



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

Facultad de Ciencias

**Estudio de la 5-hidroximetilcitosina ante la  
inducción de enlaces covalentes cruzados en un  
modelo Fanconi A**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

**Mirna González Suárez**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Médico Especialista Benilde García de Teresa**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019**





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.

## Hoja datos del jurado

### 1. Datos del alumno

González  
Suárez  
Mirna  
2299842903  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
414009145

### 2. Datos del tutor

Médico Especialista  
Benilde  
García  
de Teresa

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Ernesto  
Soto Reyes  
Solís

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Rodrigo  
González Barrios  
de la Parra

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C.  
Manuel  
Flores  
León

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
María Eugenia  
Gonsebatt  
Bonaparte

### 7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la 5-hidroximetilcitosina ante la inducción de enlaces covalentes cruzados en un modelo Fanconi A  
82p  
2019

## Agradecimientos académicos

- Gracias a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría en donde se realizó esta tesis bajo la tutela de la Médico Especialista Benilde García de Teresa y el apoyo de la Dr. Sara Frías Vázquez.
- A la M. en C. Cecilia Ayala Zambrano y la Dr. Leda C. Torres Maldonado por el apoyo brindado y asesoría durante el proyecto.
- Al taller “La epigenética: interacciones gen-ambiente en el desarrollo de enfermedades” por las ideas y guía que brindaron a la realización del este trabajo.
- A mis sinodales: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, Dr. Rodrigo González de la Parra, M. en C. Manuel Flores León y a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por su tiempo y consejos al revisar mi tesis.
- Y al protocolo 038/2016 “Modificaciones postraduccionales y variantes de histonas en el reconocimiento y procesamiento de los enlaces covalentes cruzados en un modelo de anemia de Fanconi” del Instituto Nacional de Pediatría por el financiamiento de este proyecto.

## Agradecimientos personales

A los 9 años decidí que quería ser bióloga, me tomó un rato cumplir mi sueño pero 15 años después por fin lo logré. Durante todo ese tiempo personas me ayudaron y guiaron para poder cumplir mi meta y por ello estoy muy agradecida.

Las primeras personas a las que quiero decir gracias son a mis papás: Mirna Leonor Suárez Quiroz y Oscar González Ríos. Gracias por dejarme estudiar lo que yo quería y darme las alas necesarias para lograrlo. Los amo mucho y espero llegar a ser una profesionalista como ustedes lo son.

En mis ojos soy la F2, siendo mis papás la F1 y todo eso se debe a la generación P. Sin ellos nada de esto sería posible por eso mi tesis se las dedico a ellos:

Victor Suárez Ramírez  
Josefina Quiroz Garrido  
Fernando González González  
Catalina Ríos Vázquez

Mis padres y mis abuelos me enseñaron que las personas que siempre estarán a tu lado son tu familia por ello los siguientes agradecimientos son para la familia Suárez (y asociados) y a la familia González. Por todos esos momentos malos o buenos que me hicieron la persona que soy el día de hoy.

Durante toda mi vida académica tuve profesores que me frustraron y otros que me inspiraron a lograr ser una profesionalista. Sin ellos no me hubiera enamorado de la ciencia y del conocimiento. Gracias a todos mis profesores por darme algo que nadie me puede quitar y por enseñarme que el conocimiento rompe barreras, y que el cambio comienza con uno para llegar a hacer algo más grande. Por ponerme en ese barco que me llevó hasta donde estoy ahora y seguirá llevándome hasta que en algún momento yo pasé lo que aprendí de ustedes para que alguien más siga el camino que forjamos.

Gracias a mis amigos por hacerme reír, aconsejarme y estar a mi lado.

A mi mejor amigo y confidente: Antonio. Gracias por los consejos, apoyo, risas y cariño.

Gracias a Pamela Rubio por todos estos años de amistad. Te quiero mucho y siempre estaré cuando me necesites. A mis amigos de bajo mantenimiento que aunque no hablemos sabemos que estas ahí para uno, en especial a Claudia García. Te quiero mujer. A Gus Gus por saber lo que es ser un jarocho en la ciudad y ser un gran amigo cuando lo necesitas.

Gracias a mis dos amigas que tuve el honor de conocer en la universidad: Maru Bernal y Jimena Silva. Por todos esos momentos juntas que pasamos, proyectos y prácticas de campo. Además de que son mi inspiración a llegar a ser algo mejor.

A mis amigos de taller: Yanueh, César, Iker y Karlita. Por los consejos y apoyo que nos brindamos durante nuestros proyectos. A Tete por esas pláticas tan enriquecedoras.

Gracias a mis amigos de laboratorio, por esas risas y consejos cuando un experimento no salía. A Marco, Miguel, Ceci, Pedro, Gilda, El Deivid, Benjamín y aunque me bullie a Bulises.

Gracias a el laboratorio de Citogenética, por todo el apoyo y amistad que me brindaron: Dra. Bertha Molina, Silvia, Mary Paz, Sandra, Luz, Armando, Óscar, Charlie y Rehot.

A la Dra. Leda Carolina, por darme un apodo, consejos de cocina, sabiduría en cualquier tema y estar siempre ahí cuando necesitaba su ayuda. Gracias Ledita.

Un enorme agradecimiento:

A la Dra. Sara Frías Vázquez por abrirme las puertas de su laboratorio y por ser mi profesora. Además ser la persona que me introdujo a la biología celular y epigenética, temas que me apasionan y quiero seguir aprendiendo.

A Alfredo Rodríguez por hacerme creer que si uno se esfuerza puede lograr grandes cosas.

A mi tutora Ben, sin ti este proyecto no hubiera sido posible. Gracias por aceptarme, enseñarme, y aconsejarme durante estos últimos años. Por la paciencia y ayuda que me brindaste. Muchas gracias Ben.

Y por último, a cualquier persona que se me olvidó nombrar o participó indirectamente para que pudiera llegar a este momento. Por décima tercera vez gracias.

*“Lo bueno de la ciencia es que es cierta independientemente de si crees o no en ella”  
-Neil deGrasse Tyson*

## Índice

Índice de Figuras y Tablas .....	9
Abreviaturas .....	10
Resumen .....	11
Abstract.....	13
Introducción .....	15
<b>Daño al DNA y Estabilidad Genómica</b> .....	15
Respuesta al daño al DNA (DDR) .....	16
<b>Regulación epigenética en la DDR</b> .....	18
Remodeladores de la cromatina y MPTs en la reparación de una ruptura de doble cadena (DSB) .....	19
Modificación química del DNA: la 5-hidroximetilcitosina en la reparación de una DSB ....	23
Anemia de Fanconi (AF): un Síndrome de Inestabilidad Cromosómica (SIC) .....	27
<b>Enlaces covalentes cruzados (ICLs)</b> .....	30
Agentes Inductores Exógenos .....	31
Agentes Inductores Endógenos.....	32
Vía FA/BRCA.....	33
Regulación y señalización epigenética en FA/BRCA .....	37
Antecedentes directos.....	39
Planteamiento del problema .....	39
Pregunta de investigación .....	40
Justificación .....	40
Hipótesis.....	40
Objetivo general.....	40
Objetivos particulares .....	41
Diseño experimental.....	41
Resultados y Discusión.....	43
1. Establecimiento de tiempo para el tratamiento con Mitomicina C .....	43
2. Análisis de expresión relativa de mRNA de <i>TET1</i> y <i>TET3</i> en células Fanconi y células corregidas .....	45
3. Evaluación de la co-localización de las marcas 5-hmC y $\gamma$ H2AX a las 6 horas de tratamiento .....	48
4. Análisis $\gamma$ H2AX-C-5hmC y $\gamma$ H2AX-P-5hmC.....	51
5. Evaluación de la co-localización de las marcas 5-hmC y $\gamma$ H2AX a las 18 horas .....	54
Métodos en extenso.....	61
<i>Cultivos celulares</i> .....	61
<i>Inducción de daño con MMC</i> .....	61
<i>Citometría de flujo</i> .....	62
<i>Inmunofluorescencias (IF)</i> .....	64
<i>Análisis de inmunofluorescencias</i> .....	66

<b><i>Extracción de RNA</i></b> .....	<b>68</b>
<b><i>Síntesis de cDNA</i></b> .....	<b>69</b>
<b><i>qRT-PCR</i></b> .....	<b>70</b>
<b>Anexo</b> .....	<b>71</b>
<b>Literatura citada</b> .....	<b>73</b>

## Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Daño al DNA y las vías de reparación.....	15
Figura 2. Modelo Acceso-Cebar-Reparación-Restauración ilustrando el daño tipo DSB.....	18
Figura 3. TETs y mecanismo de desmetilación de la 5mC.....	25
Figura 4. Aberraciones cromosómicas y arresto en el ciclo celular de células AF.....	30
Figura 5. Formación de un ICL por Mitomicina C (MMC).....	32
Figura 6. Vía FA/BRCA.....	36
Figura 7. Estrategia experimental.....	42
Figura 8. La incorporación de BrdU y ciclo celular es similar independientemente de la línea celular y el tratamiento.....	44
Figura 9. Las células positivas para $\gamma$ H2AX aumentan después del tratamiento con MMC.....	45
Figura 10. Expresión relativa del gen TET1 en células GM+6914+A y GM6914+EV después del tratamiento con MMC [1 $\mu$ M] durante 6 horas ( $n=3 \pm$ DE).....	46
Figura 11. Expresión relativa del gen TET3 en células GM6914+EV y GM6914+A después de tratamiento con MMC [1 $\mu$ M] durante 6 horas ( $n=3 \pm$ DE).....	47
Figura 12. El número de foci de $\gamma$ H2AX no varía dependiendo de la funcionalidad de la vía FA/BRCA ni después de tratamiento con MMC durante 6 horas. La $\gamma$ H2AX-5hmC se ve favorecidas en las células GM6914+EV.....	49
Figura 13. Ejemplo de distribución de la co-localización de $\gamma$ H2AX-5hmC.....	51
Figura 14. La $\gamma$ H2AX-P-5hmC y $\gamma$ H2AX-C-5hmC aumentan ligeramente con el tratamiento de MMC a las 6 hrs.....	52
Figura 15. Aumento de células positivas para $\gamma$ H2AX después de 18 hrs de tratamiento y cambios en el ciclo celular después de tratamiento con MMC [1 $\mu$ M] a diferentes tiempos.....	53
Figura 16. Cinética de $\gamma$ H2AX durante tratamiento de MMC [1 $\mu$ M].....	54
Figura 17. La $\gamma$ H2AX-5hmC tienen un comportamiento diferente después de la inducción de daño dependiendo de la línea celular.....	55
Figura 18. El aumento en el número de $\gamma$ H2AX-5hmC varía dependiendo la funcionalidad de FA/BRCA, tiempo y localización.....	57
Figura 19. El aumento de $\gamma$ H2AX-C-5hmC es más evidente que el de $\gamma$ H2AX-P-5hmC a las 18 horas de tratamiento con MMC.....	58
Figura 20. Ejemplo de base de datos para las inmunofluorescencias.....	67
Tabla 1. Genes <i>FANC</i> : características y función.....	29
Tabla 2. Líneas celulares: características y origen.....	61
Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios.....	66
Tabla 4. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en qRT-PCR.....	72
Tabla 5. Promedios de puntos de cruce (CP) de <i>TET1</i> , <i>TET2</i> , <i>TET3</i> y <i>7SL</i> .....	72

## Abreviaturas

53BP1	Tumor Protein p53 Binding Protein 1
5hmC	5-hidroximetilcitosina
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein
DEB	Diepoxibutano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsDNA	DNA bicatenario
DSB	Ruptura de doble hebra
AF	Anemia de Fanconi
FANCA	Proteína de anemia de Fanconi A
FANCB	Proteína de anemia de Fanconi B
FANCC	Proteína de anemia de Fanconi C
FANCD1	Proteína de anemia de Fanconi D1
FANCD2	Proteína de anemia de Fanconi D2
FANCE	Proteína de anemia de Fanconi E
FANCF	Proteína de anemia de Fanconi F
FANCG	Proteína de anemia de Fanconi G
FANCI	Proteína de anemia de Fanconi I
FANCJ	Proteína de anemia de Fanconi J
FANCM	Proteína de anemia de Fanconi M
FANCN	Proteína de anemia de Fanconi N
FANCO	Proteína de anemia de Fanconi O
FANCP	Proteína de anemia de Fanconi P
FANCQ	Proteína de anemia de Fanconi Q
FANCR	Proteína de anemia de Fanconi R
FANCS	Proteína de anemia de Fanconi S
FANCT	Proteína de anemia de Fanconi T
FANCU	Proteína de anemia de Fanconi U
FANCV	Proteína de anemia de Fanconi V
FANCW	Proteína de anemia de Fanconi W
FANCY	Proteína de anemia de Fanconi Y
HR	Reparación por recombinación homóloga
ICL	Enlace covalente cruzado
MMC	Mitomicina C
MPT	Modificaciones postraduccionales de las histonas
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos
PML	Proteína de leucemia promielocítica
SIC	Síndromes de Inestabilidad Cromosómica
ssDNA	Hebras de DNA monocatenarias
TMP	Trimetilpsoraleno
TET1	Ten-eleven traslocation meticitosina dioxigenasa 1
TET2	Ten-eleven traslocation meticitosina dioxigenasa 2
TET3	Ten-eleven traslocation meticitosina dioxigenasa 3
UVA	Radiación Ultravioleta A

## Resumen

Los enlaces covalentes cruzados (ICL) son un tipo de daño al DNA que compromete la integridad del genoma. La vía FA/BRCA es la encargada de reparar este daño y esta compuesta de 23 proteínas (proteínas FANC) que coordinan diversos procesos, la falla en alguna de estas proteínas condiciona una enfermedad llamada anemia de Fanconi (AF). Las células con AF utilizan vías alternas de reparación no fidedignas como la unión de extremos no homólogos (NHEJ) para reparar la ruptura de doble cadena que es un intermediario de la reparación del ICL (DSB-I). Cómo son reconocidos los ICLs y se deciden que vía de reparación utilizar sigue siendo estudiado.

El proceso encargado de reconocer y reparar el daño al DNA se conoce como “Respuesta a daño al DNA” (DDR, por sus siglas en inglés) y sucede a nivel de cromatina. Recientemente se describió que un intermediario en el proceso de la desmetilación del DNA: la 5-hidroximetilcitosina (5hmC) señalizaba sitios de daño tipo ruptura de doble cadena (DSB) y se encontró en asociación con 53BP1, una proteína de NHEJ. Las proteínas encargadas de oxidar a la 5mC son las Ten-eleven translocation (TETs). En las células AF se ha descrito que hay una preferencia por las modificaciones postraduccionales de histonas (MPTs) asociadas a la vía NHEJ, pero se desconoce si las DSB-I también son señalizados con la 5hmC. En este trabajo se exploró la posibilidad que los DSB-I se marcaran con 5hmC y se valoró la expresión de los genes que codifican las TETs.

Se analizaron con qRT-PCR los niveles de expresión de *mRNA* de las TETs en las líneas GM6914+EV, una línea deficiente en *FANCA* y la línea isogénica corregida GM6914+A antes y después de la inducción de daño tipo ICL con Mitomicina C (MMC) por 6 horas. Se realizaron inmunofluorescencias (IF) contra la 5hmC y contra la variante de histona  $\gamma$ H2AX, se

buscó si co-localizaban al inducir ICLs. No se encontraron diferencias en los niveles de mRNA *TET1* y *TET3* ante la inducción de daño, por lo que se infiere que la regulación de la desmetilación ocurre en otro nivel. En cuanto a la 5hmC y su localización con la  $\gamma$ H2AX, se encontró un aumento en las células GM6914+EV de esta asociación con inducción de daño. Al analizar las IF se encontraron dos patrones de localización de la 5hmC con la  $\gamma$ H2AX:  $\gamma$ H2AX Coincidente 5hmC ( $\gamma$ H2AX-C-5hmC) y  $\gamma$ H2AX Periferia 5hmC ( $\gamma$ H2AX-P-5hmC). Al valorar los foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC con 18 hrs de inducción de ICLs, se observó un aumento de la 5hmC, en especial la asociación  $\gamma$ H2AX-P-5hmC.

Por lo cual se puede concluir que la 5hmC aumenta después de la exposición con agentes inductores de ICLs como la MMC, pero esta marca no indicaría la DSB-I, en cambio, podría estar contribuyendo a señalar una decisión de vía de reparación en tiempos tempranos. El aumento de la 5hmC en las células GM6914+EV nos indicaría que en tiempos tempranos post daño, esas células favorecen a esta vía de reparación. En cuanto a las dos disposiciones de la 5hmC encontradas se deben realizar mayores investigaciones para determinar su relevancia biológica y en contexto con las proteínas de la vía FA/BRCA.

## Abstract

Interstrand crosslinks (ICL) are a type of DNA damage that compromise the integrity of the genome. The Fanconi anemia pathway (FA/BRCA pathway) which is composed, of 23 proteins (known as FANC) is responsible for repairing this damage. The failure of any of these proteins causes a condition called Fanconi anemia (FA). Cells with FA use alternate error prone repair pathways such as non-homologous end joining (NHEJ) to repair the intermediate double strand break that results from ICL processing (DSB-I). The way FA cells recognize and decide which repair path to use is still being studied. The process responsible for recognizing and repairing DNA occurs at the chromatin level and is known as "DNA Damage Response" (DDR). It was recently reported that a DNA demethylation by-product: 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) signaled sites of double-strand break (DSB) damage and it has been associated with 53BP1, a protein of NHEJ. The proteins responsible for this reaction are Ten-eleven translocation (TETs). In FA cells, NHEJ associated post-translational histone modifications (PTMs) are preferentially found, but it is unknown if the DSB-I are also signaled by 5hmC. In this work we explored the possibility that the DSB-I were marked with 5hmC and evaluated the expression of the genes that encode the TETs.

The mRNA expression levels of the TETs were evaluated using qRT-PCR in the GM6914+EV line, a cell line with biallelic mutations in *FANCA*, and the corrected isogenic line GM6914+A before and after the induction of ICL with Mitomycin C (MMC) for 6 hours. Immunofluorescences (IF) were performed against 5hmC and the histone variant  $\gamma$ H2AX searching for co-localization between these two marks after induction of ICL. No differences were found in the levels of mRNA *TET1* and *TET3* before the induction of damage, so it is inferred that the regulation of demethylation occurs at another level. Regarding the 5hmC and

its location with the  $\gamma$ H2AX, an increase in the GM6914+EV cells of this association was found upon damage induction. When analyzing the IFs, two localization patterns of the 5hmC were found with the  $\gamma$ H2AX:  $\gamma$ H2AX Coincident 5hmC ( $\gamma$ H2AX-C-5hmC) and  $\gamma$ H2AX Periphery 5hmC ( $\gamma$ H2AX-P-5hmC). When evaluating the foci of  $\gamma$ H2AX-5hmC with 18 hrs of induction of ICLs, an increase of 5hmC was observed, especially the association  $\gamma$ H2AX-P-5hmC.

Therefore, it can be concluded that 5hmC is elevated by using ICL-inducing agents such as MMC, but this mark would not indicate the DSB-I, instead it could be contributing to signaling a repair route decision at early times. The increase of 5hmC in the GM6914+EV cells would indicate that in early times post damage, these cells favor this repair pathway. Further investigations should be carried out to determine biological relevance of the two 5hmC patterns and in context with the proteins of the FA/BRCA pathway.

# Introducción

## Daño al DNA y Estabilidad Genómica

A lo largo de la vida de una célula, esta se encuentra expuesta a diferentes agentes endógenos y exógenos (físicos, químicos y biológicos) que pueden comprometer la integridad de su genoma (Papamichos-Chronakis & Peterson, 2013).

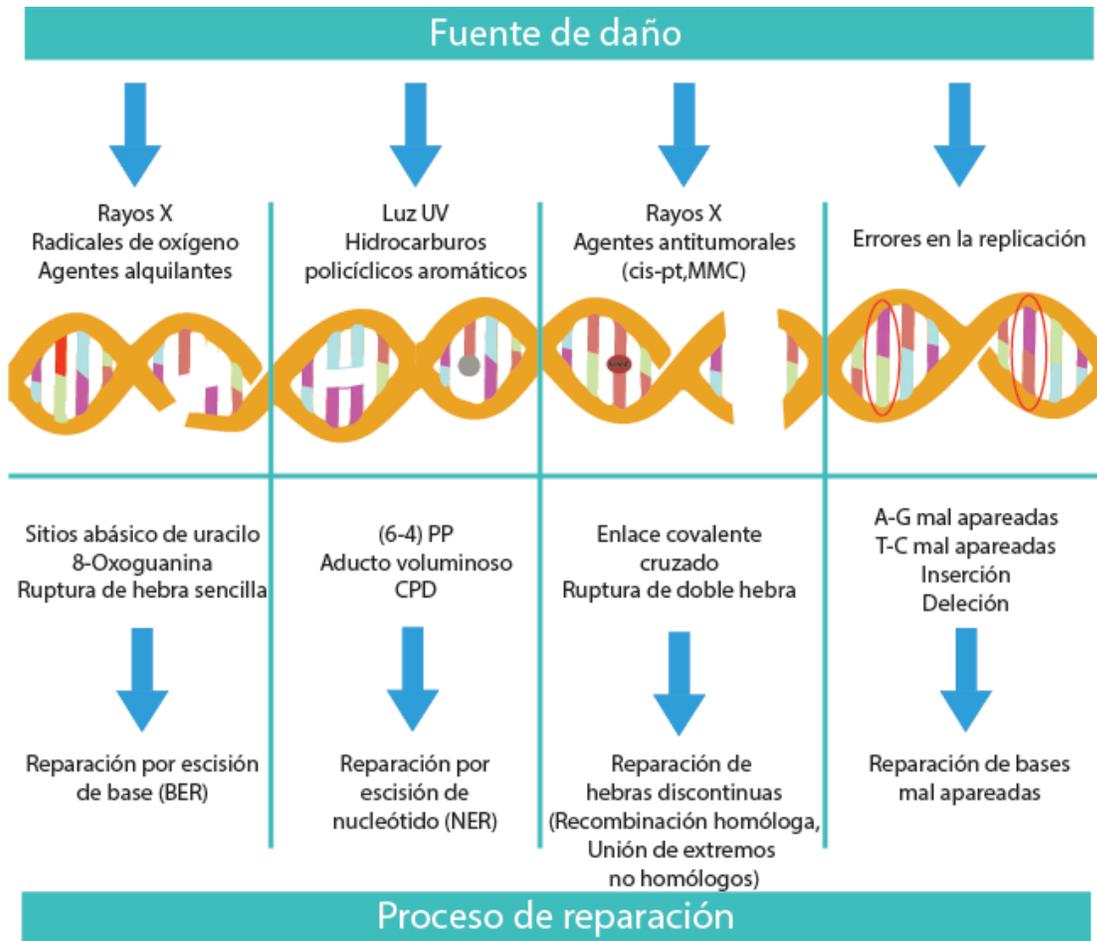


Figura 1. Daño al DNA y las vías de reparación.

Fuentes de daño (panel superior) y tipo de daño que crean al entrar en contacto con el DNA (panel medio). Cada tipo de daño es reparado por una vía de reparación en específico (panel inferior) para restablecer la integridad del genoma.

Se ha calculado que en promedio, una célula humana recibe 10,000 lesiones en su genoma al día (Germann, Johnson, & Spring, 2012). Estas lesiones al DNA pueden ser de

diferentes tipos, entre las que se encuentran: rupturas de doble hebra, enlaces covalentes cruzados, rupturas de hebra sencilla, enlaces intra-hebra, etc (Figura 1, modificada de Hoeijmakers, 2001). Por lo tanto, es necesario que exista una correcta reparación de estas lesiones, debido a que pueden bloquear o comprometer procesos fundamentales de la célula, como la replicación del DNA, la transcripción génica y la segregación de los cromosomas.

Si estas lesiones no son reparadas correctamente, pueden llevar a la acumulación de alteraciones cromosómicas, mutaciones, arresto del ciclo celular, y apoptosis (Hoeijmakers, 2001). Además se ha asociado el daño al DNA con una gran variedad de enfermedades, como neoplasias, enfermedades neurodegenerativas y deficiencias en el sistema inmune, entre otros (Jackson & Bartek, 2009).

### Respuesta al daño al DNA (DDR)

Con el fin de mantener la integridad del genoma, la célula ha desarrollado una serie de eventos coordinados que permiten detectar la presencia de daño, señalar su presencia y promover su correcta reparación. A este sistema se le conoce como “Respuesta al daño al DNA” (DDR por sus siglas en inglés) (Papamichos-Chronakis & Peterson, 2013). Esta respuesta de daño al DNA puede ser activada en cualquier momento y lugar, además que no solo actúa a nivel de DNA sino también en la cromatina (Figura 2A), por lo cual debe existir una reorganización que permita la detección, acceso y reparación del daño (Soria, Polo, & Almouzni, 2012). Este modelo fue descrito inicialmente por Smerdon en 1991, quien lo denominó “Acceso-reparación-restauración” (ARR), y propone que en respuesta a una lesión, la cromatina permite el acceso a la maquinaria de reparación, y una vez reparado se restaura la organización de la cromatina a su estado inicial.

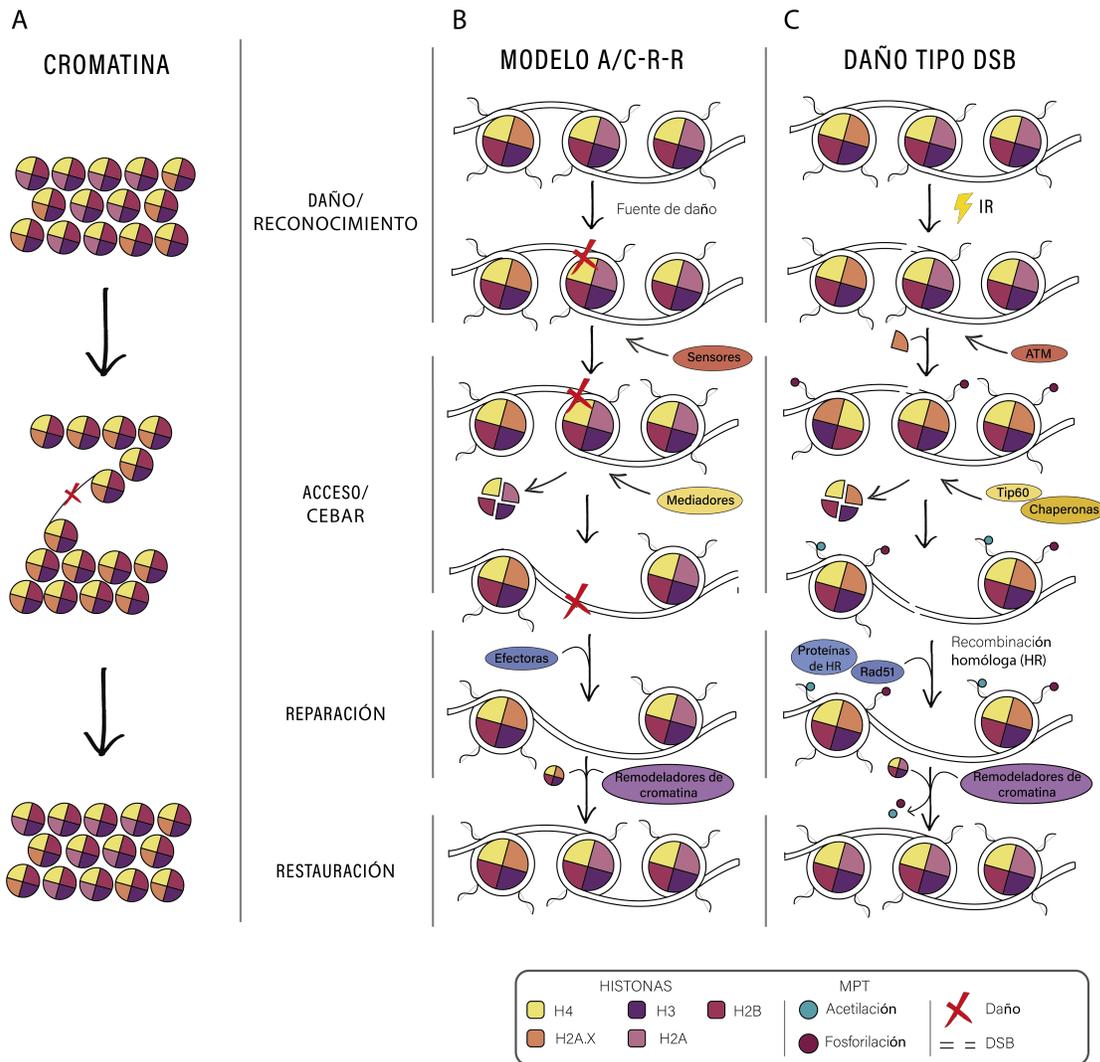
Recientemente, el modelo fue actualizado por Soria y colaboradores (Soria et al., 2012) para incluir la dinámica de la cromatina denominándolo “Acceso/cebar-reparación/restauración” (Figura 2B). Este modelo toma en cuenta que cuando existe daño al DNA, los nucleosomas y proteínas asociadas no son removidas completamente para permitir que la maquinaria de reparación pueda acceder al DNA desnudo donde ocurrió el daño, sino que la misma cromatina “se prepara” e indica que esa región es competente para llevar a cabo la DDR. En general, en este proceso pueden identificarse 4 etapas (Y. Liu, Li, & Lu, 2016; Price & Andrea, 2013):

1. Reconocimiento de la lesión en la cromatina, en la cual participan proteínas conocidas como sensores.
2. Remodelación de la cromatina para permitir el acceso de la maquinaria de reparación. En la cual participan los mediadores.
3. Reorganización del complejo nucleosoma-DNA para procesamiento y reparación de la lesión, realizada por proteínas efectoras.
4. Restauración de la estructura de la cromatina acorde a condiciones previas a la lesión.

Debido a que existen muchos tipos de daños, la célula ha desarrollado mecanismos específicos que permiten su reparación (Figura 1). Una misma lesión puede ser reparada por diferentes vías, dependiendo de ciertas condiciones celulares como la fase del ciclo en la que se encuentre la célula. Este es el caso de las rupturas de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés) que pueden ser reparadas por la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) independientemente de la fase del ciclo celular, o por la vía recombinación homóloga (HR) en fase S o G2 cuando hay una cromátida hermana disponible, permitiendo una reparación prácticamente sin errores (Mao, Bozzella, Seluanov, & Gorbunova, 2008).

## Regulación epigenética en la DDR

En la célula eucariote, el DNA se encuentra organizado y compactado dentro del núcleo en una estructura especializada denominada cromatina. La cromatina se compone de proteínas llamadas histonas y proteínas no histonas que mantiene la compactación del material genético permitiendo el acceso a la información genética de manera regulada y dinámica.



**Figura 2. Modelo Acceso-Cebarr-Reparación-Restauración ilustrando el daño tipo DSB**

**A.** Esquema de la cromatina antes, durante y después de la reparación de daño al DNA. **B.** Modelo “A/C-R-R” a nivel de nucleosoma. **C.** Modelo “A/C-R-R” cuando existe daño tipo DSB. Se muestran algunas proteínas y PTMs involucradas en el proceso de reparación con HR.

La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que está compuesto por un octámero de histonas (formado por dos dímeros de H2A-H2B y un tetrámero de H3-H4) que por afinidad de cargas permiten la unión a 147 pb de DNA. Los nucleosomas se enlazan entre ellos por medio de DNA “linker” que tiene una longitud aproximadamente de 20 pb, formando una estructura parecida a un “collar de perlas” que constituye el primer nivel de compactación de la cromatina. Los siguientes niveles de compactación son consecuencia de interacciones con otras proteínas, como las histonas H1 y H5 (Allis et al., 2015).

A lo largo de los años, se ha evidenciado que las histonas presentan modificaciones postraduccionales (MPTs) como fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, metilación entre muchas otras (Y. Liu et al., 2016), en sus extremos C-terminales y N-terminales. Dichas MPTs pueden afectar la dinámica de la cromatina incidiendo directamente sobre su grado de compactación al modificar la carga neta de los extremos terminales de las histonas, o bien al proveer un sitio de unión para factores proteicos capaces de repercutir en su arquitectura.

El modelo de “Acceso/cebar-reparación/restauración” previamente mencionado, se vale de estas modificaciones para reconocer el daño en el DNA, así como para modular la estructura de la cromatina para señalar la presencia del daño y repararlo (Polo & Almouzni, 2015).

### **Remodeladores de la cromatina y MPTs en la reparación de una ruptura de doble cadena (DSB)**

El ejemplo mejor estudiado de la respuesta de la cromatina ante daño es cuando existe una ruptura de doble cadena (DSB). Este tipo de daño tiene un efecto altamente perjudicial para el DNA al provocar la pérdida de continuidad de la molécula de DNA (Hoeijmakers, 2001). El origen de las DSBs puede ser consecuencia directa de algún estímulo o bien resultar del procesamiento de otras lesiones como los enlaces covalentes cruzados. Las proteínas de

la familia PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases por sus siglas en inglés) son las encargadas del reconocimiento de las DSBs y dependiendo de su origen, serán procesadas por diferentes proteínas de esta familia. Cuando la DSB ocurre (Figura 2C) por un estímulo directo como la radiación ionizante, el sensor ATM (Ataxia-telangiectasia mutated), un miembro de la familia PIKK, y el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) se posicionan en el sitio de la lesión inmediatamente después de que esta ocurre. MRN es capaz de unirse directamente a los extremos de las cadenas de DNA bicatenarios (dsDNA) consecuencia del DSB. Una vez que se reconoció la lesión, ATM se activa y a su vez fosforila una variedad de sustratos, comenzando la cascada de señalización de la DDR. Uno de los sustratos de ATM más relevantes es la variante de histona H2A.X, la cual al fosforilarse en la serina 139 se conoce como “ $\gamma$ H2AX” (Maréchal & Zou, 2013). La serina 139 fosforilada de H2AX es un sitio de unión para la proteína MDC1 que a su vez funciona como andamiaje para la unión de ATM, permitiendo que dicha cinasa se posicione en la cromatina con daño permitiendo la fosforilación de H2AX que se ubican en nucleosomas aledaños a la lesión, favoreciendo la propagación de esta marca. La variante de histonas H2AX también debe ser monoubiquitinizada para un correcto funcionamiento y propagación de la  $\gamma$ H2AX (Pan, Peng, Hungs, & Lin, 2011). Se ha evidenciado que la  $\gamma$ H2A.X se puede extender hasta 2 Mb del sitio de daño (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998) sirviendo como un sitio de reconocimiento y anclaje para otras proteínas que participan en la DDR y la reparación (Attikum & Gasser, 2009). Entre ellas se encuentran proteínas de reparación, proteínas de control del ciclo celular, apoptosis, organización de la cromatina y muchas otras (Shiloh & Ziv, 2013).

Para que estos factores puedan acceder a los sitios dañados, la cromatina debe descompactarse y volverse accesible sin afectar la cromatina adyacente a la lesión. Entre los

factores que llegan después de la lesión se encuentran los remodeladores de la cromatina, los cuales utilizan ATP para remover, intercambiar o mover un nucleosoma y que la secuencia de DNA quede expuesta (Papamichos-Chronakis & Peterson, 2013). Se han descrito 4 familias de remodeladores de la cromatina dependientes de ATP: SWI/SNF, INO80, CHD y ISWI (Jeggo & Downs, 2014). El remodelador de la cromatina hNuA4, un miembro de la familia INO80, es reclutado por MDC1 al sitio de la lesión y permite la acetilación por medio de su subunidad Tip60 de H4, H2A, ATM y otras proteínas de la DDR. Además, su región catalítica p400 tipo motor ATPasa permite el intercambio de histonas H2A por H2A.Z, aumentando la solubilidad de las histonas y su posterior desacoplamiento (Price & Andrea, 2013).

Una de las MPT que participan en la remodelación de la cromatina es la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), la enzima SUV39H1 la coloca inmediatamente después de la lesión y es mantenida por medio del complejo KAP-1/HP1/SUV39H1 facilitando su expansión. Se cree que sirve para heterocromatizar y estabilizar la cromatina adyacente a la lesión, además de activar a la acetiltransferasa Tip60 (Ayrapetov, Gursoy-yuzugullu, Xu, Xu, & Price, 2014).

Las marcas de histonas no solo puede alterar la cromatina adyacente a la lesión, sino que también influyen en el tipo de reparación que se usará para resolver el DSB (Cao, Shen, & Zhu, 2016). Se ha evidenciado que H3K9me3 es importante para la acetilación de ATM. Además, las marcas H4K20me2 y H2AK15ub son necesarias para que el factor 53BP1 se una a la lesión y se lleve a cabo la reparación por extremos no homólogos (NHEJ) (Bakkenist & Kastan, 2015; Panier & Boulton, 2013).

Sin embargo, la acetiltransferasa de histonas Tip60, la cual forma parte del complejo remodelador de la cromatina hNuA4, también puede reconocer a H3K9me3 (Sun et al., 2009). La subunidad MBTD1 de dicho complejo compite por la unión a la marca H4K20me2 y Tip60

acetila H2AK15 impidiendo que se ubiquitinice (Jacquet et al., 2016). También la acetilación de H4K16 funciona como otro mecanismo que impide la unión de 53BP1 a H4K20me2, promoviendo así una reparación de unión de extremos homólogos (HR) (Tang et al., 2013).

Otra cinasa de la familia PIKK que participa en la reparación del DNA y puede fosforilar a la variante de histonas H2A.X es ATR (ATM- and Rad3-related). ATR puede ser activado por, entre otros, agentes que causan estrés genotóxico como la radiación ultravioleta, agentes base-alquilantes y agentes causantes de enlaces covalentes cruzados, por lo cual se le considera como proteína esencial para la viabilidad celular (Saldivar, Cortez, & Cimprich, 2017). Es activada a través del reconocimiento de hebras de DNA monocatenarias (ssDNA) recubierta con RPA (Replication protein A), producto del descoplamiento de la DNA polimerasa en la horquilla de replicación o de la resección nucleolítica producto de la reparación de un DSB. ATR junto con ATRIP (ATR- interacting protein) forman un complejo conocido como ATR-ATRIP que será el encargado de fosforilar múltiples blancos. La activación de este complejo consta de múltiples pasos en donde intervienen proteínas como el complejo MRN, el complejo RHINO, la abrazadera RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) y TOPB1 (Topoisomerasa Biding protein 1) (Maréchal & Zou, 2013).

Una vez activado ATR, puede fosforilar múltiples blancos, como ya he mencionado, dentro de los que destacan:  $\gamma$ H2A.X, Chk1 un regulador del ciclo celular, desmetilasas de DNA: Ten-eleven-Translocation 3 (TET3), e inclusive a ATM (Jiang, Wei, Chen, Zhang, & Li, 2017; Q. Liu et al., 2000; Stiff et al., 2006).

Hasta el momento se han descrito muchas MPT de histonas y remodeladores de la cromatina que participan en la señalización y reparación de una lesión tipo DSB en el DNA. No obstante, no son los únicos niveles de regulación que pueden ser modificado para

señalizar el daño. En el 2016, Kafer y colaboradores describieron que una modificación química de una de las bases del DNA, la 5-hidroximetilcitosina, es una marca de daño de tipo DSB. Abriendo un nuevo panorama para el estudio de la señalización epigenética en DNA dañado.

### **Modificación química del DNA: la 5-hidroximetilcitosina en la reparación de una DSB**

La 5-hidroximetilcitosina (5hmC) es intermediario de la desmetilación del DNA, y como antes mencionado, se le asoció recientemente como señalizador de daño de DSB inducidos por medio de micro-irradiación. Se reportó que esta marca co-localizaba con los focos de la variante de histonas  $\gamma$ H2A.X justo después de la inducción de daño y además con la proteína de respuesta a daño 53BP1. Además la eliminación de las proteínas encargadas de la desmetilación activa, comprometían la integridad genómica, evidenciándose en una incorrecta segregación de los cromosomas después de un estrés replicativo (Kafer et al., 2016).

Por lo cual, el estudio de las modificaciones de bases del DNA y sus enzimas catalizadoras ha ido cobrando importancia en los últimos años para explicar la respuesta al daño al DNA a nivel de cromatina.

### *Ten-eleven traslocation (TET)*

La enzima responsable de catalizar esta marca se identificó en el 2009, con el descubrimiento de las proteínas Ten-eleven-traslocation (TET) (Tahiliani et al., 2009). Se trata de una familia de dioxigenasas capaces de oxidar sucesivamente el grupo metilo de las citosinas metiladas para que sean eliminados. Esta familia de dioxigenasas esta compuesta por 3 miembros: TET1, TET2 y TET3 (Ten-eleven traslocation 1,2 y 3), y llevan este nombre debido a que se descubrieron en la traslocación t(10;11)(q22;q23) que fusiona a *MLL1* con

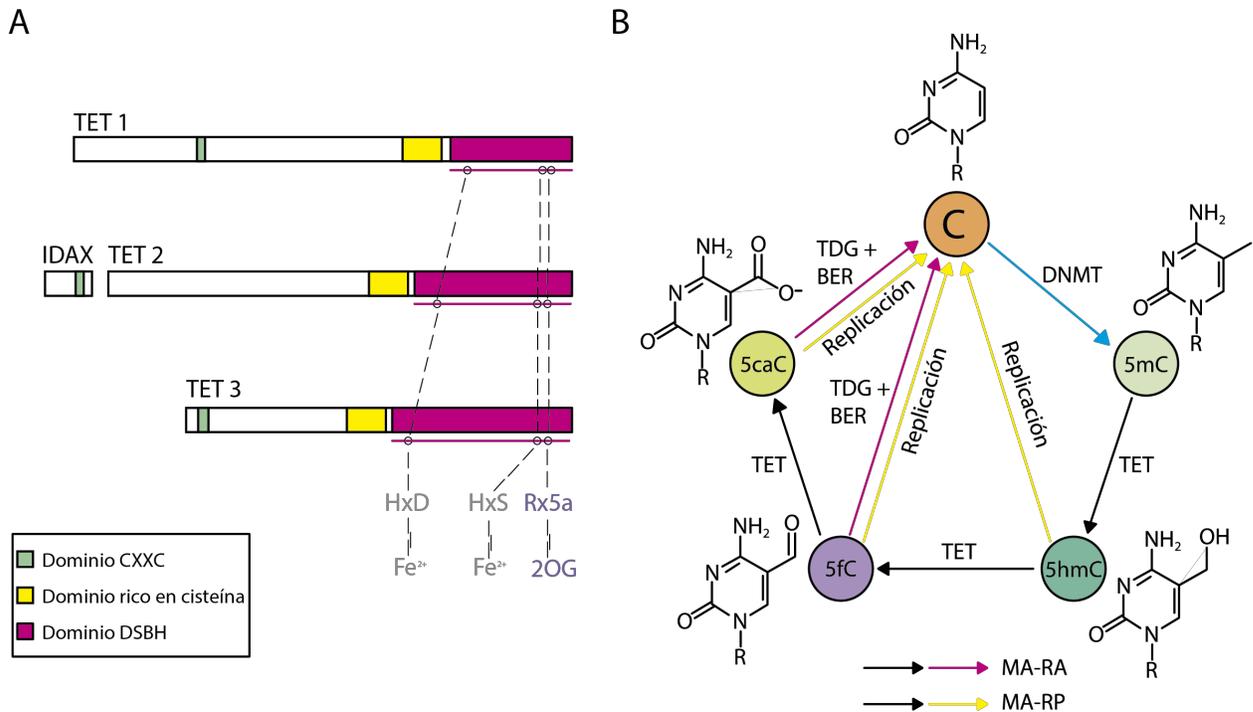
*TET1* en leucemias mieloides y linfoides agudas (Ko et al., 2013, 2015; Tahiliani et al., 2009). Estas enzimas son dependientes de Fe(II) y  $\alpha$ -cetoglutarato, además poseen una región catalítica en el extremo carboxilo rica en cisteínas, y de un dominio “double-stranded  $\beta$ -helix” (DSBH) que reconoce un motivo específico: His-X-Asp-(X)<sub>n</sub>-His. TET1 y TET3 contienen un dominio CXXC en el extremo amino terminal que pertenece a dedos de zinc lo que facilita la unión al DNA. Mientras que en TET2, dicho dominio se separó evolutivamente y ahora se codifica en un gen a parte llamado *IDAX* (Figura 3A, imagen modificada de Han, An, & Ko, 2015). Para que TET2 pueda unirse al DNA es necesario que forme un heterodímero con *IDAX*, también conocido como CXXC4 (Ko et al., 2013).

La dinámica de desmetilación del DNA puede ser pasiva o activa (Figura 3B, imagen modificada de X. Wu & Zhang, 2017), y es dependiente del tipo celular. Modificación activa-remoción pasiva (MA-RP) que diluye las modificaciones de citosinas por medio de la replicación y la modificación activa-remoción activa (MA-RA) que es independiente de la replicación. Esta modificación activa se realiza por medio de las TETs que realiza oxidaciones sucesivas del grupo metilo, generando oxi-mCs (modificaciones oxidadas de citosina):

*5-metilcitosina* → *5-hidroximetilcitosina* → *5-formilcitosina* → *5-carboximetilcitosina*

Forma simplificada: *5-mC* → *5-hmC* → *5-fC* → *5-caC*

Las últimas dos modificaciones pueden ser eliminadas a su vez por medio de una incisión por la glucosilasa de DNA de timina acoplado a BER (TDG-BER), restaurando la citosina no metilada en el DNA.



**Figura 3. TETs y mecanismo de desmetilación de la 5mC.**

**A.** Estructura y dominios de las TETs en humanos. El dominio rico en cisteína y dominio DSBH contienen actividad catalítica mientras que el dominio CXXC permite unión a DNA. El dominio CXXC de TET2 se encuentra en la proteína IDAX. **B.** Dinámica de metilación y desmetilación de la citosina. Modificación activa-remoción activa (MA-RA) en la cual las oxi-mCs generadas por las TETs son eliminadas por medio de TDG-BER. Modificación activa-remoción pasiva (MA-RP) en la cual las oxi-mCs generadas por las TETs son removidas por medio de la replicación.

En los últimos años se ha evidenciado que las oxi-mCs y las enzimas que lo catalizan juegan papeles importantes en diferentes funciones como desarrollo embrionario, desarrollo de las células primordiales, diferenciación, pluripotencia y funciones neuronales (X. Wu & Zhang, 2017). Además, alteraciones en las TETs se han relacionado con desmetilaciones aberrantes en cierto tipo de neoplasias, en especial destacan enfermedades linfoides y mieloides (Han et al., 2015). En la DDR, se ha descrito que de igual forma las TETS juegan un papel importante, el cual se describirá a continuación.

### *Las TETs y su papel en la respuesta al daño al DNA (DDR)*

Como se menciona antes, en el artículo de Kafer y colaboradores, se identificó que TET2 era la encargada de colocar la 5hmC como marca de daño de DSB la cual co-localizaba con  $\gamma$ H2A.X (Kafer et al., 2016). Otro mecanismo en el cual se ha descrito que TET2 es participe es en la protección contra el estrés oxidativo, donde se ha propuesto un modelo en el cual funciona con la metiltransferasa 1 (DNMT1) y protegen a la célula de metilación y 5hmC aberrante (Y. W. Zhang et al., 2017).

Sin embargo no solo TET2 se ha descrito en contexto de daño al DNA, sino también el resto de la familia. TET1 fue identificada como un modulador de la acetiltransferasa hMOF, influyendo directamente en la acetilación de la H4K16, un regulador río abajo de la expresión génica, la cual tiene como blanco algunos genes de reparación como *53BP1*, *RAD51*, *BRCA1* y *RAD50* (Zhong et al., 2016). Asimismo, se ha descrito a TET1 como un blanco de la cinasa ATM y defectos en TET1 conllevan a una desregulación en la señalización de daño, el ciclo celular y apoptosis (Coulter et al., 2017; Jiang et al., 2015).

Finalmente, se describió que la DDR por ATR promueve un cambio en los niveles de 5hmC, y esto es mediado por TET3, la cual es un blanco directo de esta cinasa. Al igual que el resto de la familia, cambios en TET3 y la 5hmC afectan directamente la señalización del daño y su reparación. Por lo cual la presencia de TET3 es necesaria para una correcta reparación del DNA y por consiguiente la estabilización genómica (Jiang et al., 2017).

Muchos de los mecanismos que mantienen la estabilidad genómica se han elucidado a través del estudio de enfermedades que tienen un defecto mendeliano en alguno de los sistemas de reparación y que se conocen como Síndromes de Inestabilidad cromosómica (SIC). Estas enfermedades funcionan como sistemas experimentales de los que se sirve la

investigación básica para entender mejor los procesos biológicos involucrados en la estabilidad genómica.

### **Anemia de Fanconi (AF): un Síndrome de Inestabilidad Cromosómica (SIC)**

Los SIC son un conjunto de enfermedades que presentan una falla en el mantenimiento genómico y reparación del DNA. En su mayoría se deben a mutaciones de origen mendeliano, que se transmiten de manera autosómica recesiva, en genes cuyos productos participan en la DDR y los procesos de reparación río abajo. Está evidenciado que presentan una tasa alta de re-arreglos cromosómicos por lo cual su susceptibilidad al desarrollo de diferentes cánceres es muy alta (Z. Wu, 2016).

Además comparten algunas características clínicas, como un sistema inmune comprometido, envejecimiento temprano y algunas manifestaciones neurológicas (Hanahan et al. 2010; Ciccia et al. 2012). En la actualidad se han clasificado muchas enfermedades como SIC, algunos de los ejemplos más claros son: ataxia telangiesctasia (AT), síndrome de Bloom y la anemia de Fanconi de la cual hablaremos a continuación.

### **Anemia de Fanconi (AF)**

La anemia de Fanconi (también conocido como FA por sus siglas en inglés) es una enfermedad en la cual la vía de reparación de enlaces covalentes cruzados (vía FA/BRCA) está comprometida. Este SIC fue descrito inicialmente en 1927 por el pediatra Guido Fanconi, quien describió a 3 hermanos que presentaban malformaciones congénitas y fallecieron secundario a una anemia con características similares a anemia perniciosa (Duxin & Walter, 2015). Al día de hoy, se han descrito 23 genes *FANC* (*Tabla 1*) (Bluteau et al., 2016; Ceccaldi, Sarangi, & D'Andrea, 2016; Park et al., 2016) que actúan de manera coordinada para reconocer y procesar estas lesiones.

La pérdida de función de alguna de las 23 proteínas FANC que participan en la vía FA/BRCA ocurre la mayoría de las veces debido a mutaciones bialélicas, exceptuando *FANCB* y *FANCR*, que tienen un patrón de herencia ligado al X recesivo y autosómico dominante respectivamente (Mamrak, Shimamura, & Howlett, 2016; Meetei et al., 2004).

La AF tiene una incidencia de 1 a 3 casos en 500,000 recién nacidos vivos (Bogliolo & Surrallés, 2015), sus principales manifestaciones clínicas son malformaciones congénitas, falla medular y un riesgo incrementado de presentar síndrome mielodisplásico (SMD), tumores sólidos de cabeza y cuello (Kottemann & Smogorzewska, 2013) y leucemia mieloide aguda (LMA) de hasta 800 veces más que la población en general (Kee & D'Andrea, 2012).

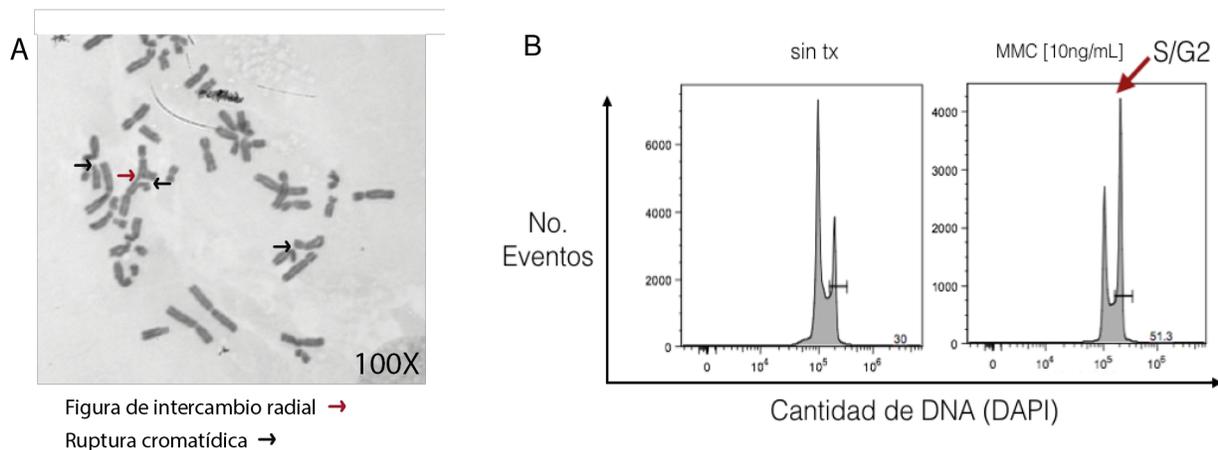
<b>Características de los genes FANC y su función</b>			
<b>Gen mutado/ Nombre alternativo</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<b>FANCA</b>	16q24.3	Complejo FA	(Apostolou et al., 1996; Lo Ten Foe et al., 1996)
<b>FANCB</b>	Xp.22.31	Complejo FA	(Meetei et al., 2004)
<b>FANCC</b>	9q.22.3	Complejo FA	(Strathdee, Duncan, & Buchwald, 1992)
<b>FANCD1/ BRCA2</b>	13q12.13	Recombinación homóloga y estabilización de la horquilla de replicación	(Howlett et al., 2002)
<b>FANCD2</b>	3p25.3	Se une a FANCI, formando complejo FANCI/FANCD2 Múltiples funciones	(Timmers et al., 2001)
<b>FANCE</b>	6q21.22	Complejo FA	(de Winter et al., 2000)
<b>FANCF</b>	11p15	Complejo FA	(de Winter et al., 2000)
<b>FANCG/ XRCC9</b>	9p13	Complejo FA	(de Winter et al., 2000)

<b>FANCI</b>	15q25.16	Forma complejo con FANCD2 Múltiples funciones	(Dorsman et al., 2007)
<b>FANCJ/ BRIP1</b>	17q22-q24	Recombinación homóloga Helicasa	(Levitus et al., 2005)
<b>FANCL</b>	2p16.1	Complejo FA E3 ubiquitin ligasa, ubiquitina a complejo FANCI/FANCD2	(Meetei et al., 2003)
<b>FANCM</b>	14q21.3	Reconoce ICL Complejo FA	(Meetei et al., 2005)
<b>FANCN/ PALB2</b>	16p12.1	Recombinación homóloga	(Reid et al., 2007)
<b>FANCO/ RAD51C</b>	17q25.1	Recombinación homóloga	(Vaz et al., 2010)
<b>FANCP/ SLX4</b>	16p13.3	Endonucleasa	(Kim et al., 2011)
<b>FANCQ/ ERCC4 /XPF</b>	16p13.12	Endonucleasa También funciona en NER	(Bogliolo et al., 2013)
<b>FANCR/ RAD51</b>	15q15.1	Recombinación homóloga y estabilización de la horquilla de replicación	(Ameziane et al., 2015)
<b>FANCS/ BRCA1</b>	17q21.31	Recombinación homóloga y estabilización de la horquilla de replicación	(Sawyer et al., 2015)
<b>FANCT/ UBE2T</b>	1q32.1	Complejo FA E2 ubiquitin ligasa para FANCI/FANCD2	(Virts et al., 2015)
<b>FANCU/ XRCC2</b>	7q36.1	Recombinación homóloga	(Park et al., 2016)
<b>FANCV/ REV7/ MAD2L2</b>	1p36	Síntesis traslesión	(Bluteau et al., 2016)
<b>FANCW/ RFWD3</b>	16q23.1	Recombinación homóloga	(Knies et al., 2017)
<b>FANCY/FAAP100</b>	17q25.3	Complejo FA	(Kuehl et al., 2018)

Tabla 1. Genes *FANC*: características y función.

Tabla con genes *FANC* hasta el momento descritos, su nombre común, localización cromosómica y función en la vía FA/BRCA.

Las manifestaciones clínicas son muy variables y algunas se pueden sobrelapar con el cuadro clínico de otros síndromes, por lo que el diagnóstico a partir del fenotipo clínico puede resultar difícil (Giampietro, Pavlakis, Verlander, Davis, & Auerbach, 1993). En cambio, el fenotipo celular es muy constante por lo cual se ha utilizado como una prueba diagnóstica. La hipersensibilidad de las células a agentes que causan enlaces covalentes cruzados (ICL) puede documentarse al observar en el microscopio óptico rupturas cromosómicas y figuras de intercambio radial (Figura 4A). Aunque la prueba en cultivo de linfocitos T de sangre periférica no es 100% específica es una de las pruebas más utilizadas en la actualidad. Existen otras técnicas que ayudan a documentar el fenotipo específico de las células deficientes en la vía FA/BRCA como el análisis de ciclo celular por citometría de flujo que permite demostrar que las células AF presentan un arresto en la fase tardía de S y temprana de G2 después de la inducción con ICLs (Figura 4B) (Oostra, Nieuwint, Joenje, & De Winter, 2012).



**Figura 4. Aberraciones cromosómicas y arresto en el ciclo celular de células AF.**

**A.** Aberraciones cromosómicas en células con anemia de Fanconi después de inducción de ICLs con 8-MOP (psoraleno). **B.** Arresto en ciclo celular S/G2 en células con fenotipo Fanconi después de la inducción de daño con MMC [10ng/mL].

### Enlaces covalentes cruzados (ICLs)

Los enlaces covalentes cruzados (ICL, por sus siglas en inglés) son un tipo de daño al DNA que afecta los procesos de replicación y transcripción al impedir la separación de las

hebras Watson y Crick del DNA; lo cual resulta tan perjudicial para la célula como el DSB, aunque ha sido menos estudiado. La exposición a este tipo de estímulos ha provocado que las células eucariontes desarrollen sistemas de reparación específicos para resarcir estos daños, puesto que si no se corrigen pueden tener como consecuencia mutaciones, rupturas cromosómicas o alteraciones en la segregación. Sin embargo, es justamente el efecto citotóxico de éstas lesiones, lo que ha llevado a usar agentes que causan este tipo de lesiones como piedras angulares en el tratamiento de neoplasias (Deans & West, 2011). Se estima que un sola célula solo puede resistir de 20-60 ICLs (Clauson, Schärer, & Niedernhofer, 2013),

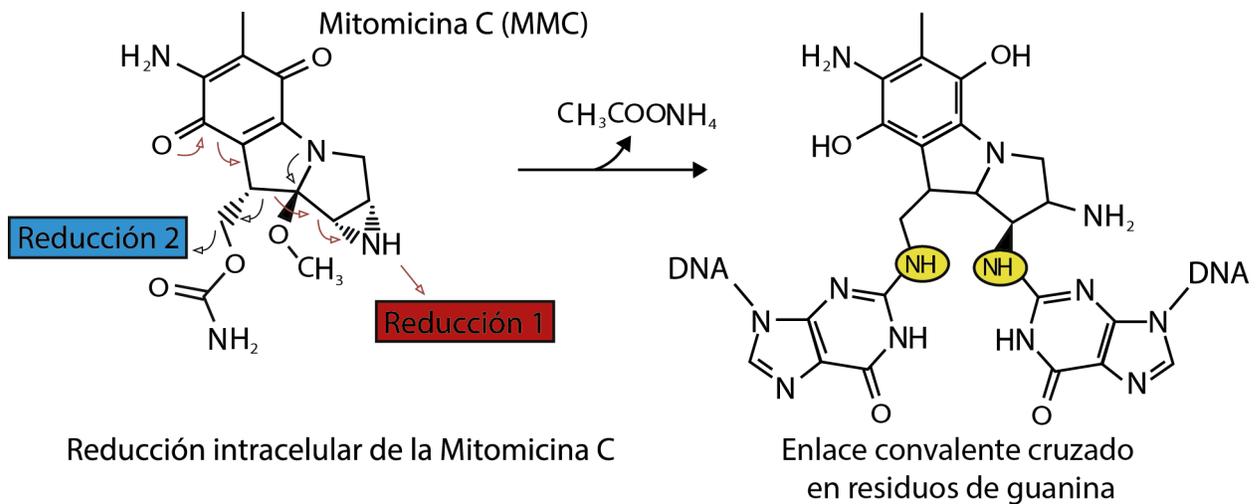
### Agentes Inductores Exógenos

La mayoría de los agentes utilizados en las quimioterapias son capaces de producir una gran variedad de lesiones como DSBs, ICLs y monoadductos. Algunos de los más utilizados son agentes sintéticos como los derivados de la mostaza nitrogenada, los compuestos platinados, y el DEB, pero también existen agentes derivados de compuestos naturales como la Mitomicina C (MMC) proveniente de microorganismos, y los psoralenos que son producto de plantas de la familia Apiaceae y Fabaceae. Todos estos agentes difieren en la frecuencia con que forman los distintos tipos de lesiones, así como la especificidad que tienen para formar ICLs con las bases y el grado de distorsión que causan en la doble hebra de DNA cuando los forman (Deans & West, 2011).

La Mitomicina C es un agente derivado de *S. caespitosus* que fue descubierto en la década de los 60's y ha sido ampliamente utilizado en terapias contra diferentes tipos de neoplasias (Bueren-Calabuig, Negri, Morreale, & Gago, 2012). Para poder ejercer su efecto al unirse al DNA, es necesario que este compuesto se reduzca. Una vez reducido, une a los

extremos 2-amino de dos guaninas que se encuentran en hebras complementarias de una secuencia CpG a través del surco menor de la hélice de DNA, causando una distorsión menor de la hélice (Figura 4, Imagen modificada de Deans & West, 2011). El tratamiento con MMC produce diversos tipos de lesiones al DNA; aunque el efecto anticancerígeno se atribuye principalmente a la formación de ICL, se calcula que solo representa 15 % de las lesiones mientras que los monoadductos son el daño predominante siendo aproximadamente el 50% (Lopez-Martinez, Liang, & Cohn, 2016).

No obstante, la MMC es uno de los agentes alquilantes recomendados y más utilizado para el ensayo de fragilidad cromosómica que se utiliza para diagnosticar la anemia de Fanconi (Oostra et al., 2012).



**Figura 5. Formación de un ICL por Mitomicina C (MMC).**

Para que la mitomicina C pueda ejercer su efecto de agente alquilante, tiene que sufrir dos reducciones (Izquierda). Una vez reducido se une a la secuencia CpG del DNA causando un enlace covalente cruzado (Derecha)

### Agentes Inductores Endógenos

Los enlaces covalentes cruzados también pueden formarse por agentes producidos endógenamente por la célula como los aldehídos. Uno de los aldehídos que abunda en la célula es el formaldehído, que es producto de la desmetilación de las histonas, desalquilación

del DNA metilado, y es un intermediario de la síntesis de algunos aminoácidos. Otro aldehído de producción endógena es el acetaldehído, que es un producto de la oxidación del etanol y un intermediario de la síntesis de carbohidratos (Lopez-Martinez et al., 2016).

### Vía FA/BRCA

Para hacer frente a los enlaces covalentes cruzados, la célula eucarionte ha desarrollado sistemas de reparación que le permiten mantener la estabilidad genómica. En particular, la vía FA/BRCA (Figura 6, Imagen modificada de Ceccaldi et al., 2016) es la responsable de reconocer y procesar estas lesiones de manera dependiente del ciclo celular en la fase S. Dicha vía se encarga del reconocimiento de los enlaces covalentes cruzados y de la coordinación de diversos procesos como la acción de nucleasas, la síntesis translesión (TLS), la recombinación homóloga (HR) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER) para que se lleve a cabo el procesamiento de dichos enlaces para lograr su correcta reparación.

Para que un enlace covalente cruzado sea reparado por medio de la vía FA/BRCA, es necesario que las dos horquillas de replicación converjan a un lado del enlace (Räschle et al., 2008). Cuando sucede (Figura 6A), el replisoma se detiene en la posición -20 del enlace covalente cruzado (Duxin & Walter, 2015). La estructura ramificada que se forma es reconocida a su vez por FANCM, FAAP24, MHF1 y MHF2 que reclutaran a las demás proteínas del complejo FA (Figura 6B).

El complejo se compone de 14 proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FANCY, MHF1, MHF2, FAAP20 y FAAP24) que tienen por función monoubiquitinar al complejo FANCD2/FANCI (Ceccaldi et al., 2016).

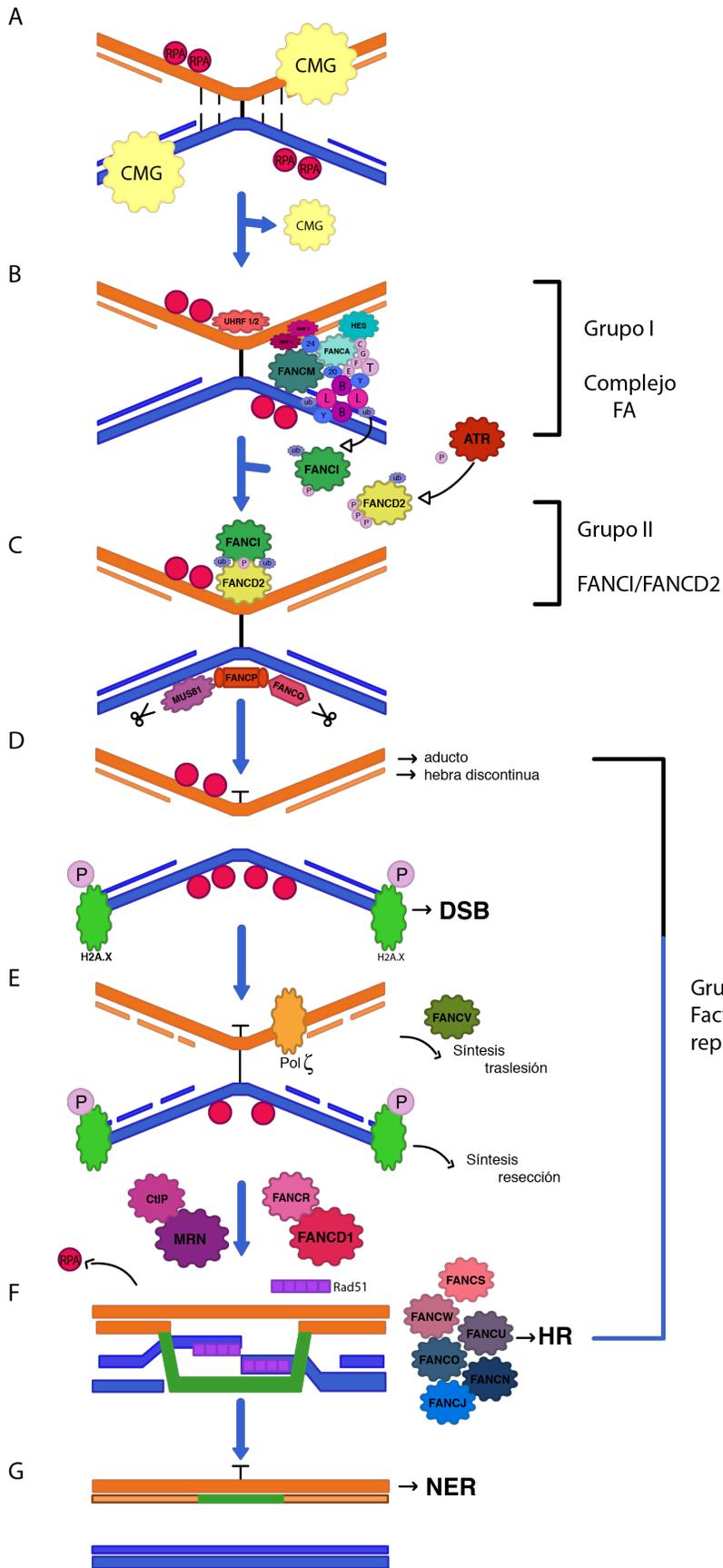
El complejo FANCD2/FANCI (Figura 6C) es un heterodímero que debe ser activado por dos modificaciones postraduccionales, primero una fosforilación dependiente de ATR y posteriormente la monoubiquitinación por el FA core, el cual es realizado por medio de la ubiquitin ligasa FANCL, que se encuentra con FANCB y FANCY junto con FANCC, FANCE y FANCF (Swuec et al., 2017).

Para que el heterodímero FANCI/FANCD2 pueda entrar y realizar su función, es necesario que el complejo de la helicasa CMG sea desalojado. Una vez que el complejo CMG es quitado, la hebra Watson avanza hasta la posición -1 del enlace covalente cruzado. FANCD2/FANCI monoubiquitinado a su vez recluta a las nucleasas FANCP, FANCQ y MUS81. Estos factores son los encargados de realizar la incisión nucleolítica dejando 3 tipos de lesiones: un ruptura de doble hebra, una hebra con un aducto y una hebra discontinua (Figura 6D). La polimerasa de síntesis traslesión  $\zeta$  o REV1 realiza síntesis de “bypass” (Figura 6E) para darle continuidad a la hebra que fue incidida por las nucleasas para liberar el ICL, mientras que el aducto resultante de ese procesamiento será reparado en la otra hebra por la vía NER. Esta doble hebra será el molde para la HR, en donde participarán otras proteínas FANC (Ceccaldi et al., 2016).

La HR, a su vez, consta de 3 pasos importantes: El primero es la resección de los extremos del DSB, en la cual FANCD2 colabora con RAD51 (también conocido como FANCR) para reclutar el complejo MRE11-RAD50-NBS1(MRN) con CtIP. A su vez, las exonucleasa EXO1, la helicasa BLM y DNA2 crean una hebra de DNA monocatenario (ssDNA) que será recubierta por RPA para estabilizarlo (Jazayeri et al., 2006).

El segundo paso, es la invasión de la hebra, la cual se da por medio de la remoción de RPA por RAD51 que es facilitada por BRCA2 (también conocido como FANCD1). El complejo

BRCA2 con PALB2 (también conocido como FANCN) a su vez promueve la invasión en búsqueda de la secuencia homóloga. Una vez que lo encuentra, sucede la síntesis de DNA y se extiende hasta capturar su otro extremo, formando una estructura con dos intermediarios de Holliday. Dando lugar al paso 3: la resolución de las uniones de Holliday, en la cual participan las resolvasas FANCP-MUS81-SLX1 o GEN1 (Michl, Zimmer, & Tarsounas, 2016). Generando así un dúplex de doble hebra de DNA (Figura 6G), y dando por concluida la reparación del ICL por medio de la vía FA/BRCA.



**Figura 6. Vía FA/BRCA**

El dúplex de DNA se encuentra ilustrado en dos colores para poder seguir la continuidad de la reparación del ICL. **A.** Las horquillas de replicación se detienen por la presencia de un ICL. **B.** El ICL es reconocido por FANCM y UHRF1/2. El complejo FA es reclutado al sitio del ICL. **C.** El complejo FA recluta y monoubiquitina a FANCI/FANCD2, al mismo tiempo es fosforilado por ATR. Nucleasas son reclutadas al sitio del ICL. **D.** Se realiza una incisión nucleolítica que deja 3 tipos de lesiones: aducto, hebra discontinua y DSB. **E.** La hebra discontinua es reparada por síntesis traslesión y se hace procesamiento de los extremos del DSB. **F.** Reparación de la DSB por medio de recombinación homóloga. **G.** Restauración del dúplex de DNA y reparación del aducto por NER.

## Regulación y señalización epigenética en FA/BRCA

Desde la descripción inicial del cuadro clínico de la AF a inicios del siglo XX, se han hecho contribuciones significativas sobre los fenotipos clínico y celular de la enfermedad. Se ha logrado la identificación de la causa genética de la enorme mayoría de los casos, además de que actualmente se conocen de manera precisa las consecuencias de una vía FA/BRCA deficiente. A pesar del claro avance que implica dicho conocimiento, aún se está lejos de comprender los procesos que permiten la regulación de la cromatina, conocidos como mecanismos epigenéticos y constituyen un área prácticamente inexplorada en el marco del reconocimiento y procesamiento de los enlaces covalentes cruzados.

Un estudio en pacientes AF identificó alteraciones epigenéticas, basándose en la expresión de genes de la maquinaria de regulación epigenética, entre ellas menor expresión de proteínas que forman parte de la maquinaria de metilación del DNA (*DNMT3B* y *DNMT1*), desacetilasas de histonas (*HDAC2/8/9/10/11*), una metiltransferasa de histonas (*SETD6*), un elemento regulador de la transcripción (*CIITA*), una cinasa parte de señalización celular (*PAK1*), desubiquitinasa (*USP16*) y una proteína del complejo Polycomb (*RNF2*); además de la hipometilación en promotores de genes supresores de tumor, por lo cual sugieren que la maquinaria epigenética y la metilación del DNA están afectas en pacientes con AF (Belo et al., 2015).

Recientemente se identificó que UHRF1 y UHRF2, ubiquitín ligasas y remodeladores de cromatina, son sensores de los enlaces covalentes cruzados (C. C. Liang et al., 2015; Motnenko et al., 2018). Estas proteínas son necesarias para la retención y monoubiquitinización de FANCD2 en el sitio de daño. Sus papeles exactos en la vía canónica siguen siendo investigados y otras posibles funciones como remodelador de la cromatina no se ha descrito todavía en la vía FA/BRCA (C.-C. Liang & Cohn, 2016).

Así mismo se ha descrito la interacción entre la acetiltransferasa TIP60 con FANCD2, esta interacción parece ser necesaria para un correcto funcionamiento de la vía FA/BRCA por lo que se ha propuesto que TIP60 participe río abajo de la vía (Hejna et al., 2008). TIP60 se encarga de acetilar H4K16, dicha modificación (H4K16ac) impide el acceso a 53BP1 a H4K20me2, favoreciendo la HR en vez de NHEJ (Tang et al., 2013). La pérdida de función de alguna de las proteínas de la vía FA/BRCA resulta en la acumulación de 53BP1, por una falla en la relocalización de TIP60 en la cromatina dañada, y eso favorece a su vez la reparación por NHEJ (Renaud, Barascu, & Rosselli, 2015). Además, un estudio reciente donde se observaron las MPTs como H4K20me2, H3K9me3 y la variante de histonas  $\gamma$ H2A.X, en células con inducción de daño de ICLs, presentaban una asociación hacia la vía HR, lo cual no se observaba en células con un vía FA/BRCA deficiente donde la NHEJ era favorecida (Ayala Zambrano, 2017).

A pesar de que ya se conoce que las células AF favorecen la reparación hacia NHEJ y algunas marcas de MPTs marcan hacia esa vía de reparación. Todavía no se ha caracterizado por completo como es el reconocimiento y señalización del daño tipo ICL en la cromatina. Conviene recalcar que el daño también puede ser marcado en el mismo DNA, como Kafer y colaboradores demostraron en el 2016 en el cual describieron a la 5hmC como marca de daño (Kafer et al., 2016). Por lo cual podemos suponer que la señalización de un ICL no solo sucede a nivel de histonas, sino también la 5hmC pudiera estar presente y en consecuencia las TETs podrían estar participando en la señalización y decisión de reparación.

## Antecedentes directos

El laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría (INP) ha sido el centro de referencia para pacientes con anemia de Fanconi en México durante muchos años. Y se ha dedicado a estudiar el mecanismo molecular de la vía FA/BRCA, así como las implicaciones clínicas que tiene su desregulación.

En los últimos años se ha enfocado al entendimiento de la vía por medio de un enfoque epigenético. En un estudio realizado por Ayala-Zambrano, se describió que las células FA con inducción de daño de ICLs, se generan MPTs que favorecen la unión de proteínas de la vía NHEJ, al contrario de una célula con una vía FA/BRCA integra en la cual la HR es la vía predilecta.

## Planteamiento del problema

Los estudios en la vía FA/BRCA se han limitado a estudios sobre el mecanismo genético, por ende se desconoce como sucede el procesamiento de los enlaces covalentes cruzados a nivel de cromatina. Los mecanismos epigenéticos que permiten la regulación de la cromatina constituyen un área prácticamente inexplorada, por lo cual estudios de esta índole son necesarios para el entendimiento de la vía FA/BRCA y por consecuencia la estabilidad del genoma.

Se ha visto que existen MPTs que favorecen hacia NHEJ después de la inducción de ICL en células AF (Ayala Zambrano, 2017). En cuanto a nivel de modificaciones de citosinas, se desconoce si el daño es señalado de la misma manera que un DSB directo. Por lo cual nos hemos preguntado si la 5hmC marca de igual manera los ICLs o DSB-I y si es afectado con la integridad de la vía FA/BRCA.

## Pregunta de investigación

¿La reparación de los enlaces covalentes cruzados por la vía FA/BRCA genera rupturas de doble cadena marcadas por 5hmC? ¿Cambia dependiendo de la integridad de la vía FA/BRCA?

## Justificación

Los enlaces covalentes cruzados (ICLs) son lesiones del DNA que comprometen procesos fundamentales en las células eucariontes, por lo que la reparación correcta de estas lesiones es vital para la estabilidad del genoma. Una reparación incorrecta de este tipo de lesiones puede contribuir al desarrollo de cáncer. El estudio de la 5hmC y las TETs permitirá examinar un aspecto hasta ahora desconocido en los mecanismos necesarios para el procesamiento de este tipo de lesiones, además de contribuir a un mejor entendimiento del proceso de reparación.

## Hipótesis

La 5-hidroximetilcitosina es una marca de señalización de daño en la ruptura de doble hebra intermediario de la reparación de los enlaces covalentes cruzados.

## Objetivo general

Identificar a la 5hmC como marca de DSB producto de la reparación de los ICLs en un modelo de anemia de Fanconi.

## Objetivos particulares

En las líneas GM6914 +A y GM6914 +EV ante inducción de daño con MMC:

1. Evaluar la expresión de los genes *TET1*, *TET2* Y *TET3*.
2. Evaluar el patrón de localización de 5hmC y  $\gamma$ H2A.X

## Diseño experimental

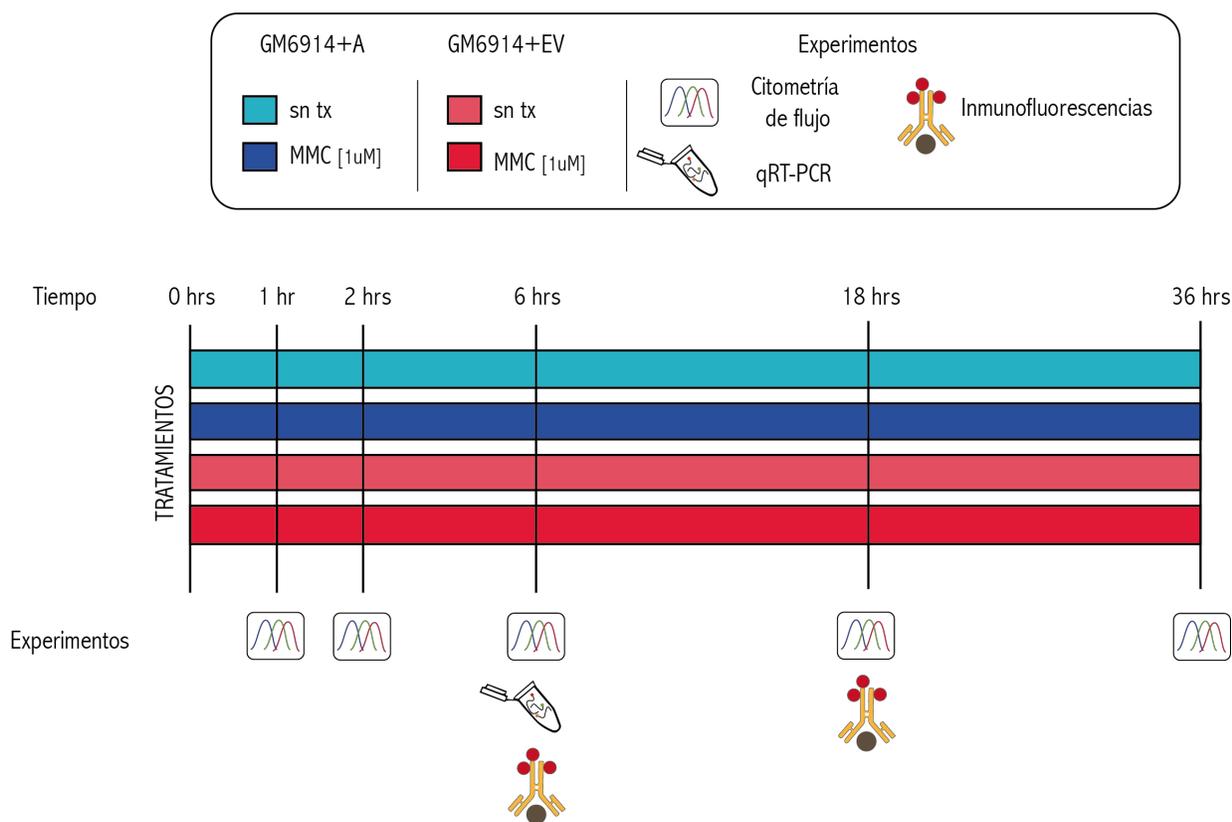
Para cumplir los objetivos del proyecto se utilizaron las líneas celulares fibroblásticas derivadas de un paciente con AF-A: GM6914 +EV y su línea corregida GM6914 +A (donativo de D'Andrea's Lab, Dana-Faber Cancer Institute Harvard Medical School). Las células GM6914 fueron mantenidas en medio DMEM suplementados con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA) y 1% de Penicilina-Estreptomicina en cajas Petri.

Se trataron células en fase logarítmica de crecimiento con MMC (Sigma, St. Louis, MO) 1  $\mu$ M a diferentes tiempos: 1, 2, 6, 18 y 36 hrs (Figura 7).

Para conocer la distribución del ciclo celular y el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2A.X a las 1, 2, 6, 18 y 36 horas después del tratamiento con MMC [1  $\mu$ M] se realizó un ensayo de citometría de flujo con el kit de Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation (BD Pharmingen). La citometría de flujo se realizó en el equipo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) y se adquirieron un total de 20,000 eventos para el análisis. Los datos fueron analizados utilizando FlowJo versión 10.4.2 (FlowJo, LLC).

Se extrajo RNA con TRIZol y el Kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA) a las 6 horas para la realización de una qRT-PCR contra *TET1*, *TET2* y *TET3* utilizando el Kit LightCycler® TaqMan® Master y Universal Probes (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un equipo Light Cycler 2.0 Carousel Roche.

Por último se realizaron inmunolocalizaciones a las 6 y 18 horas contra las marcas 5hmC y la variante de histonas de señalización de DSBs:  $\gamma$ H2A.X. Los anticuerpos primarios utilizados fueron  $\gamma$ H2A.X (Genetex, GTX628789) y 5hmC (Active Motif, Cat. 39769) se diluyeron 1:500 y 1:75 respectivamente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-mouse A564 (Red Life, A11031) diluido 1:200 y anti-rabbit (Molecular Probes, A21441) diluido 1:500. Para la lectura de las inmunofluorescencias se usó el microscopio Carl Zeiss Axio Imager Z1 en un objetivo de 100X y el análisis de imágenes se usó el programa ZEN (Carl Zeiss). Para más detalle ver sección “Métodos en extenso”.



**Figura 7. Estrategia experimental.**

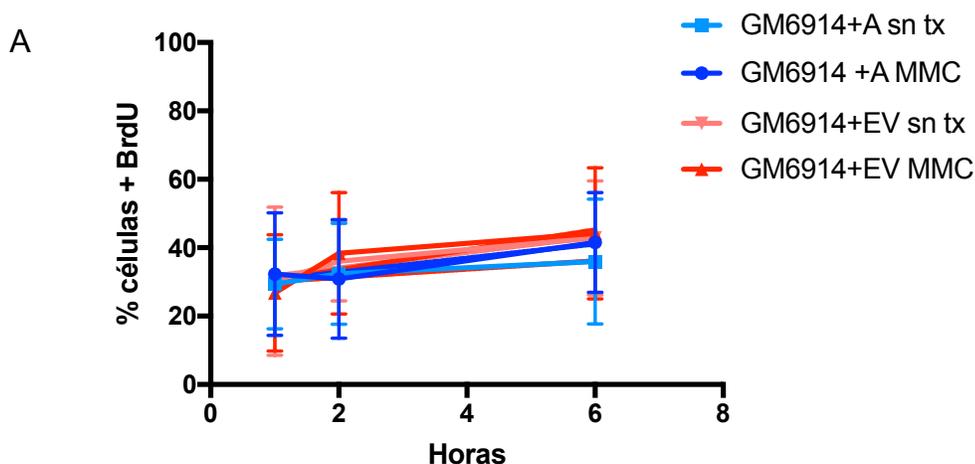
Esquema de estrategia experimental realizada durante el proyecto. En azul claro se representan las células GM6914+A sin tx y en azul oscuro a las GM6914+A con MMC [1  $\mu$ M]. En rojo claro, las células GM6914+EV sin tx y en rojo las GM6914+EV con MMC [1  $\mu$ M]. En la parte superior se encuentran los tiempos utilizados (1,2,6,18 y 36 hrs) y en la parte inferior los experimentos realizados a dichos tiempos (citometría de flujo, qRT.PCR e inmunofluorescencias).

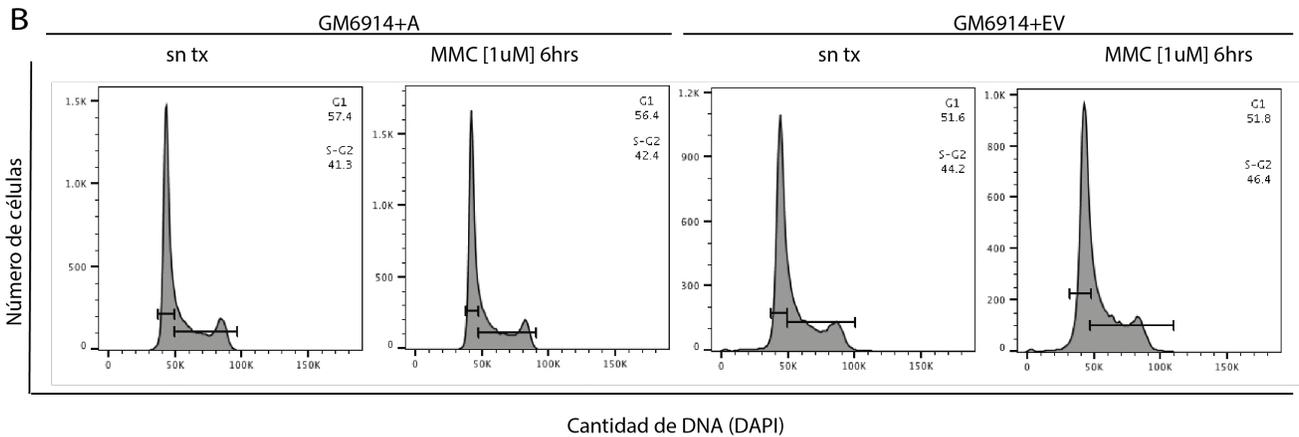
## Resultados y Discusión

### 1. Establecimiento de tiempo para el tratamiento con Mitomicina C

Se realizó un análisis de ciclo celular, porcentaje de  $\gamma$ H2AX e incorporación de BrdU (bromodexouridina) por medio de citometría de flujo en las células tratadas con 1  $\mu$ M de MMC. Se hicieron cazas a las 1, 2 y 6 horas después de administrar el tratamiento con MMC + BrdU (Figura 7).

La incorporación de BrdU para ambas líneas tuvo un patrón similar y no cambió conforme al tratamiento (Figura 8A), aunque se ha especulado que los enlaces covalentes cruzados pueden bloquear o impedir la replicación (Duxin & Walter, 2015; Räsche et al., 2008). Kehrlí y Sidorova proponen que estos alteran el proceso disminuyendo la densidad de las horquillas de replicación activas pero no la progresión de la replicación por lo cual la incorporación de BrdU no cambia significativamente durante las primeras horas post-tratamiento (Kehrlí & Sidorova, 2014). El ciclo celular en ambas líneas celulares no se ve afectado por el tratamiento inclusive después de 6 horas (Figura 8B).



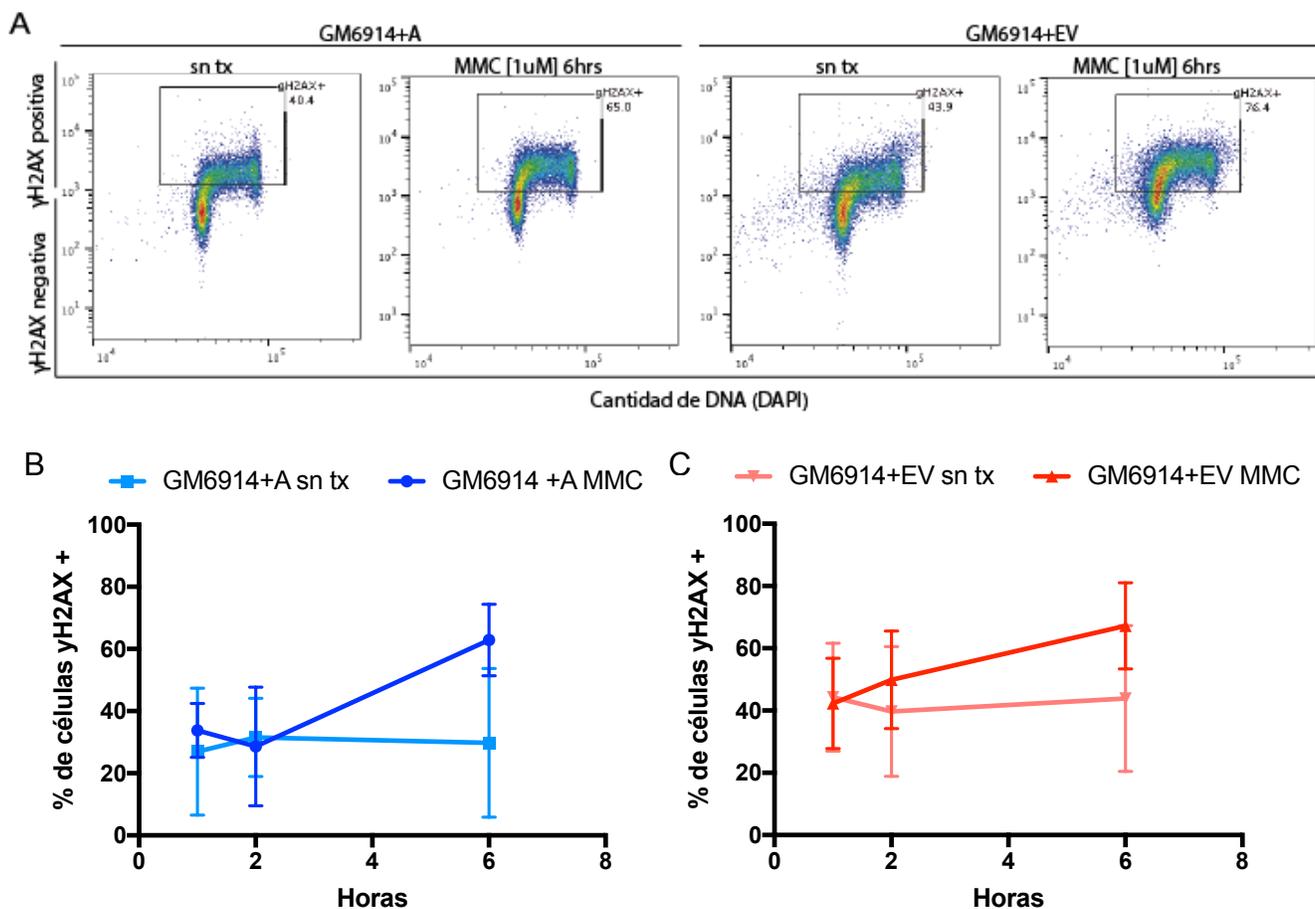


**Figura 8. La incorporación de BrdU y ciclo celular es similar independientemente de la línea celular y el tratamiento.**

**A.** Porcentaje de células positivas para BrdU a las 1,2 y 6 horas en células GM6914+A y +EV con y sin tratamiento de MMC [1  $\mu$ M] ( $n=3 \pm$  DE). **B.** Ciclo celular de células GM6914+A y +EV con y sin tratamiento de MMC a las 6hrs [1  $\mu$ M]. Al igual que la incorporación de BrdU, el ciclo celular se mantiene similar en todas las condiciones.

En cuanto a la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), una marca de daño característica de DSB, en ambas líneas celulares se presentan niveles basales, siendo más evidente en las células Fanconi (GM6914+EV) con aproximadamente 40% (Figura 9A) de células positivas para la marca. Este fenómeno también se ha visto en la línea celular Fanconi GM166333 que pertenece al grupo de complementación como FANCD2 (datos no publicados, Laboratorio Citogenética INP).

Una vez que se aplicó el tratamiento, hay un aumento del porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX que alcanza aproximadamente un 70% en ambas líneas celulares a las 6 horas posteriores al tratamiento (Figura 9A-C). Por ende se identificó que a las 6 horas era tiempo suficiente para la obtención de DSB con el tratamiento de MMC. Además se ha reportado que con esa dosis y tiempo se pueden observar foci de Rad51 co-localizando con  $\gamma$ H2AX en las líneas GM6914 (H. Zhang et al., 2016). Una vez definido el tiempo, se procedió con el análisis de mRNA de las proteínas de interés.



**Figura 9.** Las células positivas para  $\gamma$ H2AX aumentan después del tratamiento con MMC.

**A.** Las células positivas para  $\gamma$ H2AX aumentan después de 6 hrs de tratamiento. Gráfica de dos parámetros que muestra  $\gamma$ H2AX en el eje de las Y contra cantidad de DNA en el eje de las X. **B-C.** Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX posterior a 1,2 y 6 horas de tratamiento con MMC [1  $\mu$ M] **B.** Cinética de células GM6914+A. **C.** Cinética de células GM6914+EV (n=3  $\pm$  DE).

## 2. Análisis de expresión relativa de mRNA de *TET1* y *TET3* en células Fanconi y células corregidas

Se evaluaron los niveles de mRNA de las proteínas responsables de la desmetilación activa de DNA, Ten-eleven traslocation (TETs), basales y después de la inducción de daño con MMC. Para ello se utilizó la fórmula propuesta por Pfaffl en 2001 en la cual se analizan los CP (punto de cruce) de un gen de referencia contra el gen de interés en los controles y experimentales (Pfaffl, 2001).

En las siguientes gráficas se muestran los cambios en la expresión relativa del mRNA en las diferentes condiciones experimentales (Figura 10 y 11). Los genes evaluados fueron *TET1*, *TET2* y *TET3*; la expresión relativa fue obtenida con respecto al gen de referencia 7SL (Anexo, Tabla 5). Los datos fueron normalizados con respecto a la línea celular no Fanconi GM6914+A. No se observó expresión de *TET2* en ambas líneas celulares, por lo cual se descartó el análisis de la expresión de este gen y solo fueron evaluados los mRNA de *TET1* y *TET3*.

Para el gen *TET1* (Figura 10) se observó una tendencia al aumento en la expresión relativa del gen después del tratamiento en la línea GM6914+A ( $p=0.1132$ ), al contrario del GM6914+EV en el cual desde un inicio sin el tratamiento la expresión es mayor y parece disminuir después del tratamiento ( $p=0.3909$ ).

En cuanto a *TET3* (Figura 11) en ambas líneas celulares se observó una tendencia a aumentar en la expresión relativa después del tratamiento con MMC, aunque este aumento no resultó ser estadísticamente significativo (GM6914+A  $p=0.5240$ , GM6914+EV  $p=0.8458$ ).

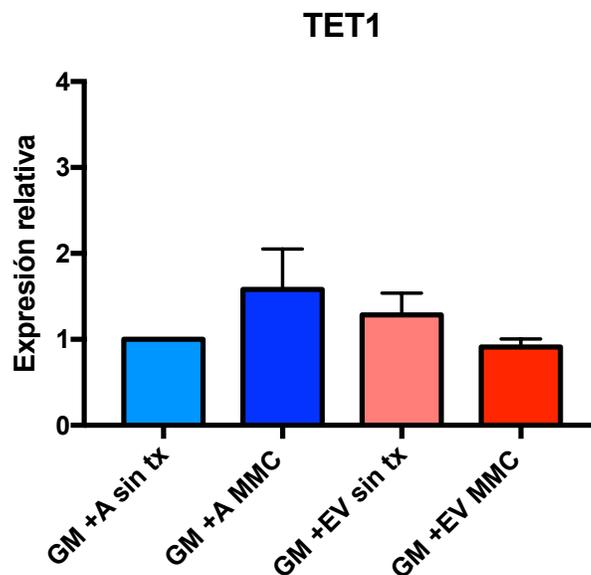


Figura 10. Expresión relativa del gen *TET1* en células GM+6914+A y GM6914+EV después del tratamiento con MMC [1  $\mu$ M] durante 6 horas ( $n=3 \pm DE$ ).

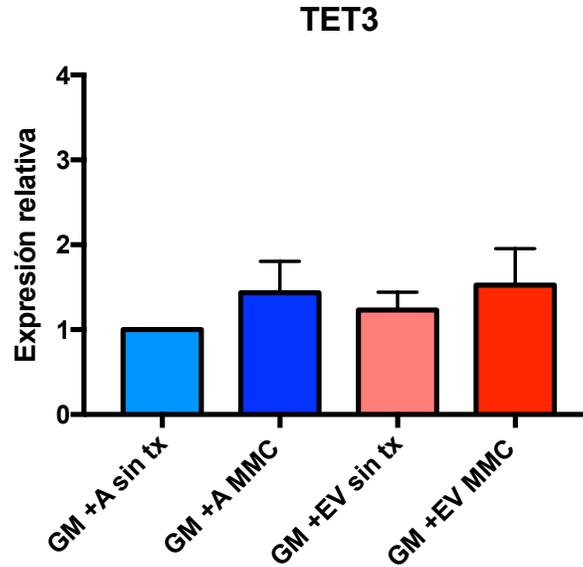


Figura 11. Expresión relativa del gen *TET3* en células GM6914+EV y GM6914+A después de tratamiento con MMC [1  $\mu$ M] durante 6 horas ( $n=3 \pm$  DE).

Las proteínas TET1 y TET3 juegan un papel importante en la DDR pero su función y regulación no ha sido caracterizadas por completo. El patrón de expresión relativa para las células GM6914+A y GM6914+EV parece ser diferente en el gen *TET1* después de la inducción de daño. Debido a que no existen cambios significativos no se puede asumir que es debido a la integridad de la vía FA/BRCA.

La tendencia al aumento en la expresión relativa de *TET3* puede ser a causa de su función de desmetilación activa a la respuesta de daño como ya se había previamente descrito, aunque este aumento no sea estadísticamente significativo, cabe la posibilidad que el aumento en la desmetilación activa que se ha reportado ante inducción de daño sea en primera instancia a nivel de actividad enzimática y no el mRNA. Como se mencionó previamente, TET3 ha sido reportado como blanco de la cinasa ATR y juega un papel importante en la activación de la DDR dependiente de esta cinasa (Jiang et al., 2017). Es importante recalcar que ATR es una de las cinasas encargadas de activar al heterodímero FANCD2/FANCI y se ha visto que ATR se encuentra sobre-expresado a nivel de mensajero

en células linfoblásticas Fanconi deficientes en FANCA (datos no publicados, Sosa-Sánchez et al., Laboratorio de Citogenética INP) y por lo cual también su nivel de proteína se vería afectada.

Aunque no existe un aumento significativo en los mensajeros de las TETs se ha visto que puede haber cambios en los niveles de uno de sus productos (5hmC) sin que los niveles de proteína y mRNA de las TETs se vean afectados, inclusive después de un tratamiento con un agente inductor de daño por tiempo prolongado (Jiang et al., 2015, 2017; Song et al., 2018) Por ello se procedió a evaluar a la marca directamente por inmunofluorescencias (IF) después de la inducción de daño tipo enlace covalente cruzado.

### **3. Evaluación de la co-localización de las marcas 5-hmC y $\gamma$ H2AX a las 6 horas de tratamiento**

Con la finalidad de determinar si existe una co-localización entre las marcas de desmetilación activa (5hmC) y la marca de daño  $\gamma$ H2AX se realizaron inmunofluorescencias (IF) dobles con anticuerpos para ambas marcas. Primero se contabilizó el número de foci de  $\gamma$ H2AX por célula con y sin tratamiento para determinar si existe diferencia entre tratamientos o línea celular. No se encontraron diferencias en el número de foci por célula entre células normales y células Fanconi lo que sugiere que la funcionalidad de la vía FA/BRCA por deficiencia de FANCA no afecta la señalización de daño a nivel de la variante de histonas. Después del tratamiento, hay un aumento en el número de foci por célula en ambas líneas celulares (Figura 12A), aunque dicho aumento no es significativo puede ser debido a que para que ocurra el reconocimiento del ICL debe haber estancamiento de las horquillas de replicación en ambos lados (Räschle et al., 2008). Dado que las células se encuentran en un cultivo asincrónico, algunos de los ICLs generados podrían estar en zonas que todavía no se han replicado por lo cual el reconocimiento y procesamiento se dará más tarde, motivo por el

cual el número de foci de  $\gamma$ H2AX por célula es variable. Este comportamiento se ha visto con otro agente inductor de ICLs (TMP+UVA) en tiempos tempranos después de la inducción de daño (Ayala Zambrano, 2017).

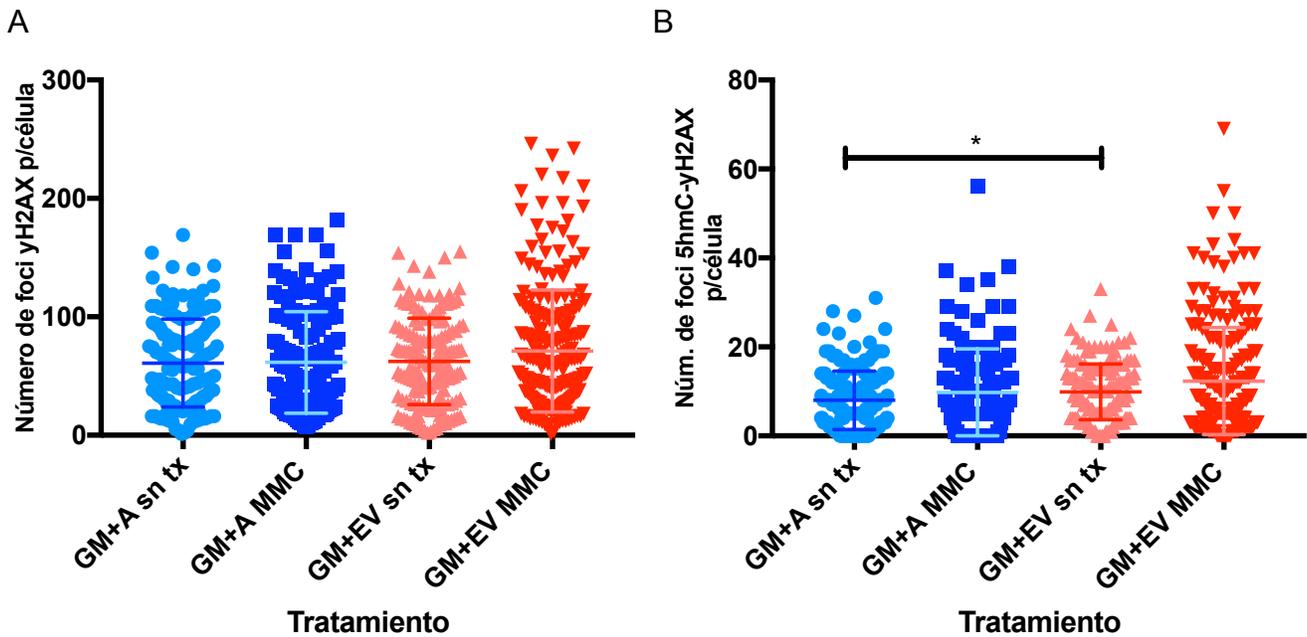


Figura 12. El número de foci de  $\gamma$ H2AX no varía dependiendo de la funcionalidad de la vía FA/BRCA ni después de tratamiento con MMC durante 6 horas. La  $\gamma$ H2AX-5hmC se ve favorecidas en las células GM6914+EV.

Se contaron el número de foci  $\gamma$ H2AX en 174 células GM+A sin tratamiento (azul claro), 140 células GM+A MMC (azul), 161 células en GM+EV sin tratamiento (coral) y 234 en células GM+EV MMC (rojo). **A.** No hubo diferencias significativas entre las líneas celulares ( $n=2 \pm$ DE). **B.** Hubo diferencias significativas entre las líneas celulares ( $p \leq 0.05$ ) ( $n=2 \pm$ DE).

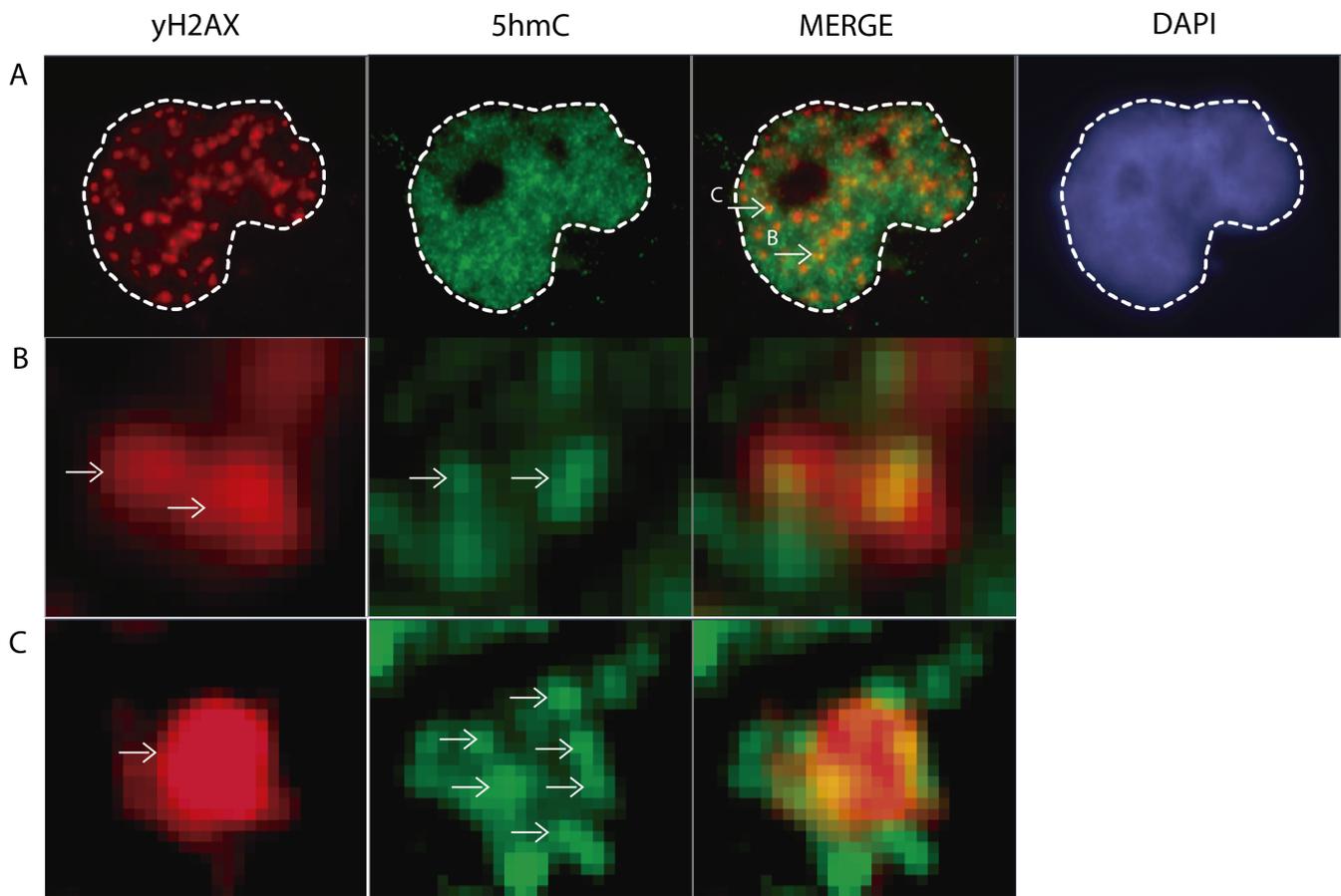
Después se realizó el análisis de la  $\gamma$ H2AX en conjunto con la 5hmC, el cual evidenció que algunas de estas marcas co-localizaban entre sí en algunos foci y esto aumentaba con el tratamiento de MMC.

Ambas líneas celulares presentaban  $\gamma$ H2AX basal, por lo que desde un inicio se observaron foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC (Figura 12B). Las líneas celulares sin tratamiento tienen una diferencia entre la asociación  $\gamma$ H2AX-5hmC viéndose favorecidas en las células GM6914+EV ( $p=0.0319$ ). Una vez aplicado el tratamiento existe un aumento en el número de foci con esta asociación en ambas líneas celulares, aunque este no es significativo. La marca de la 5hmC junto con la  $\gamma$ H2AX ha sido asociada a la proteína 53BP1 una proteína involucrada en la

decisión de reparación hacia la NHEJ (Kafer et al., 2016). Este aumento en los foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC puede ser debido a que en las células Fanconi, la reparación de los ICLs no se realiza por HR debido a la deficiencia de la vía de reparación. Trabajos previos en el laboratorio identificaron que MPT asociadas a la vía NHEJ (H4K20me2 y H3K9me3) se favorecen sobre MPT de HR en células Fanconi después de la inducción de daño en tiempos tempranos después de la inducción de daño (Ayala Zambrano, 2017). Lo que hace pensar que la señalización hacia NHEJ no sólo ocurre a nivel de histonas sino que también ocurre a través de modificaciones químicas del DNA. No obstante, se tiene que tomar en cuenta que es un cultivo asincrónico, por lo cual las células están en diferentes fases de ciclo celular el cual es importante para la decisión de la reparación (Papamichos-Chronakis & Peterson, 2013).

El análisis de los datos reveló que existen dos tipos de localización de la marca 5hmC con respecto a  $\gamma$ H2AX (Figura 13). En algunos foci, la co-localización es superponible ó coincidente (Figura 13B) mientras que en otras la marca 5hmC se encuentra en la periferia del foci de  $\gamma$ H2AX (Figura 13C). Debido a que para el análisis se utilizó un microscopio de fluorescencia, no se puede asumir co-localización como tal, pero se observó este fenómeno en más de una célula y muestra, por lo cual se documentó y se clasificaron los foci observados de la siguiente manera:

- $\gamma$ H2AX Coincidente 5hmC ( $\gamma$ H2AX-C-5hmC)
- $\gamma$ H2AX Periferia 5hmC ( $\gamma$ H2AX-P-5hmC)



**Figura 13. Ejemplo de distribución de la co-localización de  $\gamma$ H2AX-5hmC.**

Imágenes obtenidas de la microscopía de fluorescencia en células GM6914, se señala con flechas los foci de interés. **A.** Célula completa mostrando distribución de las marcas. **B.** Distribución de la 5hmC superponible a la  $\gamma$ H2AX. **C.** Distribución de la 5hmC en la periferia de la  $\gamma$ H2AX.

#### 4. Análisis $\gamma$ H2AX-C-5hmC y $\gamma$ H2AX-P-5hmC

Al realizar el análisis de las imágenes de inmunofluorescencia con estas dos localizaciones (Figura 13), se observó que de manera basal, las células GM6914+EV tienen un mayor número de foci  $\gamma$ H2AX-P-5hmC que la línea celular isogénica corregida ( $p=0.0083$ ).

Una vez aplicado el tratamiento con MMC, hay un incremento tanto en el número de foci de  $\gamma$ H2AX-C-5hmC como  $\gamma$ H2AX-P-5hmC (Figura 14) por célula, que es más evidente en las células GM6914+EV cuando se compara con la línea corregida GM6914+A. En ambos grupos, este cambio no fue significativo entre tratamientos o línea celular y puede deberse a

múltiples factores como la heterogeneidad entre cada réplica debido al cultivo asincrónico, además de la posibilidad de que en el tiempo seleccionado solo una proporción de células esté procesando los ICLs y que las demás aun requieran completar su ciclo celular para que los ICLs se procesen.

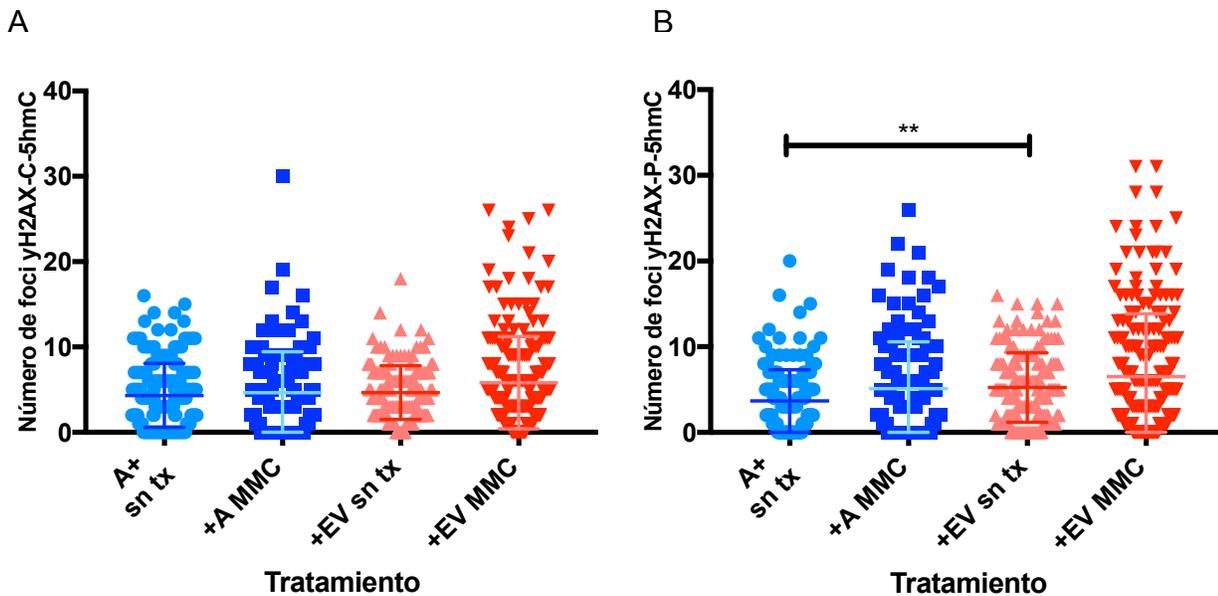
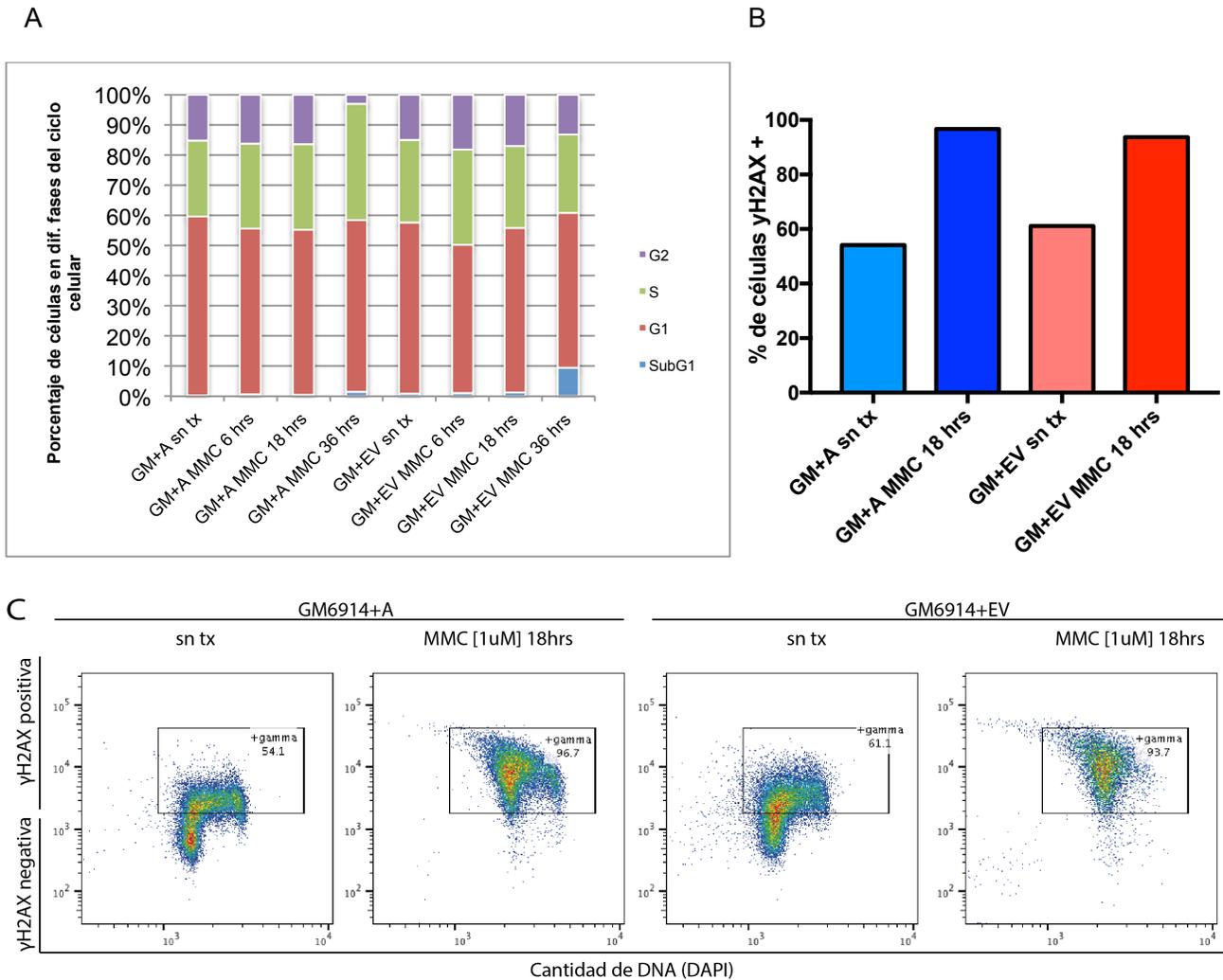


Figura 14. La  $\gamma$ H2AX-P-5hmC y  $\gamma$ H2AX-C-5hmC aumentan ligeramente con el tratamiento de MMC a las 6 hrs.

**A.** Foci de  $\gamma$ H2AX-C-5hmC por célula. El número de foci  $\gamma$ H2AX-C-5hmC parece variar ligeramente con el tratamiento de MMC. **B.** Foci de  $\gamma$ H2AX-P-5hmC por célula. En estado basal, existe una diferencia significativa en el número de foci  $\gamma$ H2AX-P-5hmC entre las líneas celulares ( $p=0.0083$ ). Se ve un aumento en el número de foci  $\gamma$ H2AX-P-5hmC con el tratamiento pero este no es significativo ( $n=2 \pm DE$ ).

Sin embargo, en la literatura está reportado que los agentes MMC y cisplatino generan un aumento de la 5hmC global a las 18 y 36 horas posteriores al tratamiento (Song et al., 2018). Por lo que es posible que a las 6 horas aun haya una proporción importante de células que no han pasado por fase S y que no hayan aun reconocido los ICLs que se generaron con el tratamiento con MMC. Tomando en cuenta esto, se realizó un análisis por citometría de flujo para ver ciclo celular y  $\gamma$ H2AX a dichos tiempos.



**Figura 15. Aumento de células positivas para  $\gamma$  H2AX después de 18 hrs de tratamiento y cambios en el ciclo celular después de tratamiento con MMC [1  $\mu$  M] a diferentes tiempos.**

**A.** Ciclo celular de células GM6914+A y +EV con y sin tratamiento de MMC [1  $\mu$ M] a las 6,18 y 36 hrs. **B.** Porcentaje de células después del tratamiento con MMC [1  $\mu$ M] a las 18 hrs. **C.** Gráfica de dos parámetros que representa  $\gamma$ H2AX en el eje de las Y y la cantidad de DNA en el eje de las X. Ambas líneas celulares presentan más de 90% de células positivas para la marca de daño después del tratamiento.

A las 18 horas (Figura 15A), no existen células en subG1 en ambas líneas celulares con el tratamiento por lo cual se puede decir que la MMC no afecta la viabilidad de las células en este tiempo. A las 36 horas, en la línea GM6914+EV existe una proporción de 10% en subG1 y la fase G2 disminuye, la cual no es visible en las células corregidas, esto puede ser debido a la sensibilidad de las células Fanconi a agentes covalentes cruzados. En cuanto a la  $\gamma$ H2A.X a las 18 horas (Figura 15B y 15C), la línea GM6914+A y GM6914+EV presentaban

91.9% y 92.1% respectivamente de células positivas para la marca de daño. Si comparamos las 18 horas con las 36 horas (Figura 16) el aumento es mínimo en cuanto a células positivas para  $\gamma$ H2AX, por estas razones se decidió tomar el tiempo de 18 horas para volver a evaluar a los foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC.

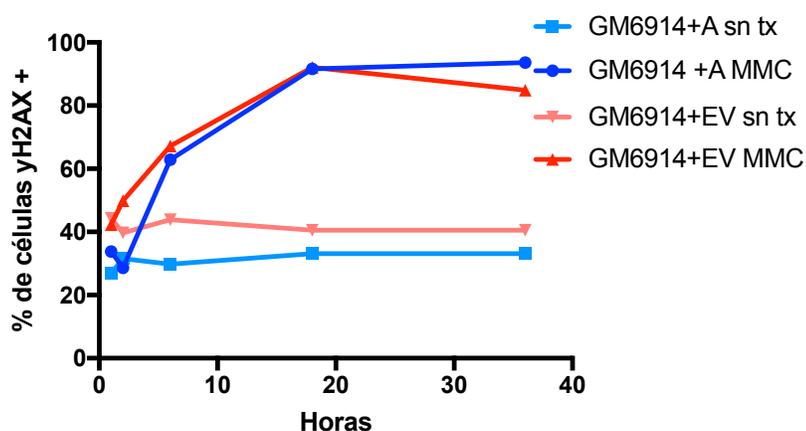


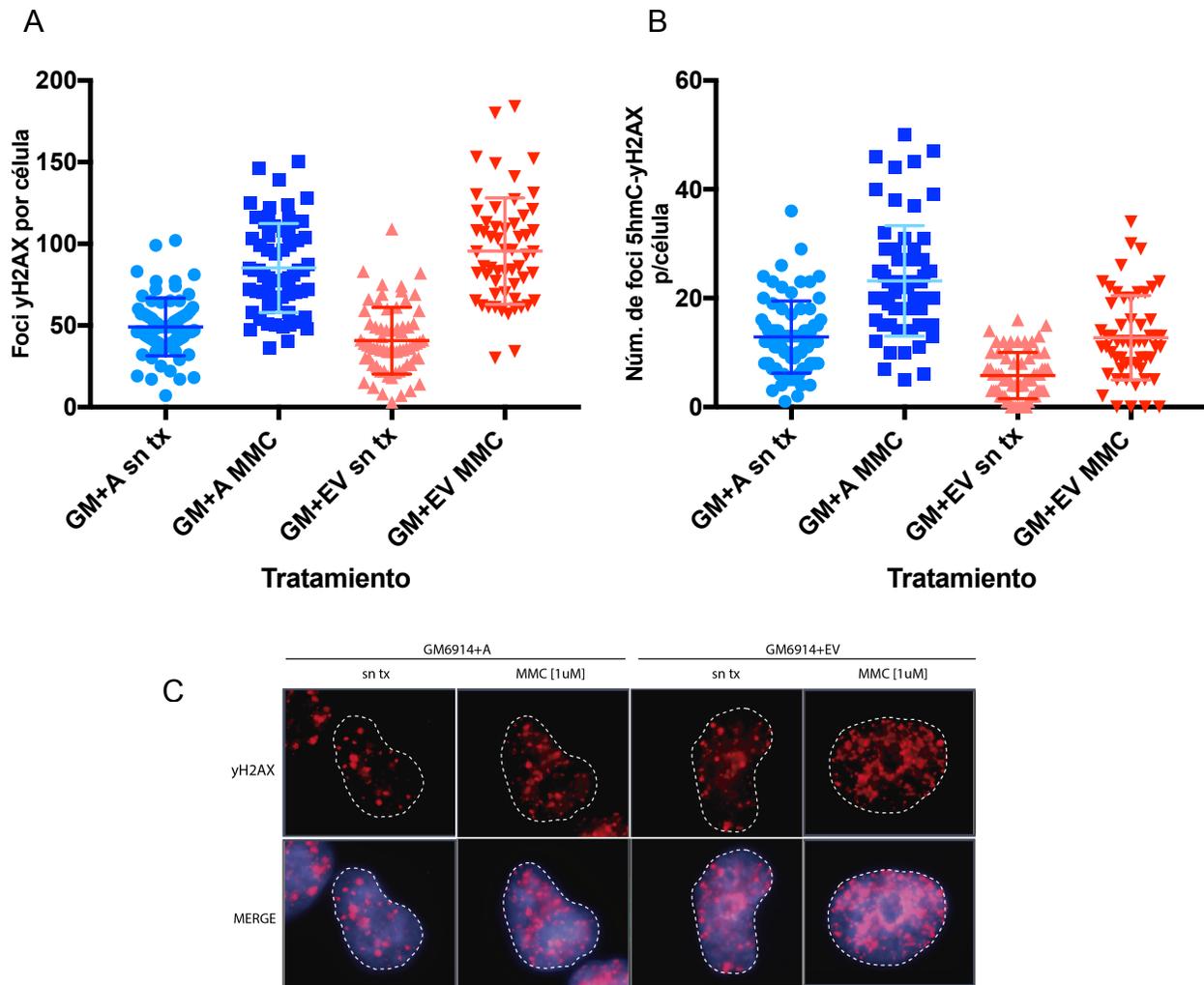
Figura 16. Cinética de  $\gamma$ H2AX durante tratamiento de MMC [1  $\mu$ M].

Las células GM6914+A y GM6914+EV sin tratamiento y con tratamiento de MMC. Existe un aumento significativo de las células positivas para después del tratamiento desde las 6 horas hasta las 36 horas.

## 5. Evaluación de la co-localización de las marcas 5-hmC y $\gamma$ H2AX a las 18 horas

Debido a lo anterior, se estableció que a las 18 horas de tratamiento con MMC 1  $\mu$ M no afectaba la viabilidad celular y permitía que la mayoría de las células pudieran reconocer el daño de tipo ICL evidenciado en el aumento de la marca de daño  $\gamma$ H2AX. Para corroborarlo se realizó una IF contra la  $\gamma$ H2AX. En la Figura 17A se puede observar que existen diferencias entre los promedios de número de foci  $\gamma$ H2AX por célula entre los tratamientos en ambas líneas celulares, y también la respuesta al tratamiento dependiendo de la línea celular (GM6914+A sn tx=  $49.05 \pm 17.69$ , GM6914+A MMC=  $85.17 \pm 27.18$ ; GM6914+EV sn tx=  $40.68 \pm 20.49$ , GM6914+EV MMC=  $95.54 \pm 32.58$  foci de  $\gamma$ H2AX por célula). La respuesta al tratamiento es mucho mayor en las células GM6914+EV en comparación con las GM6914+A,

aunque ambas presentan números similares en cuanto a células positivas para la marca (datos citometría). Esto ya ha sido descrito en células Fanconi deficientes en FANCA y se cree que es debido a una alta expresión de la proteína ATM y ATM fosforilado basal (Yamamoto & Papadaku, 2008).

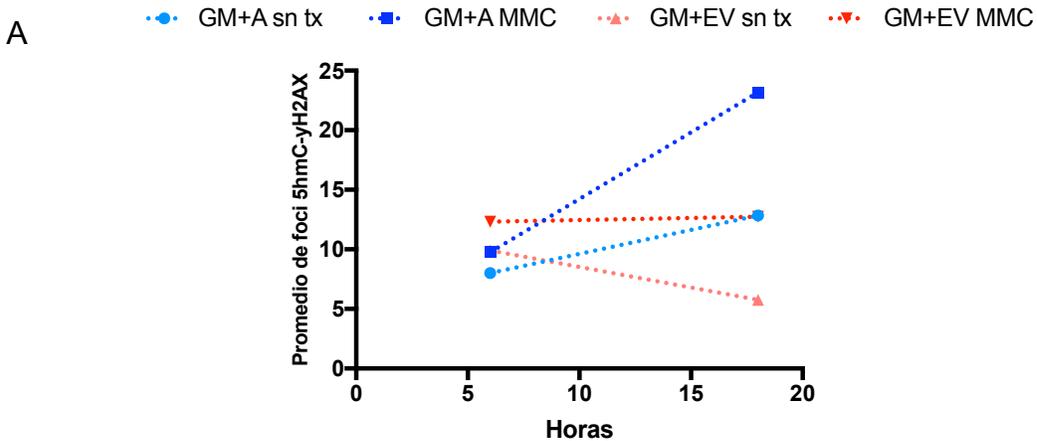


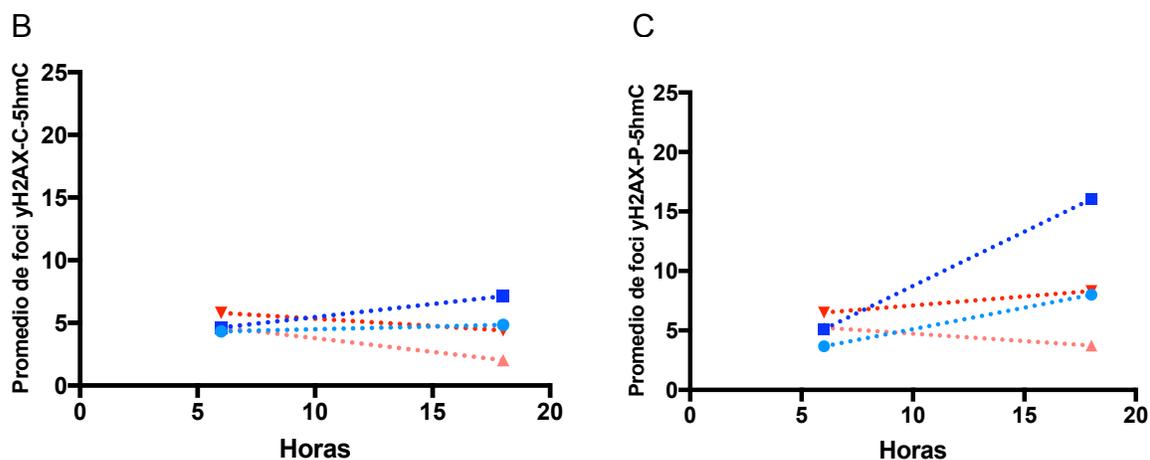
**Figura 17. La  $\gamma$ H2AX-5hmC tienen un comportamiento diferente después de la inducción de daño dependiendo de la línea celular.**

Se contaron el número de foci  $\gamma$ H2AX en 74 células GM+A sin tratamiento (azul claro), 64 células GM+A MMC (azul), 68 células en GM+EV sin tratamiento (coral) y 56 en células GM+EV MMC (rojo). **A.** El número de foci de  $\gamma$ H2AX aumenta después de 18 hrs con tratamiento de MMC [1  $\mu$ M] **B.** El número de foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC varía dependiendo el tratamiento y la funcionalidad de la vía después de 18 hrs con tratamiento de MMC [1  $\mu$ M]. **C.** Inmunofluorescencias de  $\gamma$ H2AX sin y con tratamiento después de 18 hrs con MMC [1  $\mu$ M].

Para los foci de la asociación  $\gamma$ H2AX-5hmC, existe un incremento en los números de foci después del tratamiento pareciendo incrementar al doble en ambas líneas celulares

(GM6914+A sn tx=  $12.8 \pm 6.63$ , GM6914+A MMC=  $23.17 \pm 10.14$ ; GM6914+EV sn tx=  $5.7 \pm 4.24$ , GM6914+EV MMC=  $12.7 \pm 7.75$  foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC por célula), pero este es más notorio en las células GM6914+A (Figura 17B). El número de foci  $\gamma$ H2AX-5hmC aumenta conforme el tiempo ante el agente inductor de ICL y parece variar dependiendo de la funcionalidad de la vía FA/BRCA y no de la señalización de daño como tal (Figura 18). Las células GM+EV parecen no responder de la misma manera en esta señalización como las células GM+A contrariamente a lo visto a las 6 horas, debido a que solo se hizo una réplica no se puede asegurar dicho resultado. Sería conveniente realizar experimentos para determinar cual es la cinasa encargada de activar la desmetilación activa y su blanco ya que ambas, ATM y ATR, han sido descritas con un papel en la vía FA/BRCA y se encuentran desreguladas cuando no es funcional (Yamamoto & Papadaku, 2008).





**Figura 18.** El aumento en el número de  $\gamma$ H2AX-5hmC varía dependiendo la funcionalidad de FA/BRCA, tiempo y localización.

**A.** Aumento en el número de foci de  $\gamma$ H2AX-5hmC en células GM+A después de la inducción de daño, siendo más notorio a las 18 hrs. Las células GM+EV parecen no responder de la misma manera ante el tratamiento de MMC [1  $\mu$ M]. **B.** No existe aumento en los foci  $\gamma$ H2AX-C-5hmC en ninguna condición. **C.** Existe un aumento en los foci de  $\gamma$ H2AX-P-5hmC después del tratamiento con MMC [1  $\mu$ M].

Los resultados parecen indicar que la 5hmC es independiente de la señalización de  $\gamma$ H2AX por lo cual no se podría describir como marca de daño sino una marca de reparación o decisión de reparación del DSB y DSB-I. Faltaría determinar si existe una cinética para la 5hmC dependiendo del tipo de DSB o el tiempo en el cual se ve la marca, y a su vez determinar cuál es la proteína TET encargada de ponerla. En cuanto a las células GM6914+A y +EV, parecen no expresar el mRNA de *TET2* pero este ha sido descrito el principal responsable de la desmetilación de DNA en respuesta a MMC en células HEK293 por lo que parece depender más del tipo celular que el tipo de daño infligido (Song et al., 2018).

Al igual que lo observado a las 6 horas de tratamiento, se encontraron dos disposiciones de la 5hmC con respecto a la  $\gamma$ H2AX. Al analizar los datos (Figura 19), existe un aumento en los foci de ambas disposiciones, pero es mucho más evidente en la disposición  $\gamma$ H2AX-P-5hmC de las células GM6914+A en la cual aumentan al doble. Si se compara con los datos de las 6 hrs (Figura 18B-C), existe un aumento en el número de foci  $\gamma$ H2AX-P-5hmC

pero no  $\gamma$ H2AX-C-5hmC por lo cual pareciera haber un favorecimiento a este tipo de disposición espacial ante la inducción de daño.

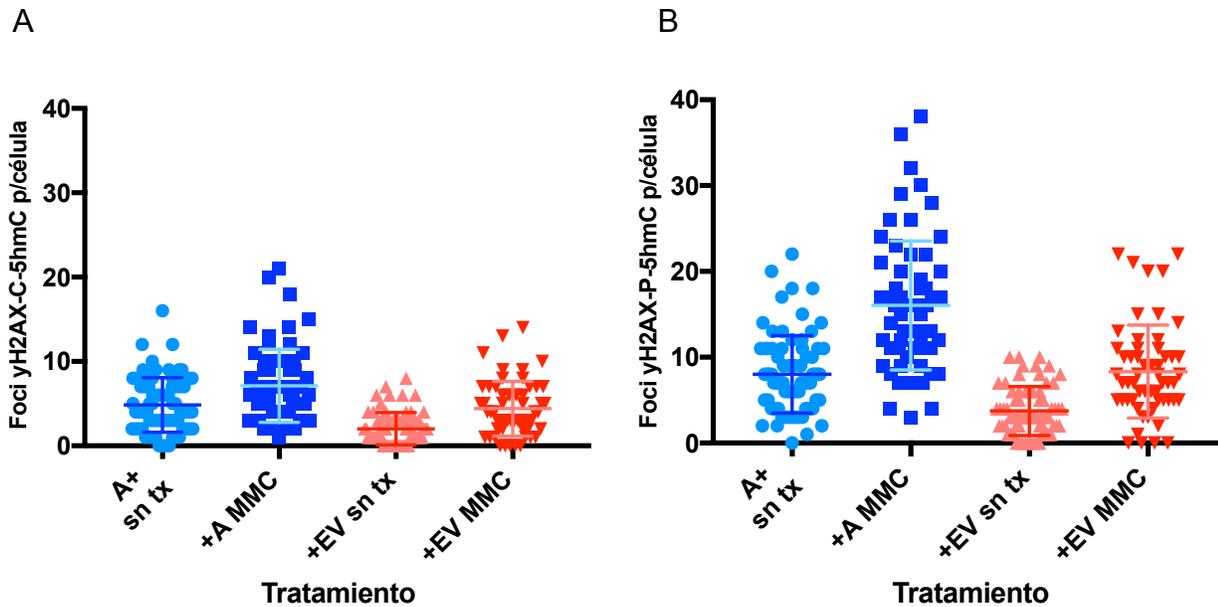


Figura 19. El aumento de  $\gamma$ H2AX-C-5hmC es más evidente que el de  $\gamma$ H2AX-P-5hmC a las 18 horas de tratamiento con MMC.

**A.** Foci de  $\gamma$ H2AX-C-5hmC por célula. El número de foci  $\gamma$ H2AX-C-5hmC parece variar ligeramente con el tratamiento de MMC. **B.** Foci de  $\gamma$ H2AX-P-5hmC por célula. El número de foci aumenta al doble con el tratamiento de MMC a las 18 hrs. (GM6914+A sn tx=  $8 \pm 4.52$ , GM6914+A MMC=  $16.05 \pm 7.51$ ; GM6914+EV sn tx=  $3.7 \pm 2.85$ , GM6914+EV MMC=  $8.32 \pm 5.4$ )

Se ha descrito que la 5hmC se encuentra de 200pb a 1kb de la  $\gamma$ H2AX, una posibilidad de esta disposición es que permita el acceso a factores de reparación marcando cromatina abierta (Kafer et al., 2016; X. Wu & Zhang, 2017). Otra posible hipótesis de la disposición de la 5hmC en la periferia de la  $\gamma$ H2AX es la reciente asociación de la proteína PML (Promyelotic leukemia protein) con TET2. Los cuerpos nucleares de PML han sido descritos con importante papel como sensores de daño al DNA, co-localizando con la  $\gamma$ H2AX y se cree que acarrean proteínas de reconocimiento y reparación al sitio de daño (Dellaire et al., 2006; Kalousi & Soutoglou, 2016). Song y colaboradores describieron que esta proteína se encuentra dentro de estos cuerpos proteicos y cabe la posibilidad que las otras TETs también. Dicha hipótesis

explicaría la localización de la 5hmC en la periferia si el foci de  $\gamma$ H2AX correspondiera con el cuerpo de PML. Mayor investigación se debería realizar para determinar cuál es la posible relevación biológica de esta localización celular, su posible papel en la reparación y causa además de su variación en diferentes líneas celulares.

## Conclusiones

En los últimos años, la 5hmC ha sido descrita como una marca de daño asociada con la  $\gamma$ H2AX ante inducción de daño de tipo DSB. En este estudio confirmamos que la 5hmC es inducida por un agente inductor de enlaces covalentes cruzados (MMC) indicando que también podría provenir de DSB-I. Aunque encontramos asociación con la  $\gamma$ H2AX, no dependía de la cantidad de foci  $\gamma$ H2AX por célula lo cual podría indicar que es más una marca de destino de reparación que de señalización como tal. En las células GM6914+EV se observó que después de 6 horas existía un aumento en la asociación  $\gamma$ H2AX-5hmC lo cual podría estar indicando que la ruta NHEJ por la cual serán reparados preferencialmente los DSB-I podría favorecerse por medio de señalización no solo a nivel histonas sino también a nivel de DNA a tiempos tempranos. Se realizó una réplica a las 18 horas y se observó un comportamiento inverso al caracterizado a las 6 horas pudiendo indicar una cinética diferente de la 5hmC dependiendo la funcionalidad de la vía FA/BRCA. Sin embargo, debido a que solo se cuenta con una sola réplica no se puede aseverar dicho resultado.

No hubo cambios significativos en la expresión relativa de los mRNA por lo cual los cambios en la desmetilación activa del DNA en respuesta a daño podrían darse a nivel de actividad proteica. Faltaría determinar cual de las TETs (TET1 o TET3) es la encargada de esta desmetilación pero ambas son candidatas debido a su asociación con las cinasas ATM y

ATR. Por último, se encontraron dos disposiciones de la 5hmC ante la  $\gamma$ H2AX:  $\gamma$ H2AX-C-5hmC y  $\gamma$ H2AX-P-5hmC viéndose favorecida la  $\gamma$ H2AX-P-5hmC ante inducción de daño desde tiempos tempranos y en ambas líneas celulares, pero la desregulación de la vía de FA/BRCA parece disminuir esta asociación espacial.

## Perspectivas

Este estudio demuestra que la asociación  $\gamma$ H2AX-5hmC se ve favorecida después de la inducción de daño tipo ICL y varía dependiendo la funcionalidad de la vía FA/BRCA. Se podría asumir que marca una vía de reparación más que daño. Sin embargo faltaría ver si esta marca se asocia con otras proteínas de reparación (Ku80, Rad51) y su posible cinética durante la reparación, especialmente en la fase de replicación. Además, determinar cuál es la proteína o proteínas encargadas de la desmetilación activa ante inducción de daño tipo ICL y su posible cinasa activadora. Otro punto importante sería determinar su asociación con la vía FA/BRCA y como se ve afectada dependiendo que proteína de la vía se ve afectada.

Para terminar, sería importante realizar experimentos para verificar las disposiciones de la 5hmC con respecto a la  $\gamma$ H2AX y su posible asociación con otras proteínas de la cromatina, como PML, para poder determinar si existe una relevancia biológica de esta asociación espacial.

## Métodos en extenso

### *Cultivos celulares*

Las líneas celulares humanas utilizadas en el estudio fueron mantenidas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, y cultivadas con las siguientes características:

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Medio de cultivo</b>
GM 6914 +A	Fibroblastos de paciente AF complementadas con plásmido con la secuencia del gen <i>FANCA</i> y que corrige el fenotipo AF.	DMEM suplementado con con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Waltham, Massachussets, USA) y 1% de Penicilina- Streptomycin.
GM6914 +EV	Fibroblastos de paciente AF complementadas con plásmido vacío y que mantiene el fenotipo AF.	DMEM suplementado con con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Waltham, Massachussets, USA) y 1% de Penicilina- Streptomycin.

Tabla 2. Líneas celulares: características y origen.

### *Inducción de daño con MMC*

Se sembraron células GM6914 +A y GM6914 +EV en cajas de Petri o cubreobjetos y se les añadió 1 µM de Mitomicina C en medio DMEM a 37°C. Para la realización de los experimentos se tomaron cazas a los 1, 2, 6, 18 y 36 hrs postratamiento.

## *Citometría de flujo*

La citometría de flujo se realizó con el Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit de BD Pharmingen™.

1. Una vez levantadas las células, colocarlas en tubo Falcon de 15 mL.
2. Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 min, decantar y lavar con PBS.
3. Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 min. Una vez decantado, resuspender el botón con vortex procurando que no exista cúmulo de células.
4. Fijar y permeabilizar con 66µl de CytoFix/Cytoperm. Vortexear 20 segundos para evitar cualquier cúmulo.
5. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos (15-30 min).
6. Lavar con 500µl de PermWash Buffer 1X.
7. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min. Una vez decantado, resuspender el botón con vortex.
8. Para fijar y permeabilizar el núcleo utilizar 25µl de CytoFix/Cytoperm Plus. Vortexear 20 segundos para evitar cualquier cúmulo.
9. Incubar 10 min en hielo.
10. Lavar con 500µl de PermWash Buffer 1X.
11. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min. Una vez decantado, resuspender el botón con vortex.
12. Volver a fijar y permeabilizar con 20µl de CytoFix/Cytoperm. Vortexear 20 segundos para evitar cualquier cúmulo.
13. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
14. Lavar con 500µl de PermWash Buffer 1X.

15. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min. Una vez decantado, resuspender el botón con vortex.
16. Resuspender en 20µl de PermWash Buffer 1X.
17. Agregar 1 µl del anticuerpo γH2AX (Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-H2AX (pS139))
18. Vortexear para homogeneizar el anticuerpo.
19. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
20. Lavar con 500µl de PermWash Buffer 1X.
21. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min. Una vez decantado, resuspender el botón con vortex.
22. Resuspender en 200 µl de PermWash Buffer 1X.
23. Guardar a 4°C en cubierto en aluminio hasta llevarlo al citómetro de flujo.
24. Si se desea ver el ciclo celular agregar DAPI (según la dilución del fabricante) antes de ir al citómetro de flujo.

## Inmunofluorescencias (IF)

### Soluciones de trabajo

<i>Formaldehído 4%</i> 2.70 ml de formaldehído al 37% 22.30 ml de PBS Mantener a 4°C	<i>Tritón 2%</i> 0.5 ml de Tritón X-100 (Sigma) 24.5 ml de PBS
<i>HCl 2N</i> 8.044 ml de HCl al 36% 41.955 ml de PBS (Almacenar en frasco de vidrio con tapa de vidrio) Mantener a 4°C	<i>PBS</i> 8 g de NaCl 0.2 g de KCl 1.44 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.24 g de KH <sub>2</sub> PPO <sub>4</sub> Ajustar pH a 7.4
<i>Solución de bloqueo (BSA 1%)</i> 0.25 g de BSA 25 ml de PBS	<i>DAPI</i> Dilución 1:6.5 Vectashield con DAPI: Vectashield

1. En pozos con cubres redondos (12 mm) previamente limpiados con etanol e irradiados, sembrar 10,000 células en 100 µL de medio. Con mucho cuidado esperar de 3-5 hrs a que las células se peguen y agregar 100 µL de medio y dejar 24-48 hrs (Depende de línea celular).
2. FIJACIÓN: Agregar 200 µL de formaldehído al 4% y esperar 10 min a TA.  
Nota: para evitar que las células se despeguen, pueden sumergir el cubre objetos a un pozo con el formaldehído ya agregado previamente.
3. Lavar con PBS cada 5 min, repetir 3 veces. No dejar secar.

EN ESTE PUNTO SE PUEDEN QUEDAR GUARDADAS A 4°C EN ALUMINIO

4. PERMEABILIZACIÓN (Depende de línea celular): Adicionar 200  $\mu$ L de Tritón al 2% durante 30 min a TA.
5. Lavar con PBS cada 5 min, repetir 3 veces. Mucho cuidado de que los cubres no se sequen.
6. Para 5hmC: Poner RNAsa durante 2 hrs a 37°C. Lavar 2 veces con PBS.
7. Tratar con HCl al 2N durante 30 min (1 ml por pozo, usar pipeta Pasteur).
8. Quitar HCl y agregar Tris-HCl durante 10 min.
9. Terminado el tratamiento lavar 3 veces con PBS x 5 min.
10. Bloquear con BSA 1 % durante 1 hr.
11. Agregar 10  $\mu$ L del anticuerpo primario diluido en BSA 1%. Colocar un pedazo de parafilm encima del cubre objetos, verificar que no queden burbujas. Incubación en cámara húmeda y agitación a 4°C.
12. Lavar con PBS cada 5 min, repetir 3 veces. Mucho cuidado de que los cubres no se sequen.
13. TODO HACERLO EN OSCURIDAD. Preparar anticuerpo secundario.
14. Lavar con PBS cada 5 min, repetir 3 veces. Mucho cuidado de que los cubres no se sequen.
15. Montar en portaobjetos limpios, agregar aproximadamente 5  $\mu$ L de Vectashield (Mezcla de Vectashiel+DAPI y Vectashield dilución 1:6.5) por cubreobjetos a porta. Con cuidado sacar el cubre objetos del pozo, secar el PBS sobrante y colocarlo en el porta. SIEMPRE LA MUESTRA QUEDA BOCA ABAJO.
16. Sellar con barniz de uñas transparente.
17. Almacenar en oscuridad a 4°C hasta lectura en microscopio.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Histone H2A.XS139ph (phospho Ser139) antibody mouse (Genetex, GTX628789)	1:500	A564 Chicken anti-mouse IgG (Red Life, A11031)	1:200
5-Hydroxymethylcytosine (5-hmC) antibody (pAb) Rabbit (Active Motif, Cat. 39769)	1:75	Alexa Fluor 488 (A488) Chicken anti-Rabbit IgG (Molecular Probes, A21441)	1:500

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios.

### *Análisis de inmunofluorescencias*

Para la lectura de las inmunofluorescencias se usa el microscopio Carl Zeiss Axio Imager Z1 en el objetivo de 100X.

Los criterios para la lectura son los siguientes:

1. Célula positiva para  $\gamma$ H2A.X.
2. Células no apiladas.
3. Las señales de los fluorocromos se encuentran dentro del núcleo.
4. Las señales de los fluorocromos solo se ven dentro del filtro indicado.

Si se cumplen los criterios se toman imágenes independientes de cada filtro para su respectivo fluorocromo ( $\gamma$ H2A.X ,DAPI y 5hmC). Para cada cubre objetos se toman de 50 a 100 imágenes.

El análisis de las imágenes se realiza con el programa ZEN (blue edition) de Carl Zeiss. Se juntan las imágenes tomadas individualmente del campo donde se encuentra la célula y se realiza un empalme. Para la cuantificación, se puede realizar zoom donde se encuentra algún foci. Tomar en cuenta los foci positivos para la realización del análisis.

Para la captura de datos se utiliza una base de datos en un hoja de Excel como el ejemplo siguiente:

#	Limpia	Sucia	Duda	Nota	Célula en la foto	Número de foci $\gamma$ H2AX	Foci $\gamma$ H2AX-C-5hmC	Foci $\gamma$ H2AX-P-5hmC
489	1				1	76	5	6
					2	60	4	3
					3	66	1	2
					4	74	0	3
488	1				1	72	4	4
					2	116	4	9
					3	79	4	2
487	1				1	112	11	8
					2	41	4	5
					3	64	1	6
					4	122	6	6

Figura 20. Ejemplo de base de datos para las inmunofluorescencias.

Los datos recolectados son:

1. Número de foto
2. El estado de la foto:
  - a. Limpia
  - b. Sucia
3. Si existe alguna inconsistencia se pone en la casilla de duda.
4. Si se debe volver a analizar en la casilla nota.
5. Número de la célula en la foto.
6. Número de foci
7. Número de foci  $\gamma$ H2A.X -C-5hmC
8. Número de foci  $\gamma$ H2A.X -P-5hmC

Para el análisis estadístico se usa el programa de Prism 7. Se utiliza la prueba de normalidad de D'Angostino-Pearson. Se realiza una prueba de Kruskal-Wallis a los datos seguida de una prueba de Dunn para comparar los diferentes grupos. Se toma en cuenta estadísticamente significativo a las  $p < 0.05$ .

### Extracción de RNA

Kit RNAeasy Ambion Buffer I Buffer II adicionado con etanol Agua libre de RNAsa	Etanol al 70° 7 mL Etanol 100° 3 mL agua libre de nucleasas
--	---

1. Una vez levantadas las células, colocarlas en tubo Falcon de 15 mL.
2. Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 min, decantar y lavar con PBS.
3. Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 min, y repetir lavado. Una vez decantado, resuspender el botón y traspasarlo a tubo eppendorf de 1.5 mL.
4. Añadir 200 µL de TRIZol (Invitrogen) (utilizar puntas libres de nucleasas)
5. NOTA: Se puede congelar a -70 °C.
6. Homogeneizar con el pistilo 5 veces, y limpiarlo con 250 µL de TRIZol.
7. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
8. Agregar 150 µL de cloroformo y mezclar por inversión, dejar reposar 2-3 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 12,000 g durante 15 min a 4°C.
10. Recuperar la fase acuosa (aprox. 300 µL), con mucho cuidado de no tocar la fase intermedia. Colocar en tubo eppendorf libre de nucleasas.
11. Adicionar alcohol al 70° (mismo volumen que obtenido de fase acuosa).
12. Mezclar por inversión hasta que no se pueda observar diferencia en las fases.
13. Transferir la mezcla a la columna Ambion © con el tubo colector.
14. Centrifugar 12,000 g por 15 segundos a T.A. Quitar la columna y colocarlo en un nuevo tubo colector.
15. Adicionar 700 µL de Buffer I.

16. Centrifugar 12,000 g por 15 segundos a T.A. Quitar la columna y colocarlo en un nuevo tubo colector.
17. Agregar 500 µL de Buffer II.
18. Centrifugar 12,000 g por 15 segundos a T.A. Quitar la columna y colocarlo en un nuevo tubo colector. Repetir lavado con Buffer II.
19. Dejar secar la membrana, centrifugar 1 min a 12,000 g.
20. Colocar la columna en tubo eppendorf NLN y agregar 25 µL de agua. Dejar reposar de 1-2 min.
21. Centrifugar 2 min a 12,000 g a T.A. Quitar columna.
22. Cuantificar en un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific)
23. Guardar a -70°C.

### *Síntesis de cDNA*

La síntesis de cDNA se realizó con Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

1. En tubo nuevo libre de nucleasas se prepara el Template Mix con cada muestra:

RNA (500ng)	Agua	Oligo dTs	Hexamer	Vol. Final
variable	variable	1 µL (2.5 µM)	2 µL (60 µM)	13 µL

2. Poner los tubos a 65°C durante 10 min.
3. Preparar la mezcla para la amplificación (por tubo):

Buffer 5 x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )	4 µL
Inhibidor RNAsa (20 U)	0.5 µL
Mix Desoxirribonucleótidos 10 mM	2 µL

(1 mM)	
Transcriptasa Reversa (10 U)	0.5 $\mu$ L
Vol. Final	7 $\mu$ L

4. Terminado los 10 min, colocar las muestras en hielo.
5. Colocar 7  $\mu$ L de la mezcla a cada tubo en un volumen final de 20  $\mu$ L.
6. Amplificación del cDNA:
  - 25 °C-10 min
  - 50 °C-60 min
  - 85°C-5 min
  - 4°C- hasta guardar las muestras
7. Cuantificar las muestras en espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific)
8. Guardar muestras a -20°C.

### *qRT-PCR*

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizó con el Kit LightCycler® TaqMan® Master (Roche) y Universal Probes (Roche).

1. Se prepara el MasterMix 1X
2. Para cada reacción se coloca los siguientes reactivos:

Agua	7.35 $\mu$ L
MasterMix 1X	3 $\mu$ L
Oligo F (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L

Oligo R (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
Sonda	0.15 $\mu$ L
Vol. Final	11 $\mu$ L

- La qRT-PCR se realiza en capilares, previamente enfriados.
- Se coloca 2,000 ng de cDNA en cada capilar, y se completa con agua para obtener un volumen de 4  $\mu$ L.
- Se coloca 11  $\mu$ L de la mezcla en el capilar y sella.
- Dar spin de 5 segundos, con mucho cuidado de no romper los capilares.
- Colocarlos en el LightCycler®.
- Programar el LightCycler® con los siguientes parámetros:

Analysis Mode	Cycle segment	Target Temperature	Hold Time	Adquisition mode
None	Pre-incubation			
	1	95°C	10 min	None
Quantification	Amplification			
	45	95°C	10 s	None
		60°C	30s	None
72°C		5s	Single	
None	Cooling			
	1	40°C	30s	None

- Guardar corrida y analizar con Absolute Quantification.

## Anexo

Nombre y función	Oligonucleótido	Secuencia DNA (5'-3')	Sonda (Universal Probes, Roche)
Expresión 7SL	7SL FWD	GCTGGAGGATCGCTTGAG T	26
	7SL RVS	GACACCCGATCGGCATAG	

Expresión TET1	<i>TET1 FWD</i>	TCTGTTGTTGTGCCTCTGGA	57
	<i>TET1 RVS</i>	GCCTTTAAACTTTGGGCTTC	
Expresión TET2	<i>TET2 FWD</i>	CCATTTGCCAGACAGAACCT	50
	<i>TET2 RVS</i>	TCTCAGGCAGTGGGCTTC	
Expresión TET3	<i>TET3 FWD</i>	CGCCTCTATCCGGGAACT	25
	<i>TET3 RVS</i>	TCCCCGTGTAGATGACCTTC	

Tabla 4. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en qRT-PCR.

		GM6914+A				GM6914+EV			
		7SL	TET1	TET2	TET3	7SL	TET1	TET2	TET3
sin tx	Replica 1	17.8225	33.315	>40.00	30.045	17.77	31.335	>40.00	29.915
	Replica 2	17.9425	29.96	>40.00	28.855	18.095	31.135	>40.00	28.27
	Replica 3	18.21	28.7	>40.00	27.855	17.13	27.895	>40.00	27.145
MMC [1µm] 6hrs	Replica 1	18.7	31.13	>40.00	29.71	17.9125	31.79	>40.00	28.725
	Replica 2	16.845	29.455	>40.00	27.01	17.4975	31.48	>40.00	27.955
	Replica 3	18.84	29.52	>40.00	28.585	18.43	28.815	>40.00	27.955

Tabla 5. Promedios de puntos de cruce (CP) de *TET1*, *TET2*, *TET3* y *7SL*.

Para el mRNA de *TET2*, las lecturas fueron de >40.00 en el LightCycler® por lo cual no se realizó análisis de expresión relativa.

## Literatura citada

1. Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., Vrugt, H. J. Van De, Rossum-fikkert, S. E. Van, Ristic, D., ... Dorsman, J. C. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications*, 6(May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms9829>
2. Apostolou, S., Whitmore, S. A., Crawford, J., Lennon, G., Sutherland, G. R., Callen, D. F., ... Moyzis, R. K. (1996). Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet*, 14(3), 324–328. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ng1196-324>
3. Attikum, H. Van, & Gasser, S. M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response, 2(April), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.03.001>
4. Ayala Zambrano, C. (2017). Determinación de las modificaciones epigenéticas inducidas por enlaces covalentes cruzados, en células de Anemia de Fanconi A. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
5. Ayrappetov, M. K., Gursoy-yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., & Price, B. D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin, 111(25), 9169–9174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403565111>
6. Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2015). Chromatin perturbations during the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair*, 36, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.002>
7. Bluteau, D., Masliah-Planchon, J., Clairmont, C., Rousseau, A., Ceccaldi, R., D'Enghien, C. D., ... Soulier, J. (2016). Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3580–3584. <https://doi.org/10.1172/JCI88010>
8. Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., ... Surrallés, J. (2013). Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *American Journal of Human Genetics*, 92(5), 800–806. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.002>
9. Bogliolo, M., & Surrallés, J. (2015). Fanconi anemia: a model disease for studies on

- human genetics and advanced therapeutics. *Current Opinion in Genetics & Development*, 33, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.002>
10. Bueren-Calabuig, J. A., Negri, A., Morreale, A., & Gago, F. (2012). Rationale for the opposite stereochemistry of the major monoadducts and interstrand crosslinks formed by mitomycin C and its decarbamoylated analogue at CpG steps in DNA and the effect of cytosine modification on reactivity. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10(8), 1543–1552. <https://doi.org/10.1039/c1ob06675g>
  11. Cao, L.-L., Shen, C., & Zhu, W.-G. (2016). Histone modifications in DNA damage response. *Science China Life Sciences*, 59(3), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5011-z>
  12. Ceccaldi, R., Sarangi, P., & D'Andrea, A. D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), 337–349. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.48>
  13. Clauson, C., Schärer, O. D., & Niedernhofer, L. (2013). Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10), a012732. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012732>
  14. Coulter, J. B., Lopez-Bertoni, H., Kuhns, K. J., Lee, R. S., Latterra, J., & Bressler, J. P. (2017). TET1 deficiency attenuates the DNA damage response and promotes resistance to DNA damaging agents. *Epigenetics*, 12(10), 854–864. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1359452>
  15. de Winter, J. P., Rooimans, M. a, van Der Weel, L., van Berkel, C. G., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., ... Joenje, H. (2000). The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature Genetics*, 24(1), 15–6. <https://doi.org/10.1038/71626>
  16. Deans, A. J., & West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(7), 467–480. <https://doi.org/10.1038/nrc3088>
  17. Dellaire, G., Ching, R. W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K. C. K., Bristow, R. G., & Bazett-Jones, D. P. (2006). Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *Journal of Cell Biology*, 175(1), 55–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604009>

18. Dorsman, J. C., Levitus, M., Rockx, D., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Haitjema, A., ... Joenje, H. (2007). Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 29(3), 211–218. <https://doi.org/10.1155/2007/151968>
19. Duxin, J. P., & Walter, J. C. (2015). What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.09.002>
20. Germann, M. W., Johnson, C. N., & Spring, A. M. (2012). Recognition of Damaged DNA: Structure and Dynamic Markers. *Medicinal Research Reviews*, 32(3), 659–683. <https://doi.org/10.1002/med.20226>
21. Giampietro, F., Pavlakis, G., Verlander, C., Davis, G., & Auerbach, D. (1993). Need for More Accurate and Timely Diagnosis in Fanconi Anemia: A Report From the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*, 91(6), 1116–1120.
22. Han, J., An, J., & Ko, M. (2015). Functions of TET Proteins in Hematopoietic Transformation. *Molecules and Cells*, 38(11), 925–35. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0294>
23. Hejna, J., Holtorf, M., Hines, J., Mathewson, L., Hemphill, A., Al-Dhalimy, M., ... Moses, R. E. (2008). Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the fanconi anemia pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9844–9851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709076200>
24. Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366–74. <https://doi.org/10.1038/35077232>
25. Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., ... D'Andrea, A. D. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 297(July), 606–609. <https://doi.org/10.1126/science.1073834>
26. Jackson, S., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
27. Jacquet, K., Avvakumov, N., Doyon, Y., Durocher, D., Co, J., Avvakumov, N., & Lambert, J. (2016). The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Article The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15

- Acetylation, 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.031>
28. Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G., Lukas, J., & Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1038/ncb1337>
29. Jeggo, P. A., & Downs, J. A. (2014). Roles of chromatin remodellers in DNA double strand break repair. *Experimental Cell Research*, *329*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.023>
30. Jiang, D., Wei, S., Chen, F., Zhang, Y., & Li, J. (2017). TET3-mediated DNA oxidation promotes ATR-dependent DNA damage response. *EMBO Reports*, e201643179. <https://doi.org/10.15252/embr.201643179>
31. Jiang, D., Zhang, Y., Hart, R. P., Chen, J., Herrup, K., & Li, J. (2015). Alteration in 5-hydroxymethylcytosine-mediated epigenetic regulation leads to Purkinje cell vulnerability in ATM deficiency. *Brain*, *138*(12), 3520–3536. <https://doi.org/10.1093/brain/awv284>
32. Kafer, G. R., Li, X., Horii, T., Suetake, I., Tajima, S., Hatada, I., & Carlton, P. M. (2016). 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Reports*, *14*(6), 1283–1292. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.035>
33. Kalousi, A., & Soutoglou, E. (2016). Nuclear compartmentalization of DNA repair. *Current Opinion in Genetics and Development*, *37*, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.013>
34. Kee, Y., & D'Andrea, A. D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(11), 3799–3806. <https://doi.org/10.1172/JCI58321>
35. Kehrl, K. R. M., & Sidorova, J. M. (2014). Mitomycin C reduces abundance of replication forks but not rates of fork progression in primary and transformed human cells. *Oncoscience*, *1*(7), 540. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.70>
36. Kim, Y., Lach, F. P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A. D., & Smogorzewska, A. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet*, *43*(2), 142–146. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ng.750>
37. Knies, K., Inano, S., Ramírez, M. J., Ishiai, M., Surrallés, J., Takata, M., & Schindler, D. (2017). Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFWF3 cause Fanconi anemia.

- Journal of Clinical Investigation*, 127(8), 3013–3027. <https://doi.org/10.1172/JCI92069>
38. Ko, M., An, J., Bandukwala, H. S., Chavez, L., Aijö, T., Pastor, W. a, ... Rao, A. (2013). Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 497(7447), 122–6. <https://doi.org/10.1038/nature12052>
  39. Ko, M., An, J., Pastor, W. A., Koralov, S. B., Rajewsky, K., & Rao, A. (2015). TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunological Reviews*, 263(1), 6–21. <https://doi.org/10.1111/imr.12239>
  40. Kottemann, M. C., & Smogorzewska, A. (2013). Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*, 493(7432), 356–63. <https://doi.org/10.1038/nature11863>
  41. Kuehl, J., Pickel, S., Xue, Y., Zhang, Y., Wang, W., & Schindler, D. (2018). Biallelic mutations in FAAP100 predispose to Fanconi Anemia (FA) (p. 1).
  42. Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B. C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W. W., ... Joenje, H. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics*, 37(9), 934–935. <https://doi.org/10.1038/ng1625>
  43. Liang, C.-C., & Cohn, M. A. (2016). UHRF1 is a sensor for DNA interstrand crosslinks. *Oncotarget*, 7(1), 3–4. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6647>
  44. Liang, C. C., Zhan, B., Yoshikawa, Y., Haas, W., Gygi, S. P., & Cohn, M. A. (2015). UHRF1 Is a sensor for DNA interstrand crosslinks and recruits FANCD2 to initiate the Fanconi Anemia pathway. *Cell Reports*, 10(12), 1947–1957. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.053>
  45. Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., ... Elledge, S. J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes and Development*, 14(12), 1448–1459. <https://doi.org/10.1101/gad.14.12.1448>
  46. Liu, Y., Li, Y., & Lu, X. (2016). Regulators in the DNA damage response. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 594, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.018>
  47. Lo Ten Foe, J. R., Rooimans, M. A., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Wijker, M., Parker, L., ... Joenje, H. (1996). Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet*, 14(3), 320–323. <https://doi.org/10.1038/ng1196-320>

48. Lopez-Martinez, D., Liang, C.-C., & Cohn, M. a. (2016). Cellular response to DNA interstrand crosslinks: the Fanconi anemia pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(16), 3097–3114. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2218-x>
49. Mamrak, N. E., Shimamura, A., & Howlett, N. G. (2016). Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.10.002>
50. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 7(18), 2902–2906. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6679>
51. Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
52. Meetei, A. R., de Winter, J. P., Medhurst, A. L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H. J., ... Wang, W. (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genetics*, 35(2), 165–170. <https://doi.org/10.1038/ng1241>
53. Meetei, A. R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A. L., Zwaan, M., Ling, C., ... Joenje, H. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics*, 36(11), 1219–1224. <https://doi.org/10.1038/ng1458>
54. Meetei, A. R., Medhurst, A. L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T. R., Bier, P., ... Wang, W. (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nature Genetics*, 37(9), 958–63. <https://doi.org/10.1038/ng1626>
55. Michl, J., Zimmer, J., & Tarsounas, M. (2016). Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *The EMBO Journal*, 35(9), 909–23. <https://doi.org/10.15252/embj.201693860>
56. Motnenko, A., Liang, C. C., Yang, D., Lopez-Martinez, D., Yoshikawa, Y., Zhan, B., ... Cohn, M. A. (2018). Identification of UHRF2 as a novel DNA interstrand crosslink sensor protein. *PLoS Genetics*, 14(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007643>
57. Oostra, A. B., Nieuwint, A. W. M., Joenje, H., & De Winter, J. P. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: Chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/238731>

58. Pan, M. R., Peng, G., Hungs, W. C., & Lin, S. Y. (2011). Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 28599–28607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.256297>
59. Panier, S., & Boulton, S. J. (2013). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
60. Papamichos-Chronakis, M., & Peterson, C. L. (2013). Chromatin and the genome integrity network. *Nature Reviews Genetics*, 14(1), 62–75. <https://doi.org/10.1038/nrg3345>
61. Park, J., Virts, E. L., Jankowska, A., Wiek, C., Othman, M., Chakraborty, S. C., ... Andreassen, P. R. (2016). Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene. *Journal of Medical Genetics*, 1–9. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103847>
62. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e–45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
63. Polo, S. E., & Almouzni, G. (2015). Chromatin dynamics after DNA damage: The legacy of the access-repair-restore model. *DNA Repair*, 36, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.014>
64. Price, B. D., & Andrea, A. D. D. (2013). Review Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks. *Cell*, 152(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.011>
65. Räschle, M., Knipsheer, P., Enoiu, M., Angelov, T., Sun, J., Griffith, J. D., ... Walter, J. C. (2008). Mechanism of Replication-Coupled DNA Interstrand Crosslink Repair. *Cell*, 134(6), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.030>
66. Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., ... Rahman, N. (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature Genetics*, 39(2), 162–164. <https://doi.org/10.1038/ng1947>
67. Renaud, E., Barascu, A., & Rosselli, F. (2015). Impaired TIP60-mediated H4K16 acetylation accounts for the aberrant chromatin accumulation of 53BP1 and RAP80 in Fanconi anemia pathway-deficient cells. *Nucleic Acids Research*, 44(2), 648–656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1019>

68. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
69. Saldivar, J. C., Cortez, D., & Cimprich, K. A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.67>
70. Sawyer, S. L., Tian, L., K?h?nen, M., Schwartzenuber, J., Kircher, M., Majewski, J., ... Scherer, S. (2015). Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discovery*, 5(2), 135–142. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1156>
71. Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(4), 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>
72. Song, C., Wang, L., Wu, X., Wang, K., Xie, D., Xiao, Q., ... Yang, Q. (2018). PML Recruits TET2 to Regulate DNA Methylation and Cell Proliferation in Response to Chemotherapeutic Agent. *Cancer Research*, (20), 2475–2490. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3091>
73. Soria, G., Polo, S. E., & Almouzni, G. (2012). Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 46(6), 722–734. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.002>
74. Stiff, T., Walker, S. A., Cersaletti, K., Goodarzi, A. A., Petermann, E., Concannon, P., ... Jeggo, P. A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *The EMBO Journal*, 25(24), 5775–5782. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601446>
75. Strathdee, C. A., Duncan, A. M. V., & Buchwald, M. (1992). Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet*, 1(3), 196–198. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ng0692-196>
76. Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M. K., Moreau, L. A., Whetstine, J. R., & Price, B. D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol*, 11(11), 1376–1382. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1982>

77. Swuec, P., Renault, L., Borg, A., Shah, F., Murphy, V. J., van Twest, S., ... Costa, A. (2017). The FA Core Complex Contains a Homo-dimeric Catalytic Module for the Symmetric Mono-ubiquitination of FANCI-FANCD2. *Cell Reports*, 18(3), 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.013>
78. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
79. Tang, J., Cho, N. W., Cui, G., Manion, E. M., Shanbhag, N. M., Botuyan, M. V., ... Greenberg, R. a. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(October 2012), 317–25. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2499>
80. Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., ... Grompe, M. (2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular Cell*, 7(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00172-1)
81. Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., ... Mathew, C. G. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics*, 42(5), 406–9. <https://doi.org/10.1038/ng.570>
82. Virts, E. L., Jankowska, A., Mackay, C., Glaas, M. F., Wiek, C., Kelich, S. L., ... Hanenberg, H. (2015). AluY-mediated germline deletion, duplication and somatic stem cell reversion in UBE2T defines a new subtype of Fanconi anemia. *Human Molecular Genetics*, 24(18), 5093–5108. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv227>
83. Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
84. Wu, Z. (2016). Phenotypes and genotypes of the chromosomal instability syndromes, 5(2), 79–83. <https://doi.org/10.21037/tp.2016.03.04>
85. Yamamoto, K., & Papadakou, E. (2008). Upregulated ATM Gene Expression and Activated DNA Crosslink-Induced Damage Response Checkpoint in Fanconi Anemia: Implications for Carcinogenesis Kazuhiko. *Molecular Medicine*, 14(3–4), 1. <https://doi.org/10.2119/2007-00122.Yamamoto>

86. Zhang, H., Kozono, D. E., O' Connor, K. W., Vidal-Cardenas, S., Rousseau, A., Hamilton, A., ... D' Andrea, A. D. (2016). TGF- $\beta$  inhibition rescues hematopoietic stem cell defects and bone marrow failure in Fanconi anemia. *Cell Stem Cell*, 18(5), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.002>
87. Zhang, Y. W., Wang, Z., Xie, W., Cai, Y., Xia, L., Easwaran, H., ... Baylin, S. B. (2017). Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress. *Molecular Cell*, 65(2), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.013>
88. Zhong, J., Li, X., Cai, W., Wang, Y., Dong, S., Yang, J., ... Sun, Z. S. (2016). TET1 modulates H4K16 acetylation by controlling auto-acetylation of hMOF to affect gene regulation and DNA repair function. *Nucleic Acids Research*, gkw919. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw919>