savino M, Dapolito M, Notarangelo A, et al: **Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene**. *Nature Genetics* 1996, **14**:324-328.
18. Meetei AR, Levitus M, Xue YT, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, et al: **X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B**. *Nature Genetics* 2004, **36**:1219-1224.
19. Strathdee CA, Duncan AMV, Buchwald M: **Evidence for at least 4 Fanconi Anemia genes including FANCC on chromosome-9**. *Nature Genetics* 1992, **1**:196-198.
20. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, et al: **Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia**. *Science* 2002, **297**:606-609.
21. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, et al: **Positional cloning of a novel fanconi anemia gene, FANCD2**. *Molecular Cell* 2001, **7**:241-248.
22. de Winter JP, Rooimans MA, van der Weel L, van Berkel CGM, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, et al: **The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM**. *Nature Genetics* 2000, **24**:15-16.
23. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, Bakker ST, Steltenpool J, Schuler D, Mohan S, et al: **Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI**. *Cellular Oncology* 2007, **29**:211-218.
24. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, et al: **The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J**. *Nature Genetics* 2005, **37**:934-935.
25. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan ZJ, Ling C, Bishop CE, et al: **A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia**. *Nature Genetics* 2003, **35**:165-170.
26. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, et al: **Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi**

- anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer.** *Nature Genetics* 2007, **39**:162-164.
27. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A: **Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia.** *Nature Genetics* 2011, **43**:142-U191.
 28. Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, Trujillo JP, Minguillon J, Ramirez MJ, Pujol R, et al: **Mutations in ERCC4, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia.** *American Journal of Human Genetics* 2013, **92**:800-806.
 29. Virts EL, Jankowska A, Mackay C, Glaas MF, Wiek C, Kelich SL, Lottmann N, Kennedy FM, Marchal C, Lehnert E, et al: **AluY-mediated germline deletion, duplication and somatic stem cell reversion in UBE2T defines a new subtype of Fanconi anemia.** *Human Molecular Genetics* 2015, **24**:5093-5108.
 30. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, et al: **Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder.** *Nature Genetics* 2010, **42**:406-409.
 31. Sawyer SL, Tian L, Kahkonen M, Schwartzentruber J, Kircher M, Majewski J, Dymont DA, Innes AM, Boycott KM, Moreau LA, et al: **Biallelic Mutations in BRCA1 Cause a New Fanconi Anemia Subtype.** *Cancer Discovery* 2015, **5**:135-142.
 32. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue YT, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, et al: **A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M.** *Nature Genetics* 2005, **37**:958-963.
 33. Kim JM, Kee YH, Gurtan A, D'Andrea AD: **Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24.** *Blood* 2008, **111**:5215-5222.
 34. Stecklein SR, Jensen RA: **Identifying and exploiting defects in the Fanconi anemia/BRCA pathway in oncology.** *Translational Research* 2012, **160**:178-197.
 35. Gurtan AM, D'Andrea AD: **Dedicated to the core: Understanding the Fanconi anemia complex.** *DNA Repair* 2006, **5**:1119-1125.
 36. Wojtaszek J, Lee CJ, D'Souza S, Minesinger B, Kim H, D'Andrea AD, Walker GC, Zhou P: **Structural Basis of Rev1-mediated Assembly of a Quaternary Vertebrate Translesion Polymerase Complex Consisting of Rev1, Heterodimeric Polymerase (Pol) zeta, and Pol kappa.** *Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**:33836-33846.
 37. Waters LS, Minesinger BK, Wiltrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC: **Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2009, **73**:134-154.
 38. Dudas A, Chovanec M: **DNA double-strand break repair by homologous recombination.** *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 2004, **566**:131-167.
 39. Katsuki Y, Takata M: **Defects in HR repair behind the human diseases: FA and HBOC.** *Endocrine-Related Cancer* 2016, **23**:T19-T37.
 40. Michl J, Zimmer J, Tarsounas M: **Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity.** *Embo j* 2016, **35**:909-923.

41. Walsh CS: **Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy.** *Gynecologic Oncology* 2015, **137**:343-350.
42. Roy R, Chun J, Powell SN: **BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection.** *Nature Reviews Cancer* 2012, **12**:68-78.
43. Colavito S, Prakash R, Sung P: **Promotion and regulation of homologous recombination by DNA helicases.** *Methods* 2010, **51**:329-335.
44. Liu YL, West SC: **Timeline - Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004, **5**:937-944.
45. Sung P, Klein H: **Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006, **7**:739-750.
46. Huang H, Hopkins PB: **DNA interstrand cross-linking by formaldehyde-nucleotide- sequence preference and covalent structure of the predominant cross-link formed in synthetic oligonucleotides.** *Journal of the American Chemical Society* 1993, **115**:9402-9408.
47. Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, Luke AM, Sonoda E, Arakawa H, Buerstedde J-M, Gillespie DAF, Sale JE, Yamazoe M, et al: **Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde.** *Cancer Research* 2007, **67**:11117-11122.
48. Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, Takata M, Patel KJ: **Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2011, **18**:1432-1434.
49. Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ: **Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function.** *Nature* 2012, **489**:571-575.
50. Oberbeck N, Langevin F, King G, de Wind N, Crossan GP, Patel KJ: **Maternal Aldehyde Elimination during Pregnancy Preserves the Fetal Genome.** *Molecular Cell* 2014, **55**:807-817.
51. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, et al: **Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients.** *Blood* 2013, **122**:3206-3209.
52. Brooks PJ, Zakhari S: **Acetaldehyde and the Genome: Beyond Nuclear DNA Adducts and Carcinogenesis.** *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2014, **55**:77-91.
53. Muniandy PA, Liu J, Majumdar A, Liu ST, Seidman MM: **DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2010, **45**:23-49.
54. Deans AJ, West SC: **DNA interstrand crosslink repair and cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2011, **11**:467-480.
55. Noll DM, Mason TM, Miller PS: **Formation and repair of interstrand cross-links in DNA.** *Chemical Reviews* 2006, **106**:277-301.
56. Allis CD, Caparros M-L, Jenuwein T, Lachner M, Reinberg D: **Overview and Concepts.** In *Epigenetics*. Second edition. Edited by Allis CD, Caparros M-L, Jenuwein T, Reinberg D. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015: 47-115
57. McGinty RK, Tan S: **Histone, Nucleosome, and Chromatin Structure.** In *Fundamentals of Chromatin*. New York, NY: Springer New York; 2014: 1-28

58. McGinty RK, Tan S: **Nucleosome Structure and Function.** *Chemical Reviews* 2015, **115**:2255-2273.
59. Campos EI, Reinberg D: **Histones: Annotating Chromatin.** *Annual Review of Genetics* 2009, **43**:559-599.
60. Jenuwein T, Allis CD: **Translating the histone code.** *Science* 2001, **293**:1074-1080.
61. McGhee JD, Felsenfeld G: **Nucleosome structure.** *Annual Review of Biochemistry* 1980, **49**:1115-1156.
62. McGhee JD, Nickol JM, Felsenfeld G, Rau DC: **Higher order structure of chromatin: Orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length.** *Cell* 1983, **33**:831-841.
63. Felsenfeld G, Groudine M: **Controlling the double helix.** 2003, **421**:448-453.
64. *Epigenetics: Development and Disease* Epigenetics: Development and Disease. Springer Netherlands; 2013.
65. Agarwal P, Miller KM: **The nucleosome: orchestrating DNA damage signaling and repair within chromatin.** *Biochemistry and Cell Biology* 2016, **94**:1-15.
66. Willbanks A, Leary M, Greenshields M, Tyminski C, Heerboth S, Lapinska K, Haskins K, Sarkar S: **The Evolution of Epigenetics: From Prokaryotes to Humans and Its Biological Consequences.** *Genetics & Epigenetics* 2016, **8**:25-36.
67. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ: **New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair?** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012, **13**:436-447.
68. Rothbart SB, Strahl BD: **Interpreting the language of histone and DNA modifications.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 2014, **1839**:627-643.
69. Panier S, Boulton SJ: **Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, **15**:7-18.
70. Gospodinov A, Herceg Z: **Chromatin structure in double strand break repair.** *DNA Repair* 2013, **12**:800-810.
71. Clouaire T, Legube G: **DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision?** *Nucleus* 2015, **6**:107-113.
72. Zhang HX, Liu HL, Chen YL, Yang X, Wang PF, Liu TZ, Deng M, Qin B, Correia C, Lee S, et al: **A cell cycle-dependent BRCA1-UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice.** *Nature Communications* 2016, **7**:1-14.
73. Daley JM, Sung P: **53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks.** *Molecular and Cellular Biology* 2014, **34**:1380-1388.
74. Price BD, D'Andrea AD: **Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks.** *Cell* 2013, **152**:1344-1354.
75. Chapman JR, Sossick AJ, Boulton SJ, Jackson SP: **BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair.** *Journal of Cell Science* 2012, **125**:3529-3534.
76. Williamson EA, Wray JW, Bansal P, Hromas R: **Overview for the Histone Codes for DNA Repair.** *Mechanisms of DNA Repair* 2012, **110**:207-227.
77. Kozlov SV, Graham ME, Jakob B, Tobias F, Kijas AW, Tanuji M, Chen PL, Robinson PJ, Taucher-Scholz G, Suzuki K, et al: **Autophosphorylation and**

- ATM Activation ADDITIONAL SITES ADD TO THE COMPLEXITY.** *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**:9107-9119.
78. Ayrapetov MK, Gursoy-Yuzugullu O, Xu C, Xu Y, Price BD: **DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, **111**:9169-9174.
 79. Pei HD, Zhang L, Luo KT, Qin YX, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang LW, You ZS, Lou ZK: **MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites.** *Nature* 2011, **470**:124-U144.
 80. Southall SM, Cronin NB, Wilson JR: **A novel route to product specificity in the Suv4-20 family of histone H4K20 methyltransferases.** *Nucleic Acids Research* 2014, **42**:661-671.
 81. Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen JJ, Mer G: **Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair.** *Cell* 2006, **127**:1361-1373.
 82. Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ, Herceg Z: **Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks.** *Nature Cell Biology* 2006, **8**:91-U36.
 83. Hsiao KY, Mizzen CA: **Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair.** *Journal of Molecular Cell Biology* 2013, **5**:157-165.
 84. Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA: **Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle.** *Molecular and Cellular Biology* 2008, **28**:468-486.
 85. Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escribano-Diaz C, Orthwein A, Leung CCY, Huang H, Landry MC, Kitevski-LeBlanc J, Noordermeer SM, Sicheri F, Durocher D: **53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark.** *Nature* 2013, **499**:50-+.
 86. Sun YL, Jiang XF, Xu Y, Ayrapetov MK, Moreau LA, Whetstone JR, Price BD: **Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60.** *Nature Cell Biology* 2009, **11**:1376-U1273.
 87. Li J, Xu X: **DNA double-strand break repair: a tale of pathway choices.** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2016, **48**:641-646.
 88. Akkari YMN, Bateman RL, Reifsteck CA, D'Andrea AD, Olson SB, Grompe M: **The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase.** *Molecular Genetics and Metabolism* 2001, **74**:403-412.
 89. Adamo A, Collis SJ, Adelman CA, Silva N, Horejsi Z, Ward JD, Martinez-Perez E, Boulton SJ, La Volpe A: **Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia.** *Molecular Cell* 2010, **39**:25-35.
 90. Pace P, Mosedale G, Hodskinson MR, Rosado IV, Sivasubramaniam M, Patel KJ: **Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway.** *Science* 2010, **329**:219-223.
 91. Jacquet K, Fradet-Turcotte A, Avvakumov N, Lambert J-P, Roques C, Pandita Raj K, Paquet E, Herst P, Gingras A-C, Pandita Tej K, et al: **The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation.** *Molecular Cell* 2016, **62**:409-421.
 92. Moore JD: **In the wrong place at the wrong time: does cyclin mislocalization drive oncogenic transformation?** *Nature Reviews Cancer* 2013, **13**:201-208.

93. Dungrawala H, Rose KL, Bhat KP, Mohni KN, Glick GG, Couch FB, Cortez D: **The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability.** *Molecular Cell* 2015, **59**:998-1010.