



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Modificación del patrón de acetilación de histonas en  
respuesta a daño al DNA en cromosomas politénicos  
de *Drosophila melanogaster*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ERIA ALAIDE REBOLLAR CAUDILLO



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARTHA VERÓNICA VAZQUEZ LASLOP.

2004



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Modificación del patrón de acetilación de histonas en respuesta  
a daño al DNA en cromosomas politénicos de *Drosophila  
melanogaster*”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGA**  
**P R E S E N T A**  
**ERIA ALAIDE REBOLLAR CAUDILLO**

**DIRECTORA DE TESIS**  
**DRA MARTHA VERÓNICA VÁZQUEZ LASLOP**

**2004**



**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Modificación del patrón de acetilación de histonas en respuesta a daño al DNA en cromosomas politénicos de Drosophila melanogaster."

realizado por Eria Alaide Rebollar Caudillo

con número de cuenta 09954877-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop

Propietario Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Propietario Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Suplente Dr. Luis Felipe Jiménez García

*Act. M. Aguil. González*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*

**Consejo Departamental de**  
**Biología**

*[Firma]*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

A mi mamá, a mi papá, a mi hermana....

A Diego, siempre....

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada quisiera agradecer a la Dra. Martha Vázquez por su enorme apoyo y asesoría en este trabajo, porque sus enseñanzas han sido cruciales y porque gracias a ella comienzo este nuevo y largo camino que sigue.

Quiero agradecer enormemente al Dr. Mario Zurita por apoyarme durante el desarrollo del trabajo, enseñarme lo que es la investigación científica y porque su papel en este proyecto fue indispensable. Muchas gracias por la revisión de este trabajo y por sus útiles observaciones. Gracias Mario, por mostrarme el camino y enseñarme a ser cada vez mejor. Gracias al Dr. Enrique Reynaud por su gran ayuda en el laboratorio, porque gracias a sus conocimientos y entusiasmo este proyecto salió como lo esperaba, por las largas horas de trabajo y asesoría. Muchas gracias Enrique por contagiarme tu vitalidad y hacer del laboratorio un espacio de amigos.

Agradezco especialmente al Dr. Víctor Valdés, a la Dra. Rosario Rodríguez y al Dr. Luis Felipe Jiménez por sus indispensables observaciones durante la revisión de esta tesis, que me permitieron realizar un mejor trabajo.

Gracias a todos los miembros del laboratorio, en especial a Ingrid, Charis, Cris, Lucy, Rocío, Viviana y Shaday. Muchas gracias a Javier, porque además de las risas, le agradezco su enorme cooperación y su paciencia cada vez que necesitaba su ayuda. Gracias a Mariana por ser la mejor compañera de mesa y una gran persona.

Gracias a Ingrid y a Mayra, por compartir y construir el espacio familiar de Cuernavaca, por las prolongadas pláticas, las cenas, las risas. Sin ustedes, hubiera sido difícil.

Quiero también agradecer a la Facultad de Ciencias, por darme la oportunidad de aprender Biología, de crecer, y enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva, gracias a los enormes maestros, los alumnos y los amigos, porque esta etapa se acaba y yo ya la estoy extrañando.

Pasando a lo personal....

Agradezco primero a mi papá por su incondicional apoyo y cariño. Por enseñarme a disfrutar la vida y a reír, porque su vitalidad me ha dado siempre fuerzas y me enseña cada día algo nuevo. Gracias pa, porque a pesar de los tropiezos serás siempre un ejemplo a seguir.

Gracias a mi Mamá por su amor y apoyo en las buenas y en las malas. Gracias por estar siempre a mi lado y hacerme sentir protegida, porque nuestras pláticas me han enseñado de la vida y serán siempre necesarias. Porque te admiro como persona y madre, y porque este trabajo no hubiera sido lo que fue sin ti.

Gracias a Ursu por ser la mejor hermana que pude tener. Te doy gracias por tu cariño y por estar siempre conmigo. Gracias porque tu presencia me hace querer ser mejor y porque nuestra amistad me da energía para continuar. Gracias hermanita por ser como eres y permitirme la felicidad de tener a esa gran persona que eres a mi lado.

Gracias a Alice por ser una gran amiga y apoyarme siempre. Tus palabras me han guiado y pese a las adversidades de la vida siempre estás cerca. Gracias Alicita por tu enorme cariño y amistad.

Quiero agradecer a Velia y a Víctor por ser los mejores suegros, por hacerme parte de su vida y permitirme tener una segunda familia, gracias siempre por su apoyo. Gracias a Tatita, porque su vitalidad y cariño me han motivado siempre, porque pocas veces en la vida he aprendido tanto de alguien, porque sus risas estarán siempre en mi corazón.

Gracias a mi numerosa familia, gracias a los Caudillos y Rebollares que me han visto crecer y han creído en mí, gracias por su apoyo incondicional. Gracias a mi primo Jorge por ser parte de esta etapa y de las muchas que siguen, gracias a Luis y a Pola por todo su apoyo, gracias a Gerardo por formar parte de esta familia, por estar cerca y siempre apoyarme.

Gracias ahora a los amigos que me han acompañado siempre. Gracias a Mayri, porque nos encontramos y juntas la vida es mucho mejor, por su sabiduría y cariño incondicional, por hacerme crecer y porque su presencia me ilumina. Gracias a la Juls, porque la vida gira y seguimos juntas, porque la amistad no entiende distancias y su persona me llena de alegrías y ganas de seguir compartiendo. Gracias a Hele, por ser la maravillosa persona que és. Gracias por estar siempre conmigo y enseñarme tanto de la vida, gracias por las

maravillosas clases de Yoga que son insustituibles. Gracias a Andre por permitirme compartir y crecer juntas, porque la vida cambia pero nuestra amistad sigue, por que siempre me haces falta. Gracias a Brain, por acompañarme siempre, por enseñarme la música de la vida y estar siempre cerca. Te agradezco las pláticas, las risas, los encuentros y despedidas, gracias por estar siempre conmigo. Agradezco a Juli Reyes por que su sonrisa siempre ilumina, y por las experiencias que siguen por compartir. Gracias a Tatjana por darme la oportunidad de compartir esta etapa que acaba, porque sin ella no lo hubiera disfrutado tanto y porque su ayuda siempre ha sido importante. Gracias a Javi, Chili, Rodrigo, Enrique, por ir y venir pero siempre estar cerca, gracias por su presencia que me acompaña siempre.

Gracias a Diego por darme la fuerza y felicidad que me guía. Te agradezco todos estos años que juntos hemos construido, porque en ti me he encontrado a mi misma, por ser siempre maravilloso. Gracias porque lo único que deseo es que sigamos siempre juntos en el camino, por ser el amor más grande y único. Esta tesis es para ti...

# ÍNDICE

- RESUMEN.....	1
<b>- INTRODUCCIÓN</b>	
1. Remodelación de cromatina	
• La estructura de la cromatina y los mecanismos principales de remodelación.....	2-7
• El código histónico .....	7-12
• Las acetilasas de histonas (HATs) .....	12-14
2. El Supresor Tumoral p53	
• Funciones principales .....	14-15
• El código de p53 y las principales moléculas involucradas .....	16-18
• La función de p53 en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	19-20
3. Reparación de DNA	
• La reparación por escisión de nucleótidos (NER) y otros mecanismos .....	21-24
• La remodelación de cromatina en la reparación del DNA .....	25-29
• La importancia de p53 en la reparación del DNA .....	29-30
- JUSTIFICACIÓN .....	31-32
- HIPÓTESIS .....	33
- OBJETIVO .....	34
<b>- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	
A. Cuidado de las líneas de mosca utilizadas .....	35-36
B. Anticuerpos utilizados .....	36

C. Tratamientos analizados .....	37
D. Inmunotinción de cromosomas politénicos	
• Preparación de squashes .....	37-39
• Inmunotinción .....	39-40
E. Microscopía confocal .....	40
F. Análisis de los datos .....	41
G. Tratamiento Estadístico .....	42
- RESULTADOS	
• Metodología general y número de muestras analizadas .....	43-44
• Patrón de acetilación de K9 y K14 de la H3 en cromosomas politénicos.....	45-47
• Patrón de acetilación de la K9 de la H3 en cromosomas politénicos .....	47-49
• Patrón de acetilación de la K14 de la H3 en cromosomas politénicos .....	49-52
• Análisis del valor del píxel a la máxima intensidad (255) .....	52-55
- DISCUSIÓN .....	56-63
- CONCLUSIÓN .....	64
- PERSPECTIVAS .....	65-66
- ANEXO 1 .....	67-68
- ANEXO 2 .....	69-72
- REFERENCIAS .....	73-77

## RESUMEN

La remodelación de la cromatina es un proceso extremadamente regulado a distintos niveles mediante diversos mecanismos. Uno de estos mecanismos es conocido como el código histónico, y consiste en la modificación postraduccional de las colas de histonas presentes en los nucleosomas durante diversos procesos celulares. Una de las modificaciones mejor caracterizadas es la acetilación de lisinas en las histonas, la cuál está involucrada primordialmente en eventos de activación transcripcional y reparación del DNA. Diversas evidencias en células humanas han probado que el aumento en la acetilación de histonas es parte de la respuesta celular al daño a DNA por la irradiación de luz UV y que en este contexto la proteína p53 juega un papel indispensable.

El factor supresor tumoral p53 es un factor transcripcional que ejerce su función en respuesta al estrés celular mediante la activación de vías apoptóticas, de detención del ciclo celular y de reparación del DNA. En respuesta a daño al DNA por luz UV, p53 es importante para promover la accesibilidad a los sitios del daño mediante la relajación global de la cromatina en células humanas, esta relajación se da a partir de la acetilación global de histonas. En específico, p53 ha resultado ser importante para la correcta acetilación de la K9 y de la K14 de la histona H3.

Con base en todo lo anterior, en este trabajo se determinaron los cambios en la acetilación de la H3 en los residuos K9 y K14 en respuesta a daño al DNA por luz UV en *Drosophila melanogaster*. Por otra parte se evaluaron estos cambios en una línea mutante nula para el gen *Dmp53* (Homólogo de p53 en mamífero). A diferencia de las evidencias previas *in vitro* en este proyecto se analizaron cromosomas politénicos de *Drosophila*, ya que constituyen un modelo ideal para estudiar la función *in vivo* de Dmp53 en el contexto de la cromatina. A partir de los resultados de este trabajo es posible pensar que la acetilación de la K9 y K14 de la H3 son componentes de la respuesta a daño al DNA inducido por luz UV en cromosomas politénicos de *D.melanogaster*. Asimismo, fue posible observar que Dmp53 es importante para el aumento en la acetilación de la K9 como parte de la respuesta a daño al DNA por luz UV y es esencial para mantener los niveles constitutivos de acetilación de la K14 de la histona H3. Estos resultados sugieren que Dmp53 tiene un posible papel en la correcta acetilación de las colas de histonas, ejerciendo una función diferencial dependiendo del residuo y del contexto celular.

# INTRODUCCIÓN

## 1. REMODELACIÓN DE CROMATINA

- **Estructura de la cromatina y los mecanismos principales de remodelación**

El material genético de toda célula eucarionte se encuentra estructurado con un alto grado de organización que constituye lo que conocemos y estudiamos como cromatina. La cromatina esta compuesta principalmente de fibras que contienen DNA, proteínas y pequeñas cantidades de RNA (Nelson y Cox, 2000).

Los grupos fosfato de carga negativa característicos del DNA se asocian fuertemente con proteínas básicas llamadas las histonas (Darnell *et al.*, 2004). Esta interacción constituye las unidades estructurales de la cromatina denominadas nucleosomas, al nivel del cual se dan todos los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA, entre muchos otros. El centro o "core" de un nucleosoma está formado por un octámero con dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor de las cuales se enrollan aproximadamente 147 pares de bases de DNA (Figura1).

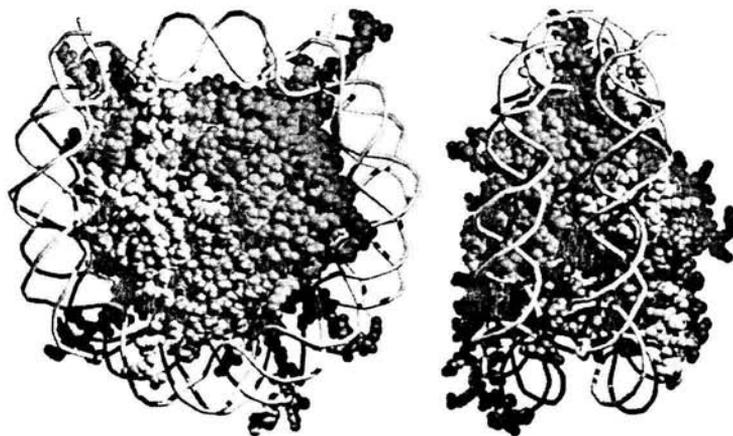
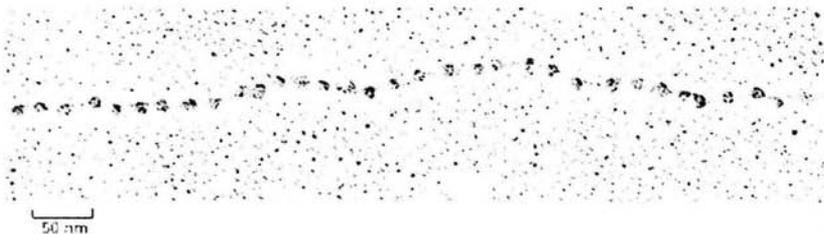


Figura 1

Representación de la estructura de un nucleosoma basada en la estructura cristalográfica obtenida en años recientes. Diagrama visto de frente (izquierda) o visto del lado derecho (derecha). El DNA se muestra en gris, H2A en amarillo, H2B en rojo, H3 en azul y H4 en verde (tomada de Darnell *et al.*, 2004).

Cada nucleosoma está conectado al siguiente mediante un fragmento de DNA (conocido como "linker DNA") que varía de 15 a 55 pares de bases dependiendo de la especie (Darnell *et al.*, 2004)..

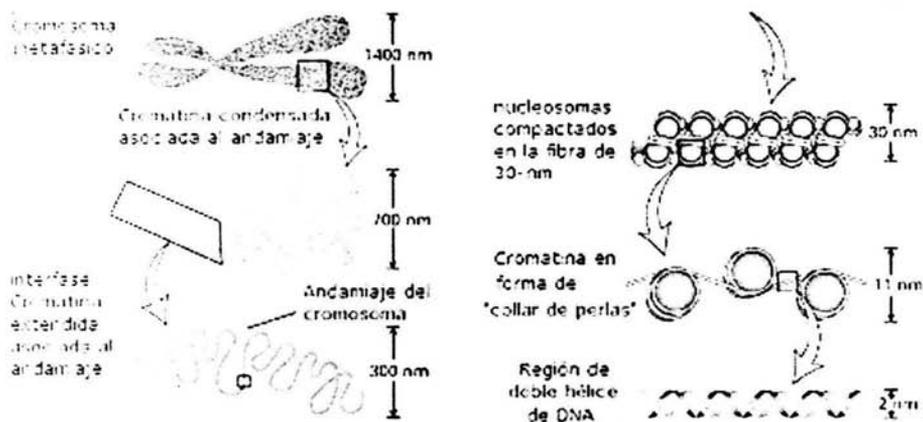
Esta estructura conocida como "collar de perlas" constituye el primer nivel de empaquetamiento de la cromatina con un diámetro aproximado de 10nm (Figura 2).



**Figura 2**

**Foto de microscopía electrónica después de un tratamiento de descondensación de cromatina que propicia la pérdida de H1 y por ende se desensambla la cromatina (modificada de Alberts *et al.*, 2002)**

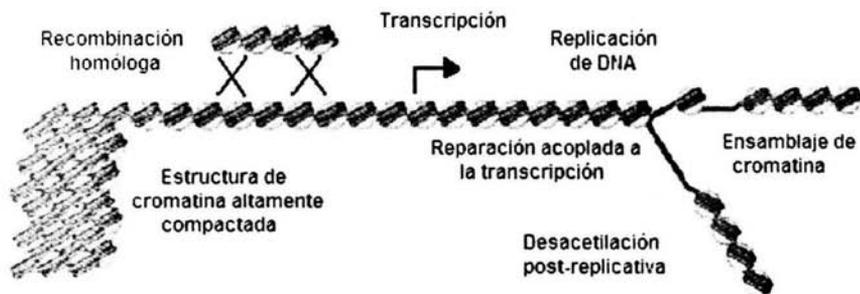
Asimismo, la histona H1 se une al DNA desnudo entre cada nucleosoma y propicia la formación de estructuras altamente condensadas conocidas como solenoides o fibras de 30nm (Nelson y Cox, 2000). La estructura de la cromatina después de este nivel es extremadamente complicada y poco conocida, sin embargo se piensa que la fibra de 30nm se ensambla sobre un andamiaje formado por proteínas distintas a las histonas permitiendo la formación de estructuras extremadamente complejas como son los cromosomas metafásicos (Figura 3)(Darnell *et al.*, 2004).



**Figura 3**

Esquema de los distintos niveles de condensación de la cromatina, desde la doble hélice de DNA hasta los cromosomas metafásicos (modificada de Darnell *et al.*, 2004).

La remodelación de la cromatina es uno de los procesos indispensables para la correcta regulación génica en cualquier eucarionte, ya que de esta remodelación dependen la activación o represión de genes de manera diferencial y específica. Los procesos celulares en los que la cromatina necesita ser remodelada se esquematizan en la figura 4.



**Figura 4**

Diversos procesos celulares en los que la remodelación de la cromatina es indispensable (modificada de Fyodorov y Kadonaga, 2001).

La descondensación de la cromatina es un proceso necesario para permitir la entrada de los factores nucleares al templado de DNA. Estos factores son esenciales en los procesos de transcripción, replicación, recombinación y reparación del DNA y por lo tanto es un proceso

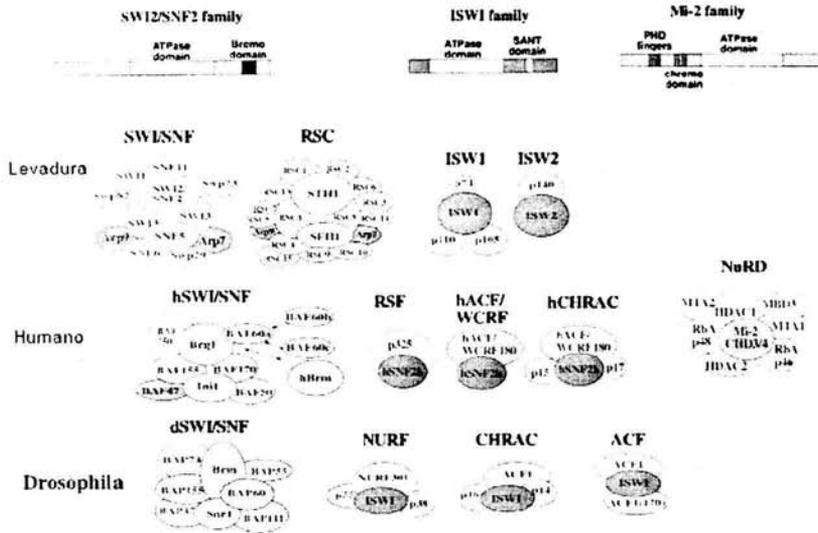
extremadamente regulado a distintos niveles. Gracias a la investigación de los últimos años, la cromatina ya no es considerada sólo el elemento estructural responsable de preservar la información genética en el núcleo, sino también es una estructura extremadamente dinámica que se modifica de manera constante permitiendo diversos procesos celulares.

La cromatina puede ser remodelada a diferentes niveles y mediante distintos procesos; la búsqueda y caracterización de los complejos remodeladores de la cromatina ha sido recientemente el objetivo de un gran número de grupos de investigación en todo el mundo.

Existen por lo menos tres formas principales en las que la cromatina puede ser remodelada (Lisuka *et al.*, 2003):

1. Complejos que contienen subunidades de ATPasa dependiente de DNA, que relajan o condensan la cromatina

Para contrarrestar la naturaleza compacta de la cromatina, existen una variedad de factores remodeladores que utilizan la hidrólisis de ATP para reorganizar la cromatina, facilitando así la interacción de otras proteínas con el DNA nucleosomal (Fyodorov y Kadonaga, 2001). Existen diversas familias de complejos remodeladores dependiendo del tipo de subunidad ATPasa que presentan, las cuales están conservadas a lo largo de la evolución (Figura 5). Por otro lado, numerosos complejos remodeladores han sido caracterizados como participantes en distintos procesos como la transcripción, la reparación acoplada a la transcripción y la recombinación homóloga entre muchos otros (Fyodorov y Kadonaga, 2001).



**Figura 5**

Complejos remodeladores dependientes de DNA conservados en eucariontes encontrados hasta el 2002. Estos complejos se dividen en tres clases con base en la identidad de su dominio ATPasa (modificada de Narlikar et al., 2002).

## 2. Reemplazamiento de histonas por sus variantes

La composición de los nucleosomas puede ser modulada reemplazando algunas histonas por variantes especializadas con funciones que ocurren en tiempos específicos del desarrollo, así como en ciertos tipos celulares, como sucede en el caso de la variante H3.3. Durante la fase S se lleva a cabo la síntesis de DNA y por lo tanto también la síntesis de las histonas que formarán los nuevos nucleosomas. Por lo anterior, la replicación constituye el momento en que todas las modificaciones de histonas se reestablecen. Sin embargo, el ensamblaje de zonas de cromatina activa parece ocurrir a lo largo de todo el ciclo celular, ya que por ejemplo, se ensambla la variante H3.3 en vez de la H3. La existencia de este mecanismo de ensamblaje independiente de la fase S implica que el estado de la cromatina es también regulada por medio del reemplazo de los nucleosomas viejos por nucleosomas nuevos que contienen la variante de la H3 en este caso (Ahmad y Henikoff, 2003). Por otro lado, existen tipos celulares específicos, como las neuronas, en donde el 87% de la cromatina presenta la variable H3.3 en lugar de la H3 (Ahmad y Henikoff, 2003).

### 3. Las modificaciones postraduccionales de histonas

Las colas N-terminales de las histonas pueden ser modificadas postraduccionalmente por complejos especializados. Estas modificaciones pueden alterar la estructura de la cromatina de dos maneras.

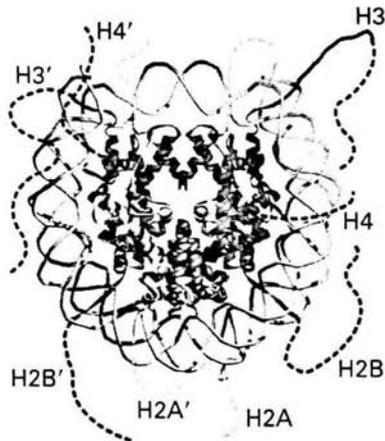
La primera ocurre debido a que las histonas sufren cambios en su carga electrostática y por lo tanto alteran la carga local de los nucleosomas. Este evento puede cambiar las propiedades estructurales de las histonas, modificando así la interacción de éstas con el DNA y con las histonas adyacentes.

La segunda ocurre cuando distintas combinaciones de estas modificaciones funcionan como plataformas para reclutar diversos complejos capaces de modificar la estructura de la cromatina (Lisuka *et al.*, 2003).

Debido al tema de esta tesis, este último mecanismo de remodelación será explicado detalladamente en el siguiente inciso.

- **El código histónico**

Las histonas son proteínas relativamente pequeñas y extremadamente conservadas en el curso de la evolución. Los dominios C-terminales de las histonas, presentes al interior del nucleosoma, tienen conformaciones específicas que son críticas para el ensamblaje del nucleosoma ya que propician uniones muy estables histona-histona e histona-DNA. Por otra parte, los dominios N-terminales de las histonas, comúnmente denominados colas de histonas están menos estructurados que los dominios C-terminales y no son esenciales para la integridad de la estructura de los nucleosomas (Cheung *et al.*, 2000.a)(Figura 6).

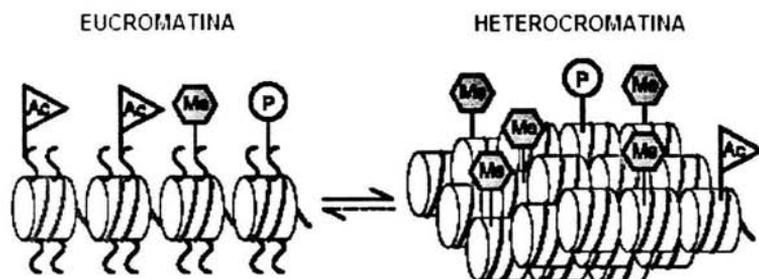


**Figura 6**

**Estructura de un nucleosoma en donde la región C-terminal de las histonas se encuentra altamente estructuradas en el centro, mientras que las colas N-terminales son flexibles y están expuestas al ambiente nuclear (tomada de Darnell *et al.*, 2004).**

Debido a su flexibilidad y accesibilidad a factores nucleares, las colas de histonas constituyen blancos fáciles de modificación postraduccional que pueden por un lado modificar las cargas locales en regiones específicas, o bien constituir plataformas de numerosos factores nucleares como son los complejos remodeladores y los factores transcripcionales (Nowak y Corces, 2004). A esta última propiedad de las histonas, David Allis y colaboradores le denominaron "código histónico" (Strahl y Allis, 2000).

La hipótesis del código histónico propone que las colas N-terminales de las histonas son modificadas postraduccionalmente por complejos remodeladores, y que las combinaciones de estas modificaciones covalentes reversibles, propician respuestas en sitios específicos en el genoma (Strahl y Allis, 2000). El siguiente año, este mismo grupo extendió el concepto al nivel de la estructura global del cromosoma, proponiendo que los distintos dominios de euromatina (cromatina activa y relajada) y heterocromatina (cromatina silenciada y compactada) están determinados por la combinación diferencial y por la concentración de estas modificaciones en los nucleosomas ( Jenuwein y Allis, 2001) (Figura 7).

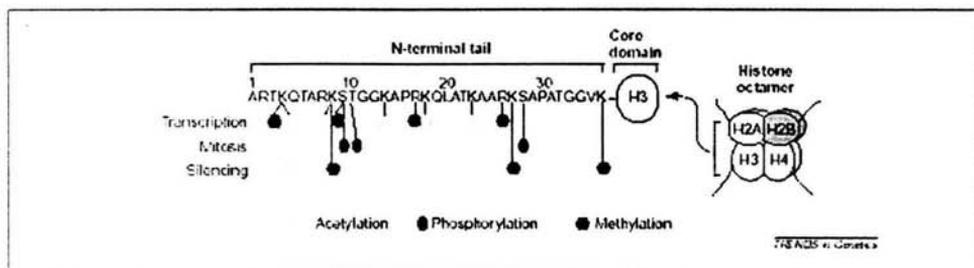


**Figura 7**

Representación esquemática de la eucromatina y la heterocromatina como grupos de nucleosomas relajados o condensados dependiendo de la presencia diferencial de acetilaciones (Ac), metilaciones (Me) y fosforilaciones (P) (modificada de Jenuwein y Allis, 2001).

Las modificaciones de histonas provocan alteraciones en la cromatina a corto o largo plazo, de manera tal que las células sean capaces de modificar la expresión de los genes frente a cambios ambientales y las condiciones específicas de crecimiento y diferenciación. Asimismo, las células pueden mantener programas de expresión génica heredables a las siguientes generaciones celulares, manteniendo así una identidad específica (Jenuwein, 2001).

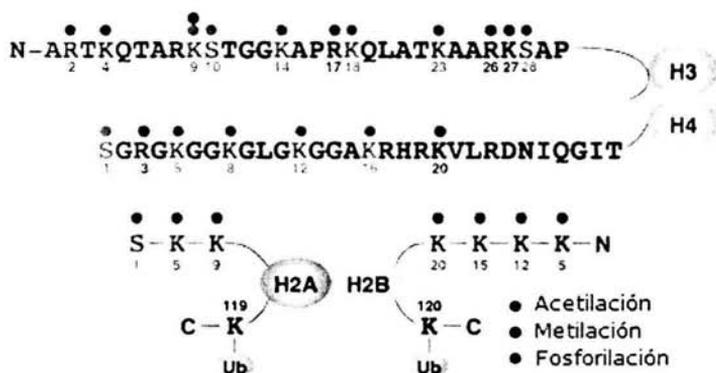
Las modificaciones postraduccionales conocidas a la fecha son las acetilaciones de lisinas, las metilaciones de lisinas y argininas, la fosforilación de serinas, la ubiquitinación de lisinas, la sumoilación y la ADP-ribosilación. Existen en la naturaleza diversos complejos responsables de estas modificaciones covalentes en las histonas, conservados desde levadura hasta humanos. Durante la última década el descubrimiento de factores involucrados ha incrementado dramáticamente, y la información acerca de la función específica de cada modificación se ha ido refinando cada vez más (Figura 8), sin embargo existen muchas más preguntas que respuestas con respecto al mecanismo de acción y a la manera en que se combinan estas modificaciones para ejercer efectos específicos en la cromatina.



**Figura 8**

Modificaciones del dominio N-terminal de la H3. Se indican los sitios de las modificaciones covalentes, acetilación (azul claro), fosforilación (rojo) y metilación (azul oscuro). Los procesos celulares asociados a cada modificación se señalan al lado izquierdo de cada una de las modificaciones (modificada de Nowak y Corces, 2004).

La acetilación, la metilación y la fosforilación son las tres modificaciones mejor caracterizadas (Figura 8), de las cuales la única irreversible es la metilación, ya que hasta ahora no se ha encontrado en la naturaleza ninguna desmetilasa de histonas. Por otra parte, se han encontrado numerosas acetilasas (HATs), desacetilasas (HDACs), metilasas (HMTs), cinasas y fosfatasa responsables de establecer este código histónico.



**Figura 9**

Sitios de modificación postraduccionales de las colas de histonas. Se muestran acetilaciones (lila), metilaciones (rojo), fosforilaciones (azul) y ubiquitinaciones (naranja). La lisina 9 de la H3 puede ser acetilada o metilada (modificada de Zhang y Reinberg, 2001).

En particular, las lisinas 9,14,18 y 23 de la cola de la H3 son blancos de acetilación así como las lisinas 5,8,12 y 16 de la H4 (Figura 9). Por motivos de este trabajo, las lisinas se representarán como la letra K de acuerdo con la nomenclatura universal de los aminoácidos (Nelson y Cox, 2000).

Las histonas acetiladas se han asociado generalmente con cromatina transcripcionalmente activa (en específico la acetilación de la K9 y K14 de la H3) y las histonas desacetiladas con cromatina inactiva (Grant, 2001) (Figura 8). La presencia de residuos en las histonas puede debilitar los contactos histona-DNA e histona-histona con los nucleosomas adyacentes, generando un ambiente permisivo para la transcripción (revisado en Roth *et al.*, 2001). Sin embargo, en los cromosomas politénicos de *Drosophila*, se ha observado que la acetilación de la H3 y H4 no cambia en respuesta a choque térmico (Nowak y Corces, 2000) y no se encuentra necesariamente presente en regiones de activación transcripcional (Labrador y Corces, 2003). La acetilación está también involucrada en procesos como la compensación de dosis del cromosoma X del macho en *Drosophila* (K16 de la histona H4) y en silenciamiento génico como el caso de la acetilación de K14 de la H4 en levadura y *Drosophila* (revisado en Grant, 2001). Se sabe también que la acetilación de histonas permite rearrreglos nucleosomales que aumentan la accesibilidad de factores de transcripción al DNA y de los complejos de reparación del DNA. La acetilación también tiene una participación directa en la reparación de DNA por rupturas de doble hebra (DSB por "Double Strand Breaks" en inglés) y radiación ionizante (RI) en levadura (revisado en Lisuka *et al.*, 2003). Por otra parte, hay un aumento global en la acetilación de histonas en respuesta al daño al DNA por luz UV (Ramanathan y Smerdon, 1986).

Las histonas metiladas (específicamente en la K9 de la H3) están presentes en regiones de heterocromatina y constituyen una marca de memoria de zonas silenciadas. Esta metilación ha sido ampliamente caracterizada en mamíferos, levadura y *Drosophila* (revisado en Jenuwein y Allis, 2001). Los componentes de esta maquinaria de represión se encuentran conservados en eucariontes y constituyen un mecanismo esencial para mantener la cromatina condensada tanto en la heterocromatina facultativa como en la constitutiva (Rea *et al.*, 2000). La heterocromatina constitutiva es la que se encuentra siempre en un estado condensado, como el caso de los centrómeros, mientras que la facultativa tiene la capacidad de descondensarse y volver a un estado eucromático, como es el caso de las zonas de transcripción génica. En el caso de la levadura, la di-metilación de la K4 de la H3 está involucrada en el silenciamiento de rDNA (Briggs *et al.*, 2001) mientras que la tri-metilación de este mismo residuo constituye una marca de activación génica (revisado en Lisuka *et al.*, 2003), agregando un mayor nivel de complejidad al código

histónico. Asimismo, en levadura se ha caracterizado la metilación de la K36 de la H3 como una marca de elongación transcripcional (Xiao *et al.*, 2003).

La fosforilación de histonas se ha correlacionado de manera importante con fenómenos diversos. Entre los más importantes se encuentra la condensación cromosomal y la progresión del ciclo celular (Nowak y Corces, 2004). También se ha relacionado con la transcripción, la reparación de DNA y la apoptosis (Cheung *et al.*, 2000.a). La fosforilación de la serina 10 de la H3 es la más estudiada hasta la fecha, y está relacionada con la activación transcripcional en células de mamífero (Cheung *et al.*, 2000.b) y con la inducción de la transcripción en respuesta a choque térmico en *Drosophila* (Nowak y Corces, 2000). También se ha demostrado, que en algunos modelos como en mamífero y levadura, la fosforilación de la serina 10 de la H3 facilita la acetilación de la K14 de la H3, a través del reclutamiento de HATs ( Cheung *et al.*, 2000.b) Por otra parte, la variante H2AX en mamífero y levadura (y H2AZ en *Drosophila*) es rápidamente fosforilada en respuesta a daño a DNA por DSBs (Madigan *et al.*, 2002 y revisado en Green y Almouzni, 2002). También existen marcas de fosforilación de H2B en mamífero durante la activación de vías apoptóticas (Cheung L *et al.*, 2003.a).

- **Las acetilasas de histonas (HATs)**

Los complejos responsables de la acetilación de lisinas en las histonas son conocidos como acetilasas de histonas (HATs). Muchas de estas proteínas han resultado ser reguladores transcripcionales o coactivadores como Gcn5 en levadura, y por lo tanto la acetilación se asocia fuertemente a procesos de activación transcripcional (revisado en Grant, 2001). Existen hasta ahora, 5 familias de HATs; GNAT, MYST, p300/CBP, factores basales de transcripción y receptores nucleares. Cada una de las familias presenta distintos dominios conservados y distinta afinidad a sus blancos (Tabla 1) (Roth *et al.*, 2001).

Grupo HAT	HAT y sus complejos asociados	Histonas acetiladas por HATs recombinantes	Histonas acetiladas por complejos HAT	Interacción con otras HATs
GNAT	Gcn5(SAGA,ADA,A2) PCAF(PCAF) Hat1(HatB) Elp3(elongador) Hpa2	H3 >> H4 H3 >> H4 H4 >> H2A H2A,H2B,H3,H4 H3 >> H4	H3, H2B H3, H4 H4, H2A	p300; CBP p300; CBP
MYST	Esa1 (NuA4) MOF (MSL) Sas2 Sas3 (NuA3) MORF Tip60 Hbo1 (ORC)	H4 >> H3, H2A H4 >> H3, H2A Desconocido Desconocido H4 > H3 H4 >> H3, H2A	H2A, H4 H4 H3 H3, H4	
p300/CBP	p300 CBP	H2A,H2B,H3,H4 H2A,H2B,H3,H4		PCAF; GCN5 PCAF; GCN5
Factores basales de transcripción	TAFII250 (TFIID) TFIIC Nut1(mediador)	H3 >> H2A	H3, H4 > H2A H3 >> H4	
Receptores nucleares y cofactores	ACTR SRC1	H3 > H4 H3 > H4		p300;CBP;PCAF p300;CBP;PCAF

**Tabla 1**  
**Características generales de las familias de HATs (modificada de Roth, 2001).**

En la familia p300/CBP existen varios dominios, dentro de los cuales se encuentra el bromodominio. Se sugiere que el bromodominio presente en las HATs puede ser importante para promover la interacción de estas enzimas con la cromatina y propiciar su relajación durante la activación transcripcional (Marmostein y Berger, 2001). Se ha propuesto que la presencia de uno o varios bromodominios en las HATs les confiere una gran especificidad. Ejemplos importantes son Gcn5p y PCAF, los cuales tienen una clara preferencia por acetilar la K14 en la H3 (revisado en Roth *et al.*, 2001).

Con base en lo anterior, se sugiere que los bromodominios tienen un papel dual: primero el reclutamiento de complejos a nucleosomas específicos para ser acetilados, y una vez acetilados, el reforzar la interacción para promover cascadas de acetilación (Marmostein y Berger, 2001). Ya que los bromodominios reconocen y se unen a histonas acetiladas (Roth *et al.*, 2001), este dominio está presente, no sólo en las HATs, sino también en subunidades de complejos remodeladores con ATPasas dependientes de DNA. Por ende estos complejos

reconocen las acetilaciones en las histonas de manera muy específica y remodelan así la cromatina.

Además de acetilar histonas, las HATs pueden acetilar otras proteínas como algunos activadores transcripcionales, p53, factores de transcripción basal, algunas importinas, entre muchas otras proteínas (Roth *et al.*, 2001).

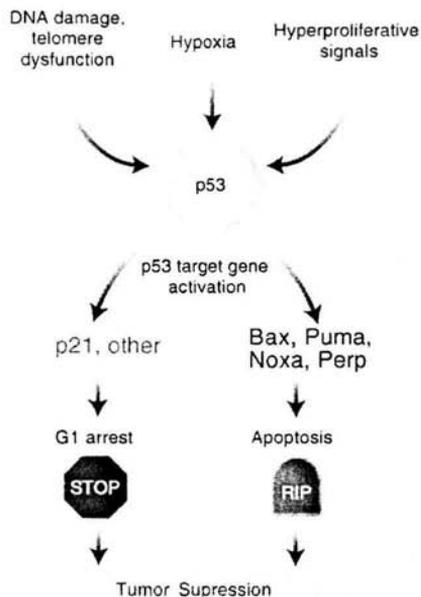
## 2. EL SUPRESOR TUMORAL p53

- **Funciones principales**

El factor supresor tumoral p53 es un factor transcripcional que ejerce su función en respuesta al estrés celular. En ausencia de estrés celular, p53 se mantiene a niveles bajos en la célula. Sin embargo, en respuesta a distintos tipos de estrés, como en el caso de la incidencia de luz UV, p53 aumenta tanto a nivel del transcrito como a nivel de la proteína (Mazan-Mamczarz *et al.*, 2003). Asimismo, p53 es activado por diversas enzimas que le confieren diversas modificaciones postraduccionales.

Muchos tipos de estrés inducen la activación de p53, como el daño al DNA, la activación de oncogenes, la hipoxia, la disminución de los telómeros, la pérdida del crecimiento normal y de las señales de sobrevivencia (Ryan *et al.*, 2001). En mamíferos, al activarse p53 se une a elementos de respuesta a p53 en el DNA e induce la transcripción o represión de cientos de genes. El resultado es la activación de vías de apoptosis, de detención del ciclo celular, de senescencia y de reparación del DNA (Oren, 2003) (Figura 11).

Con respecto a la función de p53 en el ciclo celular, uno de sus principales blancos es el gen *p21*, el cuál es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, de esta forma al transcribirse induce la detención del ciclo celular en la etapa G<sub>1</sub>/S. Por otra parte, los blancos río abajo de la apoptosis mediada de p53 son menos conocidos. De los principales candidatos para formar parte de esta vía *in vivo* son algunos miembros de la familia *bcl2*, *bax*, *nox*, así como receptores de muerte como *fas* (revisado en Sogame *et al.*, 2003)(Figura 10)



**Figura 10**

La activación de p53 se induce por diversos tipos de estrés. p53 induce la expresión de genes teniendo como consecuencia la detención del ciclo celular y la activación de vías apoptóticas. Ambas vías contribuyen a la supresión tumoral (tomada de Attardi y De Pinho, 2004).

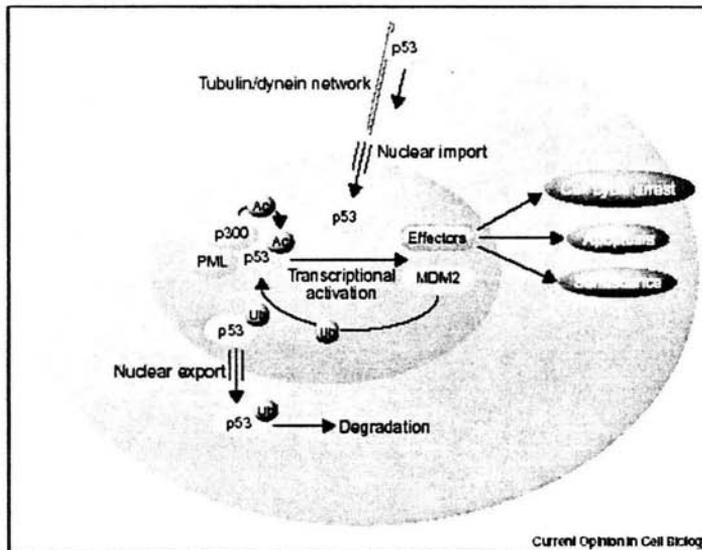
Por otro lado p53 tiene funciones independientes de la transcripción, que son mucho menos conocidas, entre las cuales se encuentra la capacidad de relocalizar los receptores de muerte a la superficie celular, un papel directo en la mitocondria y la capacidad de regular la traducción de proteínas uniéndose al UTR5' de diversos mRNAs (revisado en Ryan *et al.*, 2001)

p53 es conocido como "el guardián del genoma" por su capacidad de activar respuestas al estrés. Al activarse acelera la reparación del DNA o, si el daño es excesivo, induce la apoptosis y la detención del ciclo celular, lo que evita la aparición y propagación de células tumorales. Por lo anterior, p53 es una de las proteínas que se encuentra mutada en la mayoría de los cánceres (Oren, 2003).

Dentro de todos los efectos que p53 propicia en la célula, los más caracterizados son la detención del ciclo celular y la apoptosis. De forma paralela, se ha caracterizado la participación de p53 en la reparación del DNA por diversas vías que serán analizadas en detalle más adelante.

- **El código de p53 y las principales moléculas involucradas**

Mdm2 (de "Mouse double minute 2" en inglés) es la proteína más importante para mantener niveles bajos de p53 en ausencia de estrés celular. Mdm2 es un oncogene que al unirse a p53 inhibe la actividad transcripcional del supresor tumoral, ya que le impide la unión a sus blancos. Por otra parte Mdm2 induce la degradación de p53 ya que funciona como una E3 ligasa de ubiquitina (Oren, 2003). Debido a que *Mdm2* es un blanco transcripcional de p53, existe un asa de regulación negativa en la que el aumento de p53 induce el aumento en la expresión de su regulador negativo (Ryan *et al.*, 2001) (Figura 11). La acumulación de p53 en respuesta a diversos tipos de estrés se debe a diversos mecanismos celulares que liberan a p53 del efecto de Mdm2. Tanto p53 como Mdm2 sufren una serie de modificaciones postraduccionales, su localización subcelular cambia, se inhibe la actividad de Mdm2 y se reprime la transcripción de la misma (Brooks y Gu, 2003).

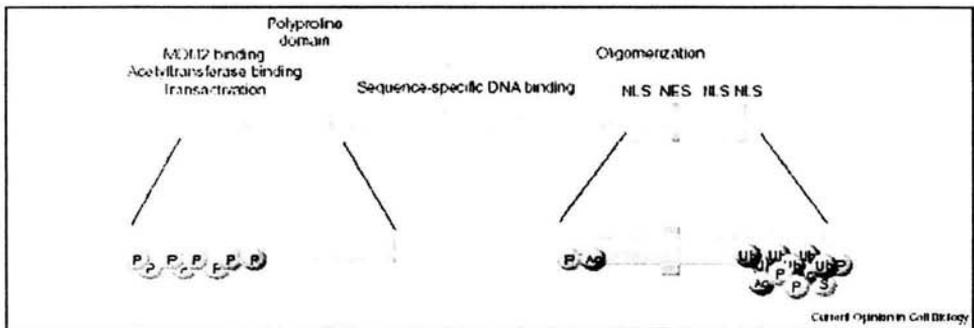


**Figura 11**

Caricatura que muestra algunos de los mecanismos que regulan la localización subcelular, estabilidad y actividad transcripcional de p53 (tomada de Ryan *et al.*, 2001).

Además de la función reguladora de Mdm2 sobre p53, ésta última sufre diversas modificaciones postraduccionales en distintas regiones que le permiten estabilizarse y activarse en respuesta al estrés.

La proteína p53 en mamíferos está compuesta de 393 aminoácidos y está constituida por tres dominios principales: un dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal al cual se une Mdm2, un dominio de unión a DNA y un dominio de oligomerización en el extremo C-terminal (Nordstrom y Abrams, 2000). Las regiones C-terminal y N-terminal de p53 están sujetas a modificaciones diversas como fosforilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación (Brooks y Gu, 2003) (Figura 12).



**Figura 12**

Los dominios principales de p53 y las modificaciones amino y carboxilo terminales. Acetilación (Ac), señal de exportación nuclear (NES), señal de localización nuclear (NLS), fosforilación (P), sumoilación (S), ubiquitinación (Ub) (tomada de Brooks y Gu, 2003).

La fosforilación de p53 es la modificación postraducciona l más estudiada. Existen diversas cinasas encargadas de fosforilar a p53 en diversos residuos tales como las serinas 15 y 46 en el N-terminal y la 392 en el C-terminal. Debido a las múltiples funciones de p53, es necesaria la convergencia de diversas señales que especifiquen la función de esta proteína en momentos determinados de la célula. Las marcas de fosforilación sobre p53, le pueden conferir una especificidad con respecto al tipo de respuesta celular que se debe llevar a cabo. Por otra parte las combinaciones e específicas de fosforilaciones pueden propiciar modificaciones posteriores sobre la proteína (Brooks y Gu, 2003). Uno de los principales objetivos en la actualidad es la caracterización de más proteínas participantes en la activación y estabilización de p53 en respuesta a agentes genotóxicos como la luz UV (revisado en Brooks y Gu, 2003). Un ejemplo específico es el caso de la cinasa ATM, la cual se encarga de activar y fosforilar a la serina 15

de p53 en respuesta a radiación ionizante (RI), y no en repuesta a UV (Canman *et al.*, 1998). De manera muy general, se ha observado que p53 es intensamente fosforilado en el extremo N-terminal en respuesta a daño al DNA (Figura 12). Esta modificación libera a p53 de la regulación negativa de Mdm2, y propicia su estabilización y activación como factor transcripcional. Además, la fosforilación del extremo C-terminal aumenta su afinidad por el DNA *in vitro* (revisado en Mujtaba *et al.*, 2004).

Asimismo, la acetilación de p53 es otra de las modificaciones postraduccionales indispensables para la activación de ésta. A diferencia de la fosforilación, en donde están involucradas un gran número de cinasas, las acetilasas de las lisinas de p53 son, hasta la fecha, CBP/p300 y PCAF/hGcn5 (Factor asociado a p300/CBP) (Barlev *et al.*, 2001). p300 y CBP habían sido caracterizadas previamente como acetilasas de histonas (HATs) y ahora son también consideradas acetilasas de factores transcripcionales (FATs). Las consecuencias funcionales de la acetilación de p53 son muy diversas, entre ellas se encuentra el aumento en su afinidad al DNA, su estabilidad y genera cambios en las interacciones proteína-proteína. Por otro lado, recientemente se ha descubierto que la acetilación de p53 *in vivo* es necesaria para el reclutamiento de factores como CBP y PCAF a regiones promotoras de genes activados por p53 (revisado en Brooks y Gu, 2003). Por otra parte, estudios *in vivo* muestran que la acetilación de p53 no aumenta su afinidad de unión al DNA sino que propicia el reclutamiento de coactivadores, que permiten la acetilación de histonas y la activación transcripcional de genes blanco (Barlev *et al.*, 2001). Además, p53 es capaz de reclutar a TFIIH y XPC (componentes de la maquinaria de reparación de DNA) a sitios en donde se ha dañado el DNA por luz UV, (Wang *et al.*, 2003).

Al obtener la estructura tridimensional de p53 unido a CBP por resonancia magnética nuclear (RMN), se demostró que estas dos proteínas se unen a través de la acetilación de la lisina 382 de p53 (K382) (Mujtaba *et al.*, 2004). En este mismo análisis, se demostró que el bromodominio de CBP reconoce específicamente la acetilación de la K382 de p53. De esta manera, p53 es capaz de reclutar a CBP *in vivo* en respuesta a daño al DNA, y de esta forma activa la transcripción de genes específicos.

- **La función de p53 en *Drosophila melanogaster***

La proteína homóloga a p53 de mamíferos en *Drosophila melanogaster* es conocida como Dmp53. Dmp53 es una proteína de 385 aminoácidos que comparte propiedades en regiones que han sido caracterizadas por ejercer funciones específicas en p53 de mamífero. Es decir que Dmp53 tiene dominios conservados tales como el dominio de unión al DNA, un dominio de activación transcripcional en el extremo N-terminal, un dominio de activación transcripcional y un dominio de oligomerización en el extremo C-terminal. De estos 3 dominios conservados de p53, Dmp53 tiene una mayor homología en el dominio de unión al DNA (43% de similitud) (Nordstrom y Abrams, 2000). Un factor importante que hace a *Drosophila* un buen modelo para el estudio de p53 es que de los 6 sitios de p53 comúnmente mutados en tumores de mamífero, 4 son idénticos y 2 parecidos en el homólogo de la mosca Dmp53 (Nordstrom y Abrams, 2000).

Como se mencionó anteriormente, cuando las células sufren estrés por diversos agentes genotóxicos, p53 detiene el ciclo celular e induce apoptosis.

Abrams et al., 2003 (de forma paralela a Lee et al., 2003) identificaron una mutación en el gen *Dmp53* que les permitió evaluar el efecto de la ausencia de la proteína en el contexto de la mosca. Esta línea mutante, generada por recombinación homóloga, carece por completo del transcrito y de la proteína Dmp53. A pesar de esto, la línea es viable pero tiene severos defectos en la apoptosis inducida por daño. A diferencia de los efectos en mamífero, estas moscas mutantes no tienen ningún defecto en la regulación del ciclo celular, es decir que la respuesta al daño mediada por Dmp53 en las células de la mosca, es independiente de la detención del ciclo celular (Sogame et al., 2003). A partir de estos resultados, se propone que las funciones ancestrales del gene *p53* están íntimamente ligadas a la muerte celular como una respuesta adaptativa para mantener la estabilidad genómica en un organismo, y que la detención del ciclo celular es una función que aparece probablemente a partir de los vertebrados o incluso de los mamíferos (Sogame et al., 2003). De manera adicional, estudios funcionales previos en ausencia de Dmp53 en el ojo y en los discos de ala afectaron las vías de apoptosis y no de progresión del ciclo celular. A pesar de que p21 en *Drosophila* induce detención del ciclo celular, su transcripción es independiente de Dmp53, a diferencia de lo que ocurre con p53 en mamífero (revisado en Nordstrom y Abrams, 2000).

Por otro lado, la regulación de Dmp53 parece ser distinta a la que se conoce en mamíferos; hasta ahora no se han encontrado ortólogos de Mdm2 ni de su regulador río arriba

conocido como p19ARF. Además los residuos específicos de unión de Mdm2 a p53 en mamífero, están ausentes en Dmp53 (Nordstrom y Abrams, 2000). Lo anterior sugiere que el mecanismo por el que Dmp53 actúa en respuesta a agentes genotóxicos debe ser distinto, al menos en parte, a la vía de acción conocida en mamíferos.

De manera independiente se sabe que las modificaciones postraduccionales en Dmp53, como la fosforilación mediada por MNK (homólogo de Chk2 en mamíferos) es suficiente para activar a Dmp53 en respuesta a RI. Además se han caracterizado diversos genes en *Drosophila*, cuya transcripción es activada por Dmp53, que están involucrados tanto en vías de apoptosis como en los de reparación de DNA (Brodsky *et al.*, 2003).

### 3. Reparación de DNA

- **La reparación por escisión de nucleótidos (NER) y otros mecanismos**

Además de los errores de secuencia generados por la DNA polimerasa durante la replicación, la integridad del DNA se encuentra constantemente amenazada por diversos agentes ambientales así como diversos agentes endógenos. Los factores ambientales generadores de daño al DNA pueden ser agentes químicos, así como ciertos tipos de radiación, tales como la luz UV y la radiación ionizante (RI). Por otra parte, los factores endógenos son algunos productos secundarios del metabolismo, especies reactivas de oxígeno, agentes alcalinizantes, estrés oxidativo entre otros (Peterson y Côte, 2004). Existen diversos tipos de daño dependiendo del tipo de agente genotóxico del que se trate, y por lo mismo, a lo largo de la evolución han surgido diversos mecanismos de reparación de DNA que contrarrestan de diversas maneras los efectos nocivos de estos agentes.

La enorme diversidad de mecanismos de reparación puede ser clasificada de manera muy general en tres tipos:

### 1. Reparación de bases mal apareadas

Este mecanismo de reparación consiste en un sistema multienzimático que reconoce bases erróneamente apareadas y las sustituye por la pareja correcta. Este problema surge generalmente de errores de replicación o recombinación.

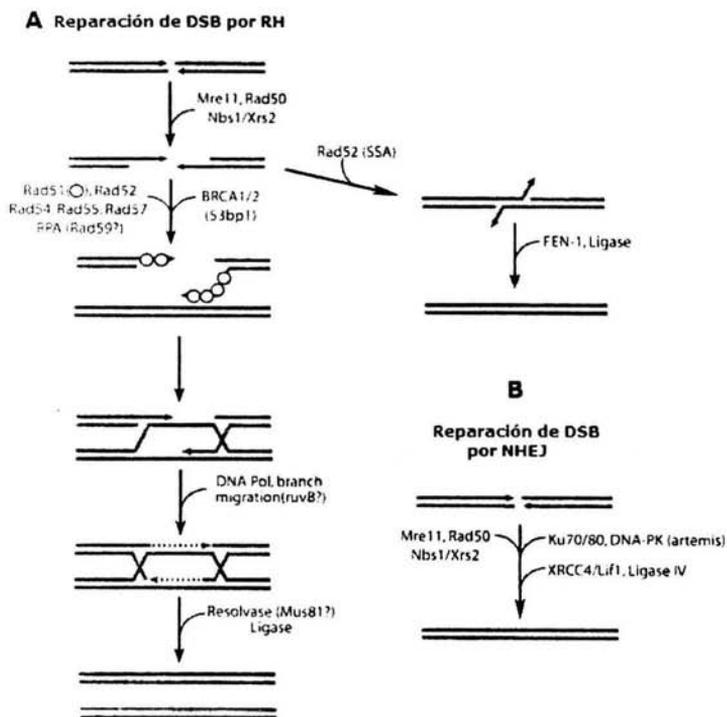
Este mecanismo involucra una serie de reacciones enzimáticas, estudiadas principalmente en *Escherichia coli*, que comienza con el reconocimiento del error, la utilización de la hebra parental como templado y la corrección del error sustituyendo el nucleótido incorrecto por el correcto (Darnell *et al.*, 2004).

### 2. Reparación por escisión de bases (BER por “Base excision repair” en inglés)

Este mecanismo se encarga de la identificación y escisión de bases aberrantes, que generalmente son consecuencia de la desaminación de bases normales (por ejemplo de C a U) o por la acción de agentes químicos que las modifican (Darnell *et al.*, 2004).

### 3. Reparación de rupturas de doble hebra (DSBs)

Este tipo de daño al DNA eucarionte es generado por la radiación ionizante y por diversos agentes químicos como algunas drogas anticancerígenas. Existen, dos mecanismos altamente conservados en eucariontes: la recombinación homóloga (RH) y la reparación por unión de extremos no-homólogos (NHEJ). La primera consiste en reparar las rupturas de doble hebra en un cromosoma, utilizando la información del cromosoma homólogo. Este mecanismo requiere de una serie de proteínas conservadas, presentes en distintas etapas del proceso. El segundo (NHEJ) consiste en la ligación de las dos moléculas de DNA libres generando nuevamente una molécula continua de DNA de doble hebra. Sin embargo, este mecanismo requiere de la pérdida de varias bases en el punto de unión de la hebra, hecho que podría causar nuevas mutaciones en el genoma (Darnell *et al.*, 2004 y Peterson y Côte, 2004)(Figura 13).



**Figura 13**

La reparación de rupturas de doble hebra (DSB) se da por medio de dos mecanismos. (A) La reparación por recombinación homóloga o RH y (B) la reparación por unión de extremos no-homólogos (NHEJ) (modificada de Peterson y Côte, 2004).

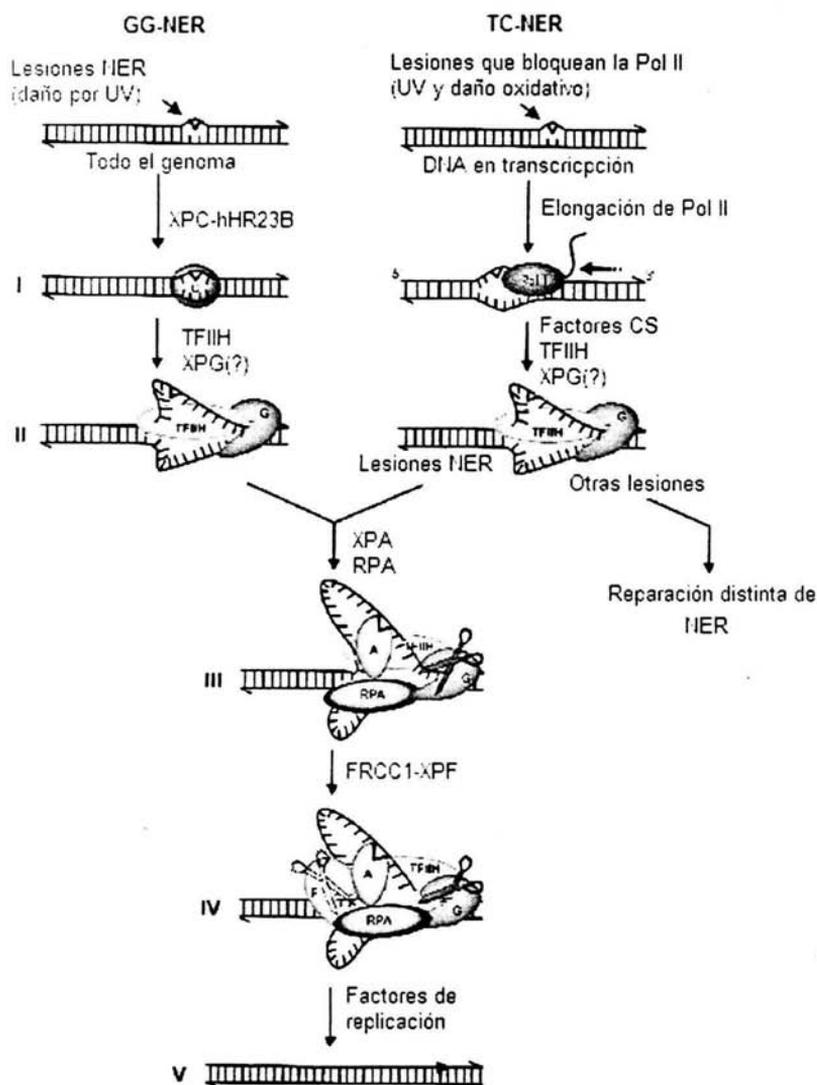
#### 4 . Reparación por escisión de nucleótidos (NER por "Nucleotide excision repair" en inglés)

Uno de los mecanismos de reparación mejor caracterizados es la reparación por escisión de nucleótidos o NER. La longitud de onda corta producida por la luz UV ocasiona daños en el DNA conocidos como dímeros de pirimidina (o CPDs) y fotoproductos 6-4 (6-4PPs). Estos dos tipos de daño son el principal blanco de la maquinaria de NER (de Laats *et al.*, 1999) y generan curvaturas anormales o desenrollamiento de la hebra de DNA, que son detectadas por la maquinaria de reparación (revisado Gontijo *et al.*, 2003). Debido al tema de esta tesis, el mecanismo de NER será explicado más en detalle a continuación.

En la última década se han sido caracterizado casi todos los componentes de la maquinaria NER en eucariontes, y su función ha sido reconstituida *in vitro*. En la naturaleza existen dos tipos de reparación por NER que se esquematizan en la figura 14. Una es la reparación global de genoma (GG-NER) que se encarga de encontrar y reparar lesiones a lo largo de todo el genoma, y la otra es la reparación acoplada a la transcripción (TC-NER), la cual consiste en la reparación de daños presentes en las hebras que se encuentran en el proceso de ser transcritas (de Laats *et al.*, 1999).

En la reparación global del genoma (GGR), el dímero XPC-hHR23B se encarga del reconocimiento del daño debido a la curvatura anormal del DNA. Durante la reparación acoplada a la transcripción (TCR) el daño es detectado por la RNA Pol II que es bloqueada por los CPDs. En el caso de la GGR, XPC-hHR23B tiene la función de reclutar a TFIIH (y posiblemente también a XPG) a la región del daño. En este punto, TFIIH, con sus dos helicasas XPD y XPB, abre la hebra de DNA a lo largo de 10 a 20 nucleótidos en la zona del daño. En TCR, los factores CSA, CSB, TFIIH y XPG (entre otros) desplazan a la RNA Pol II de la zona. Mas adelante, XPA se une a la hebra de nucleótidos dañados y RPA se une a la otra hebra, logrando así estabilizar el complejo abierto de reparación. XPG, acomodado por TFIIH y RPA, realiza la incisión del extremo 3' de la hebra dañada, mientras que ERCC1-XPF, acomodado por RPA Y XPA, realiza la incisión del extremo 5'. Después de la incisión se vuelve a sintetizar y ligar el DNA en la zona que queda vacía gracias a la maquinaria de replicación (de Laats *et al.*, 1999).

La mayoría de los estudios acerca de NER, han sido realizados en sistemas *in vitro* de DNA desnudo, y por lo tanto es importante el estudio de los mecanismos involucrados en este tipo de reparación en el contexto de la cromatina.



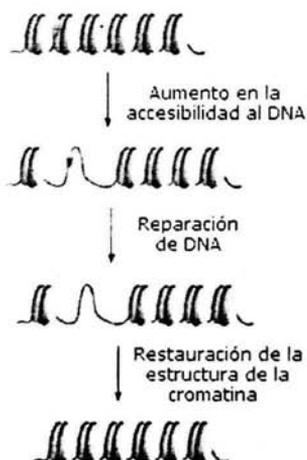
**Figura 14**

Modelo molecular de la reparación por NER. (I) Reconocimiento del daño por distintas moléculas. (II) reclutamiento de TFIIH por diversos factores permitiendo la apertura de la hebra en la zona del daño. (III) Estabilización del complejo abierto por medio de diversos factores. (IV) Incisión el extremo 3' y 5' de la hebra dañada. (V) Re- síntesis de DNA en la zona del daño y su posterior ligación (modificada de de Laet et al., 1999).

- **La remodelación de cromatina en la reparación del DNA**

Así como la remodelación de cromatina es necesaria para los procesos de replicación y transcripción de DNA, también es un proceso indispensable para permitir la entrada de la maquinaria de reparación una vez que ha ocurrido daño al DNA y para restaurar posteriormente la estructura de la cromatina.

Desde hace varias décadas, diversos estudios postularon que durante el proceso de NER, la cromatina sufre una serie de rearrreglos. A partir de esto, se ha postulado un modelo conocido como "acceder, reparar, restaurar" (ARR) que propone el mecanismo por medio del cual NER se desarrolla en el contexto de la cromatina (Revisado en Green y Almouzni, 2002). En el modelo ARR, la etapa inicial consiste en permitir el acceso de la maquinaria NER a la zona del daño, para posteriormente continuar con la reparación por NER y finalmente reestructurar la cromatina a su estado inicial (Revisado en Green y Almouzni, 2002). Este primer paso del modelo ARR, principalmente durante GGR, requiere de la acción de complejos remodeladores con ATPasa DNA dependientes y de enzimas modificadoras de histonas que permitan la relajación de la cromatina y por ende la entrada a la maquinaria de reparación (Figura 15).



**Figura 15**

Representación del modelo "Acceder, reparar, restaurar" (ARR) propuesto por Smerdon (1991) y Green y Almouzni (2002) (modificado de Peterson y Côte, 2004).

Este paso durante TCR está en parte resuelto, ya que las zonas en transcripción se encuentran accesibles para la entrada de la maquinaria basal de transcripción y muy posiblemente de la maquinaria de NER. Asimismo, se ha visto que las acetilasas CBP/p300 interactúan con una subunidad de DDB (proteína que forma parte de el reconocimiento del daño en NER en respuesta a daño por UV) (Revisado en Green y Almouzni, 2002). Green y Almouzni proponen que esta interacción física podría permitir el reclutamiento eficiente de la maquinaria NER a través de modificaciones localizadas en la zona del daño. Así como el caso anterior, se ha comprobado que diversos complejos remodeladores aumentan la accesibilidad de factores de reparación al DNA nucleosomal, ya sea por remodelar la cromatina en los sitios dañados o, de manera indirecta funcionando como remodeladores globales aumentando los sitios de accesibilidad a lo largo del genoma (revisado en Gontijo *et al.*, 2003). Un ejemplo de esto es la proteína HMGN1, la cual se une a los nucleosomas y desestabiliza la estructura de alta condensación de la cromatina. Por lo anterior, HMGN1 facilita el acceso a los sitios de DNA dañados por luz UV y aumenta la tasa de reparación de DNA en la cromatina (Birger *et al.*, 2003).

Además de la participación de complejos remodeladores durante reparación por NER, existen diversos eventos de modificación de histonas que han sido caracterizados durante la reparación de DSBs. Una variante de histonas conocida como H2AX es fosforilada de manera extensiva en respuesta al daño por RI. La fosforilación de H2AX de mamífero como de su homólogo H2Av en *Drosophila*, es un evento importante para la reparación de este tipo de daño (Madigan *et al.*, 2002 y revisado en Green y Almouzni, 2002). Como conclusión, el tipo de mecanismos remodeladores dependen del tipo de lesión y de la vía de reparación involucrada en cada caso.

Complejo Protéico y Organismo	Subunidades	Vía propuesta de reparación
<i>HATs</i> <b>Complejos GCN5</b> SAGA (levadura)	<u>GCN5</u> , ADA1, ADA2, ADA3, SPT3, SPT7, SPT8, SPT20, yTAF <sub>ii</sub> 17/20, yTAF <sub>ii</sub> 25, yTAF <sub>ii</sub> 60, yTAF <sub>ii</sub> 61/68, yTAF <sub>ii</sub> 90, Tra1.	NER.
ADA (levadura)	<u>GCN5</u> , ADA2, ADA3, Ahc1.	NER.
STAGA (humano)	<u>hGCN5-1</u> , TAF <sub>ii</sub> 15, TAF <sub>ii</sub> 20, TAF <sub>ii</sub> 30, TAF <sub>ii</sub> 31, STAF36, STAF42, hADA3, KIAA0764, PAF65β, PAF65α, SAPI30, TRRAP y UV-DDB.	NER. NER. NER.
TFTC (humano)	<u>GCN5</u> , TAF <sub>ii</sub> 20, TAF <sub>ii</sub> 32, TAF <sub>ii</sub> 80, TAF <sub>ii</sub> 100, TAF <sub>ii</sub> 135, TAF <sub>ii</sub> 150, SPT3, PAF65β, PAF6α, SAPI30, TRRAP.	Reparación DSB, señalización apoptótica.
<b>Complejos TIP60</b> TIP60 (humano)	<u>TIP60</u> , TRRAP, TIP49a/RUVBL1, TIP49b/RUVBL2, β-actina, BAF53 y al menos otros 9.	NHEJ y reparación DSB. NER y BER.
NuA4 (levadura)	<u>Esa1</u> , Yng2, Act3/Arp4, Tra1, Act1, Epi1, Eaf3 y otros.	NER y BER.
<b>Complejos que contienen p300</b>	<u>p300</u> en diversos complejos de activación transcripcional así como con FEN-1, UV-DDB, PCNA.	NER y BER.
<b>Complejos que contienen CBP</b>	<u>CBP</u> en diversos complejos de activación transcripcional así como DDB2 y TDG.	NER y BER.
<b>Complejo HAT1</b> (levadura)	<u>Hat1</u> , y Hat2.	HR.
<i>Remodeladores de cromatina dependientes de ATP</i> <b>Complejos ISWI</b> ACF (humano)	<u>Acf1</u> , hSNF2 (=Drosophila ISWI).	
CHRAC (humano)	<u>Acf1</u> , hSNF2, p16, p14.	NER y BER.
ISWI (levadura)	<u>Isw1</u> , loc2, loc3, loc4.	Fotoreactivación.
<b>Complejos SWI/SNF</b> SWI/SNF (humano)	<u>Brg1</u> , BAF170, 150, 60, 57, 53, Ini1. <u>hBRM</u> , BAF170, 150, 60, 57, 53, Ini1.	NER, recombinación V(D)J. Fotoreactivación.
SWI/SNF (levadura)	<u>Swi2/Snf2</u> , Swi1, Swi3p, Snf5p, Snf6p, Swp82p, Swp73p, Swp61p, Swp59p, Tfg3/Anc1p y Snf11p, Arp7, Arp9.	
RSC (levadura)	<u>Sth1</u> , Rcs1-15, Arp7, Arp9.	Desconocido.
Ino80 (levadura)	<u>Ino80</u> , Rvb1, Rvb2, Act1, β-actina, Arp4, Arp5, Arp7, Arp8, Arp9.	HR.
Rad54 (humano y levadura)	<u>Rad54</u> , Rad51.	
CSB (humano)	<u>CSB</u> .	HR.
Rad26 (levadura)	<u>Rad26</u> , Def1.	TCR.
Rad5 (levadura)	<u>Rad5</u> , Ube13, Mms2	Reparación postreplicativa.
<i>Chaperonas de histonas</i> CAF-1 (humano)	p150, p60, p48.	NER, reparación SSB.
CAC (levadura)	Cac1, Cac2, Msi1.	Reparación postreplicativa y otros.
RCAF (humano)	Asf1a o b.	NER.
ASF1 (levadura)	Asf1, Rad53.	NER, reparación DSB.

**Tabla 2**

**HATs, remodeladores con ATPasa dependientes de DNA y chaperonas de histonas involucradas en la reparación del DNA (tomada de Gontijo *et al.*, 2003).**

Diversas evidencias sugieren que la acetilación de histonas es una de las principales modificaciones involucradas en la relajación de la cromatina en respuesta a daño al DNA. Se propone que esta modificación aumenta la accesibilidad al DNA *in vivo* porque ocasiona la disrupción de la estructura altamente condensada de la fibra de cromatina (revisado en Gontijo *et al.*, 2003). Un ejemplo es el caso en donde más de 6 acetilaciones por octámero pueden desestructurar dramáticamente la cromatina (revisado en Peterson y Côte, 2004). Estudios del complejo TIP60 HAT en humanos (o NuA4 en levadura) indican un papel importante de la acetilación de la H4 durante la reparación de DSBs. Se sabe que la subunidad acetilasa de TIP60 es esencial para mantener la tasa de reparación óptima en células humanas, así como la correcta reparación de DSBs durante la replicación.

Asimismo, mutantes de lisinas de H3, así como de *HAT1* (subunidad del complejo HAT1 de levadura) tienen defectos en recombinación homóloga. Por otro lado, las mutaciones en las colas de H2A afectan la reparación de DSB y el silenciamiento en telómeros (revisado en Gontijo *et al.*, 2003).

Diversas evidencias sugieren que el aumento global en la acetilación de histonas es parte de la respuesta celular al daño a DNA por la irradiación de luz UV. En fibroblastos humanos, después de irradiar con UV, se da un aumento global en la acetilación de histonas que dura hasta 6 horas, seguido de una ola de hipoacetilación que dura varias horas más, en comparación a los fibroblastos sin irradiar (Ramanathan y Smerdon, 1986). En estudios previos con fibroblastos humanos y con células deficientes en la reparación de DNA<sup>1</sup>, se observó que después de un tratamiento con butirato de sodio, ambas líneas celulares presentaban un aumento en la tasa de reparación por NER, justo después de la irradiación con luz UV (Smerdon *et al.*, 1982). El butirato de sodio había sido caracterizado previamente como un inhibidor de la acción de desacetilasas de histonas (HDACs por "histones deacetilases" en inglés) (Revisado en Smerdon *et al.*, 1982). Recientemente, estudios acerca del papel de p53 en la reparación, demostraron el mismo aumento en la acetilación de residuos de histonas en respuesta a la irradiación con luz UV de manera dependiente de p53 (Allison y Milner, 2003).

La acetilación de histonas podría alterar el estado de compactación de la cromatina así como las propiedades de los nucleosomas facilitando así la entrada de factores de reparación

---

<sup>1</sup> Células fibroblásticas de pacientes con Xeroderma Pigmentosum (con mutaciones en XPC y XPD)

a los sitios del daño. Asimismo, la acetilación podría estar actuando como una marca para reclutar factores de remodelación de cromatina o las mismas proteínas de reparación (Gontijo *et al.*, 2003).

- **La importancia de p53 en la reparación del DNA**

Además de la función de p53 en la detención del ciclo celular y la activación de vías apoptóticas, se han encontrado evidencias de su papel en la vía de reparación de DNA en respuesta a la luz UV. p53 tiene un papel importante en GGR, así como la capacidad de regular la transcripción de genes involucrados en NER. Algunos de estos genes son *p48*, que codifica para una subunidad de DDB (proteína de unión a DNA dañado) (Revisado en Zhu *et al.*, 2000), y *Gadd45*, el cuál es importante para la remodelación de cromatina en las zonas de DNA dañadas (Smith *et al.*, 2000). Asimismo, la ausencia de p53 en líneas celulares en cultivo, causa una disminución dramática en la eficiencia de reparación por NER (Zhu *et al.*, 2000).

p53 puede interactuar física y funcionalmente con tres componentes de TFIIH (p62, XPD y XPB) (Fritt *et al.*, 1999). En estudios más recientes sobre el papel de p53 en el reclutamiento de factores NER, se mostró que p53 es importante para el reclutamiento de TFIIH y XPC a zonas del DNA dañadas por luz UV en fibroblastos humanos. En este mismo trabajo, se demostró que la función de p53 se requiere para la reparación eficiente de CPDs y no de 6-4PP (Wang *et al.*, 2003). En general la evidencia acumulada muestra que p53 es importante en la reparación del DNA, no sólo por inducir la transcripción de genes involucrados en reparación de DNA, sino también porque recluta y/o interacciona con diversos factores.

Recientemente, Rubi *et al.* (2003) mostraron evidencias de que p53 es importante para promover la accesibilidad a los sitios del daño mediante la relajación global de la cromatina en células humanas en cultivo (Rubbi y Milner, 2003). En este trabajo, comprueban que p53 se requiere para la relajación global de la cromatina inducida por UV, y que esta dependencia se vuelve dispensable al utilizar inhibidores de HDACs. De esta manera se restaura la eficiencia de NER en respuesta al daño. Posteriormente muestran que esta relajación se da a partir de la acetilación global de histonas y que además, p53 es capaz de reclutar a p300 a los sitios de NER.

A partir de todas estas evidencias, concluyen que p53 funciona como un "factor de accesibilidad a la cromatina" durante NER y que el inicio de GGR se da a partir de los

siguientes pasos: (1) detección de daño al DNA en zonas de transcripción activa, (2) relajación global de la cromatina mediada por p53 y (3) detección global de daño a lo largo del genoma (Rubbi y Milner, 2003).

Debido a que la relajación de cromatina, así como la activación transcripcional se asocian de manera directa a la acetilación de histonas, Allison *et al.* decidieron evaluar la relación de p53 con la acetilación de la H3 tanto en condiciones normales como al irradiar con luz UV. En este trabajo se analizó la presencia de la acetilación de la K9, K14 y K18 de la H3. Con base en sus resultados, pudieron concluir que la acetilación de K9, tanto en niveles constitutivos como al inducir daño con luz UV, son dependientes de p53. Por otra parte los niveles constitutivos de la acetilación de K14 son independientes de p53, pero al irradiar con UV, la ausencia de p53 provoca una cinética retardada en la acetilación de K14. Lo anterior implica que p53 facilita el aumento en la acetilación de K14 en respuesta a daño por UV. Finalmente observaron que la acetilación de la K18 era alta en cualquiera de las condiciones, por lo que ni p53 ni la irradiación con UV parecen ejercer un efecto en esta modificación (Allison y Milner, 2003).

## JUSTIFICACIÓN

Además de las múltiples funciones de p53, cada vez existen más evidencias de su importancia durante la reparación del DNA por daño causado por luz UV. Diversas evidencias ya mencionadas en la introducción, indican que p53 puede interactuar y reclutar subunidades del complejo de reparación por NER, así como inducir la activación transcripcional de genes involucrados en la reparación del DNA.

Por otra parte, se ha propuesto que p53 puede funcionar como un "factor de accesibilidad a la cromatina" (Rubbi y Milner, 2003) por su capacidad de reclutar HATs a los sitios de reparación y por ende propiciar la acetilación de histonas en los sitios del daño. Lo anterior se refleja en los cambios en la acetilación de histonas inducidos por irradiación con luz UV en líneas celulares nulas para p53. En este trabajo concluyen que la función de p53 es específica del residuo acetilado, ya que los resultados de la acetilación de K9, K14 y K18 de la H3 son diferenciales (Rubbi y Milner, 2003).

Paralelo a las evidencias anteriores, en estudios acerca del mecanismo de activación transcripcional de p21 por p53, se obtuvieron evidencias de la importancia de p53 en el proceso de acetilación de histonas. La acetilación de p53 no es indispensable para la unión de esta proteína al DNA, sin embargo es esencial para el reclutamiento de HATs a los sitios del DNA en donde está unido p53. En ausencia de la acetilación de p53, tanto CBP/p300 como PCAF/hGcn5 no son reclutados al promotor de p21 (Barlev *et al.*, 2001). Con base en esto, se propone que en la célula existen una cascada de acetilaciones, en donde la acetilación de p53 conlleva a la acetilación de histonas por medio del reclutamiento de HATs a sitios específicos del genoma (Barlev *et al.*, 2001).

Con base en todo lo anterior, en este proyecto se analizaron algunos patrones de acetilación de la histona H3 en *Drosophila*, comparando el patrón silvestre con los patrones de una línea nula para p53, al inducir daño al DNA con luz UV.

*Drosophila melanogaster* es un modelo de estudio ideal para estudiar la función de proteínas a partir de la obtención de líneas mutantes. Esto se debe a que la genética de *Drosophila*, a diferencia del modelo mamífero, permite generar y rastrear mutaciones de manera fácil, así como mantenerlas estables a lo largo de muchas generaciones.

El genoma completo de *Drosophila* está totalmente secuenciado, y se tiene mucha información acerca de la posición de los genes a lo largo de los 4 cromosomas que la mosca

posee. La gran ventaja es que muchos genes importantes en el desarrollo y en la regulación génica en mamífero se encuentran muy conservados en *D. melanogaster*. Lo anterior permite estudiar muchos procesos biológicos importantes en mamífero pero en un modelo mucho más simple.

En este proyecto fue posible trabajar con una línea nula para *Dmp53* generada por recombinación homóloga (Sogame *et al.*, 2003), para evaluar los cambios en la acetilación de histonas en ausencia de *Dmp53*. El alto grado de similitud entre *Dmp53* y *p53* (en mamífero) permitió evaluar estos cambios en un modelo sencillo y plantear preguntas a partir de las evidencias previas en otros modelos (Allison y Milner, 2003 y Rubbi y Milner, 2003).

Los cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* están presentes en las células de las glándulas salivales de la larva de tercer estadio. Estos son cromosomas en interfase en donde el DNA se encuentra amplificado, es decir que el DNA se replica repetidas veces sin que el cromosoma nuevo se separe. Esto lleva a la generación de cromosomas gigantes compuestos de miles de copias del genoma acomodadas de manera paralela, y por ende, son fácilmente observables al microscopio (Alberts *et al.*, 2004).

Los cromosomas politénicos de presentan un patrón específico de bandeo que ha funcionado como una excelente herramienta para mapear genes, así como para localizar zonas de eucromatina o heterocromatina. Asimismo son un modelo fácil de utilizar y analizar, ya que es posible observar los patrones de distribución de una proteína, por ejemplo un factor transcripcional o cualquier proteína que se una directamente a la cromatina. Para fines de este trabajo, son un modelo excelente, ya que nos permite analizar el patrón de distribución de histonas acetiladas en distintas condiciones y de una manera cuantitativa.

Las evidencias en las que se basa este trabajo fueron obtenidas de líneas celulares tumorales en cultivo. Por lo anterior este análisis se realizó en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*, ya que constituyen un modelo ideal para estudiar la función *in vivo* de *Dmp53* en el contexto de la cromatina.

## HIPÓTESIS

Si p53 funciona como un factor de accesibilidad a la cromatina en respuesta a daño al DNA por luz UV, entonces al inducir daño al DNA, la mutante nula en *Dmp53* sufrirá una disminución en la acetilación de la histona H3 con respecto a la mosca silvestre.

## OBJETIVOS

Para evaluar la hipótesis planteada en este proyecto se formularon los siguientes objetivos:

- Determinar el patrón de acetilación global, así como el de la K9 y K14 de la histona H3 en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*.
- Evaluar si existen cambios en estos patrones al inducir daño al DNA mediante la irradiación con luz UV
- Determinar si en ausencia de p53, existen cambios en los patrones de acetilación de H3 con respecto a los patrones obtenidos en la silvestre.
- Determinar si en respuesta a daño al DNA por luz UV, estos patrones cambian en la mosca mutante en *p53*

# METODOLOGÍA

## A. Cuidado de las líneas de moscas utilizadas

La línea mutante nula para *Dmp53* fue donada por John M. Abrams (Sogame *et al.*, 2003). Esta es una línea homocigota nula para el gen *Dmp53* (*Dmp53<sup>-/-</sup>*) que fue generada por recombinación homóloga. La línea silvestre parental de esta mutante es *yw*. La vía metabólica en la que actúan los genes *Yellow* y *White* es independiente de cualquier evento de reparación del DNA y debiera comportarse como cualquier otra línea silvestre, tanto genética como bioquímicamente. Por lo anterior se decidió utilizar la línea Oregon R (OreR) como la línea silvestre, bajo el supuesto de que la diferencia en el fondo genético no interfiere de manera radical en los patrones epigenéticos que se analizan en este trabajo. Sin embargo los resultados de este trabajo deben analizarse tomando en cuenta que la línea silvestre OreR no es la línea parental de la mutante *Dmp53<sup>-/-</sup>*.

Los stocks de ambas líneas se mantuvieron a 19°C para que las larvas crecieran lentamente, ya que eso disminuye la tasa metabólica y por ende es posible obtener cromosomas politénicos más anchos. La comida utilizada para las moscas se conoce como super comida ya que tiene un alto contenido calórico:

### Super Comida

- 10g Agar
- 20g Extracto de levadura
- 80g Levadura entera
- 20g Peptona
- 30g Sacarosa
- 60g Glucosa
- 0.5g MgSO<sub>4</sub> x 6H<sub>2</sub>O
- 0.5g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 6ml Ácido propiónico
- 10ml Nipagine
- Agua destilada para aforar a 1 Litro.

Modo de preparación:

Se agrega el agar, extracto de levadura, levadura entera, peptona, sacarosa, glucosa,  $MgSO_4 \times 6H_2O$  y  $CaCl_2 \times 2H_2O$  a un litro de agua destilada en un matraz. Se agita hasta que todos los compuestos estén totalmente disueltos. Es importante que la levadura esté totalmente disuelta. Se autoclavea la solución durante 30 minutos a  $120^\circ C$ . Se deja enfriar a temperatura ambiente y se agrega el Nipagine y el ácido propiónico. Después de agitar se sirve la solución en viales de plástico estériles. Una vez solidificada, la super comida está lista para ser utilizada. Si la comida no se utiliza pronto se guarda a  $4^\circ C$ .

## **B. Anticuerpos utilizados**

Los tres anticuerpos primarios utilizados provienen de la compañía Upstate Biotechnology. Todos estos anticuerpos fueron generados en conejos a partir de péptidos sintetizados de secuencias conservadas de las colas N-terminales de las histonas, por lo que funcionan para cualquier eucarionte.

- Anticuerpo anti-acetilación de la histona H3: reconoce la acetilación de la K9 y de la K14 de manera simultánea.
- Anticuerpo anti-acetilación de la histona H3(K9): reconoce de manera específica la acetilación de la K9 de la H3.
- Anticuerpo anti-acetilación de la histona H3(K14): reconoce de manera específica la acetilación de la K14 de la H3.

El anticuerpo secundario utilizado fue Cy3 anti-conejo SigmaAldrich. Este anticuerpo secundario reconoce las IgGs de conejo presentes en el anticuerpo primario y a su vez está unido a un fluoróforo llamado cianina. La cianina es excitada a una longitud de onda de 550nm y tiene un pico de emisión de 570nm. En el microscopio confocal es posible excitar a este fluoróforo con un laser que tiene una longitud de onda de 550nm. De esta manera, los sitios en donde se encuentra el anticuerpo primario unido al secundario fluorescen con una longitud de onda de 570 nm en cada preparación analizada.

### C. Tratamientos analizados

Las cuatro condiciones que se presentan a continuación fueron analizadas con los tres anticuerpos ya mencionados.

- Moscas OreR sin irradiar
- Moscas OreR irradiadas a  $150\text{J/m}^2$  y  $200\text{J/m}^2$ . Este último sólo con el anticuerpo global de acetilación de la H3
- Moscas *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar
- Moscas *Dmp53*<sup>-/-</sup> irradiadas a  $150\text{J/m}^2$

El tratamiento de las moscas irradiadas con UV fue el siguiente:

1. Colectar aproximadamente 10 larvas de tercer estadio en una mitad de caja de Petri, sobre un papel filtro húmedo.
2. Irradiar con un Stratalinker (stratagene) a  $150\text{J/m}^2$  o  $200\text{J/m}^2$  según el caso.
3. Después de 30 minutos de recuperación a temperatura ambiente se disectan las larvas.
4. Empezar a disectar para la preparación de cromosomas politénicos y la inmunotinción. Mientras se realiza el squash de una larva, mantener sobre hielo al resto de las larvas en la caja Petri para detener el metabolismo.

### D. Obtención e Inmunotinción de cromosomas politénicos

Los métodos utilizados se obtuvieron del libro de protocolos "*Drosophila Protocols*" (Ashburner *et al.*).

- **Preparación de squashes**

1. Cubrir los portaobjetos con Poli-L-lisina (SIGMA #P8920, 0.1% w/v en agua). Sumergir los portaobjetos en la solución, sacar y dejar secar (alrededor de 30 min.). Guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .
2. Siliconizar cubreobjetos con Sigmacote (SIGMA). Sumergir los cubreobjetos en la solución, sacar y dejar secar.

3. Se prepara PBS pH 7.4 que será utilizados posteriormente para diversos pasos

#### PBS

8g NaCl

0.2g KCl

1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Se pesan todos los reactivos en la balanza, se agregan a una probeta de un litro junto con 800ml de agua destilada. Se disuelve perfectamente y se ajusta el pH a 7.4 con HCl concentrado. Una vez ajustado se afora a un litro, se agita y se autoclavea. Una vez estéril se deja enfriar y se guarda a temperatura ambiente.

4. Se prepara la solución 1 a partir de la cual se preparan las soluciones 2 y 3.

#### Solución 1 (Formaldehído al 37%)

Se agregan 0.95g de paraformaldehído en un tubo falcon y se disuelven en 2.5 ml de agua y 50  $\mu$ l de KOH 1 N. Se Caleñita la solución en el microondas durante 10 segundos varias veces hasta que se disuelva completamente, evitando su ebullición. Esta solución es estable por un día a temperatura ambiente.

5. Se prepara la Solución 2:

Se agrega 3.7% de formaldehído junto con 1% triton X-100 en PBS (pH 7.3).

6. Preparar la Solución 3:

Se agrega 3.7% formaldehído junto con 50% de ácido acético (volumen final) en agua destilada.

Nota: Las soluciones 2 y 3 son estables durante dos horas a temperatura ambiente.

7. Preparar un cubreobjetos con una gota de **sol 2** y otro con una gota de **sol 3**. El cubreobjetos con la gota de **sol 3** debe estar siliconizado y con aproximadamente 20 $\mu$ l de la **sol 3**.

8. Disectar la larva de tercer estadio en una solución de NaCl 0.7% en un microscopio de disección.
9. Extraer el par de glándulas salivales y quitar con las pinzas de disección la mayor cantidad de cuerpo graso posible.
10. Sumergir las glándulas en la gota de **Sol 2** por 10 segundos (más tiempo hace que los cromosomas sean más difíciles de manipular en el squash).
11. Sacar las glándulas de la **Sol 2** y pasarlas a la **Sol 3** de 2 a 5 minutos.
12. Hacer el squash colocando el cubreobjetos sobre un portaobjetos tratado y deslizar el cubreobjetos de un lado a otro unas 20 veces. Hacer presión sobre la muestra ligeramente con un papel filtro.
13. Observar los cromosomas al microscopio en contraste de fases.
14. Sumergir la preparación en nitrógeno líquido. Separar el cubreobjetos del portaobjetos con una navaja y sumergir la preparación en PBS.

Nota: Las preparaciones pueden guardarse una noche a 4°C en PBS o hasta 4 semanas en metanol a 4°C.

- **Inmunotinción**

1. Agregar el anticuerpo primario apropiadamente diluido en 0.1%NP40, 1% - 1.5% de leche descremada (la concentración puede aumentar para disminuir el fondo) en PBS. Cada anticuerpo primario se utilizó según la concentración recomendada por la compañía de donde se obtuvieron:
  - Ac.K9 y K14 de H3 1:200
  - Ac.K9 de H3 1:100
  - Ac.K14 de H3 1:100

2. Agregar 50µl por preparación. Cubrir con un cubreobjetos no tratado de 22x40mm. Marcar la preparación correctamente.
3. Dejar incubar por una noche a 4°C en una cámara húmeda
4. Lavar 3 veces, cada una durante 10 minutos, en PBS-0.1%NP40
5. Agregar el anticuerpo secundario (Cy3 anti-conejo 1:200) en PBS-0.1%NP40-1% leche descremada. Agregar entre 50µl y 100µl por preparación y cubrir con un cubreobjetos de 22x50mm.
6. Incubar una hora a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C).
7. Lavar 3 veces, cada una durante 10 minutos, en PBS-0.1%NP40.
8. Enjuagar con PBS
9. Agregar una gota de citi-fluor (TED PELLA #19470) y colocar un cubreobjetos limpio sobre la preparación. Sellar las orillas de la preparación con barniz de uñas, dejar secar.
10. Observar con microscopía de fluorescencia o confocal o guardar en oscuridad a 4°C durante máximo tres semanas.

#### **E. Microscopía confocal**

Todas las preparaciones se analizaron utilizando el programa "photon counting" en un microscopio confocal Bio-Rad (Bio-Rad MRC-600). En este programa, por cada fotón que entra al detector de luz se produce un pulso y es posible detectar hasta 10 fotones por píxel. Lo anterior nos permite obtener imágenes de muy buena calidad de muestras que tienen una señal de baja intensidad, tal como ocurre en este protocolo.

## F. Análisis de los datos

Se cuantificó la intensidad de los píxeles en cada foto tomada, con base en metodologías previas (Reynaud *et al.*, 1999). Para esto se utilizó una computadora Macintosh y se utilizó la herramienta "Profile Plot Tool" del programa NIH image (desarrollado en el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y disponible en internet en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Esta herramienta permite trazar una línea a lo largo de cada cromosoma bien extendido, que va cuantificando la intensidad de los píxeles por los que la línea va pasando. La intensidad de los píxeles se mide por unidades adimensionales arbitrarias de intensidad que van de 0 a 255 dependiendo del número de fotones que inciden en cada píxel. 0 significa que en ese píxel no incidió ningún fotón, y 255 es entonces, el máximo valor de intensidad de un píxel, y representa la mayor acumulación de la proteína (en este caso las acetilaciones de histonas) unida al anticuerpo secundario. Es decir, que a mayor intensidad de píxel, mayor acetilación de histonas presente en una zona del cromosoma.

Al trazar las líneas a lo largo de los cuatro cromosomas politénicos de *Drosophila*, se pudo medir alrededor de 900 a 1,000 píxeles. Debido a las dificultades técnicas para obtener los cuatro cromosomas extendidos en una preparación, se decidió analizar 2/3 del genoma escogido de manera aleatoria. Es decir, se obtuvieron 604 píxeles por célula analizada independientemente de qué brazos de diferentes cromosomas estuvieran extendidos en cada caso. Esto permitió hacer un análisis global y obtener una muestra representativa de cada genoma.

Una vez obtenido un número significativo de datos por cada condición (alrededor de 20 genomas por condición) se calculó la frecuencia de cada píxel (0-255) en cada genoma. Posteriormente se calculó un promedio de cada una de las frecuencias en cada condición, obteniendo una tabla final por cada tratamiento. Los valores de esta tabla fueron graficados en un histograma representando el valor de cada píxel en función del promedio de sus frecuencias.

## G. Tratamiento estadístico

Después de graficar los promedios de las frecuencias de píxeles en las distintas condiciones con los tres anticuerpos utilizados, se llevó a cabo un análisis estadístico bajo la asesoría del Dr. Ignacio Méndez del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS) de la UNAM. Para determinar si las diferencias en las distribuciones eran significativas al comparar los diferentes tratamientos, se realizó un análisis de  $\chi$  cuadrada ( $\chi^2$ ) en el programa computacional "Excell". De esta prueba se obtienen valores de  $\chi^2$  a partir de los cuáles se obtiene un valor de P (probabilidad), que indica si existen o no diferencias significativas entre dos tratamientos, en este caso, entre dos distribuciones comparadas.

Las hipótesis evaluadas son:

$H_0$ : Las dos muestras provienen de la misma población

$H_A$ : las dos muestras provienen de poblaciones diferentes.

Para rechazar la  $H_0$ , el valor de P debe ser menor a 0.05 ( $P < 0.05$ ). Esto implica que existe un 5% o menos de probabilidad de que la diferencia entre las poblaciones haya sido al azar, por lo que se rechaza la hipótesis nula (Zar, 1984).

En el caso de nuestros datos, si  $P < 0.05$  entonces existe una diferencia significativa entre las distribuciones. Si  $P > 0.05$  entonces no hay diferencias significativas entre las distribuciones. Por otra parte, mientras más bajo es el valor de P, mayor diferencia existe entre una distribución y otra.

## RESULTADOS

En este trabajo se pretende determinar los cambios en la acetilación de la H3 en los residuos K9 y K14 en respuesta a daño al DNA por luz UV. Por otra parte se pretenden evaluar estos cambios en una línea mutante nula para el gen *Dmp53*.

Los resultados de esta tesis fueron obtenidos a partir de dos líneas de *Drosophila melanogaster*. Una línea silvestre (OreR) y una línea homocigota para la mutación nula en *Dmp53* (Sogame *et al.*, 2003), es decir que carece de la proteína Dmp53 y en este trabajo se expresará como *Dmp53<sup>-/-</sup>*.

Se prepararon cromosomas politénicos de larvas de tercer estadio de estas dos líneas, irradiando o sin irradiar con UV, como se explica detalladamente en la metodología. Se llevó a cabo la inmunotinción de los cromosomas utilizando diversos anticuerpos y posteriormente fueron analizados por microscopía confocal.

Después de analizar cada una de las fotos obtenidas de cada condición, se seleccionaron aquellas de mejor calidad para ser analizadas. En la tabla 3 se muestran los números totales de genomas analizados en cada condición que fueron seleccionados.

**Tabla 3**

Anticuerpo	Número de genomas analizados		
	Ac.H3 K9 y K14	Ac. H3K9	Ac. H3K14
Wt	25	24	22
Wt UV 150	22	22	22
Wt UV 200	19	-	-
<i>Dmp53<sup>-/-</sup></i>	22	26	23
<i>Dmp53<sup>-/-</sup></i> UV 150	22	22	23

El análisis de cada genoma fue realizado a partir del trazo de líneas rectas a lo largo de cada cromosoma. Cada línea trazada iba registrando la intensidad de cada uno de los pixeles presentes a lo largo del cromosoma. Los pixeles registrados pueden tener un valor de 0 a 255 (para mayor detalle ver Metodología) y su valor es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido al cromosoma, es decir, que a mayor intensidad de píxel, hay mayor acetilación en cada zona del cromosoma.

La manera más directa de representar el patrón de acetilación fue por medio de agrupar los datos de cada condición y calcular el promedio de las frecuencias de cada píxel, es decir,

cuantas veces se repite cada valor a lo largo de cada cromosoma. Con base en lo anterior fue posible analizar el patrón de acetilación de cada genoma a partir de la intensidad de los pixeles presentes en cada cromosoma. La figura 16 es un esquema que representa la secuencia de eventos realizados a lo largo de este trabajo.

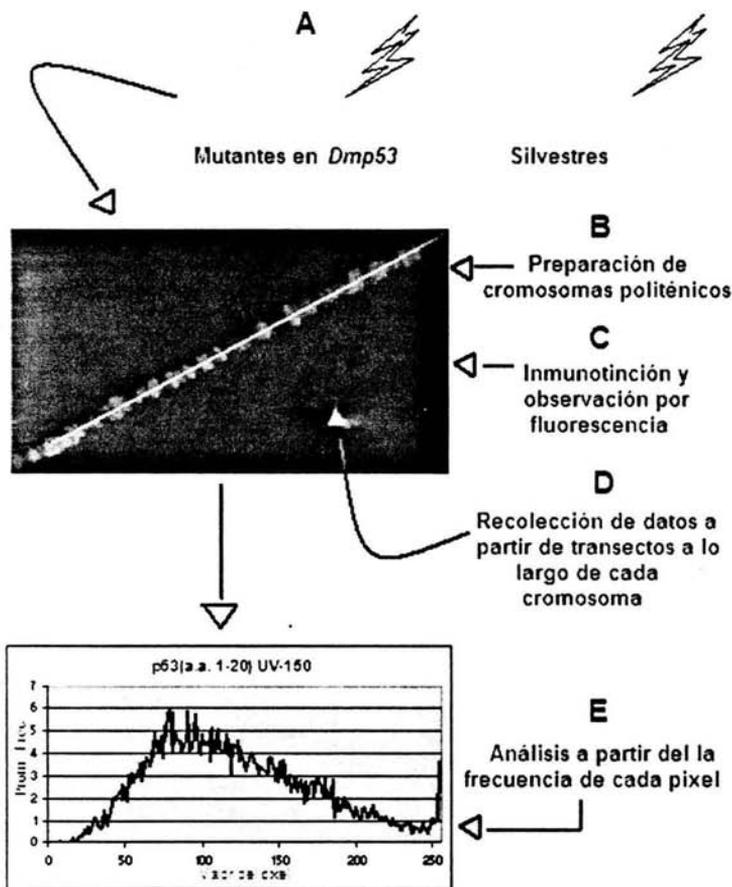


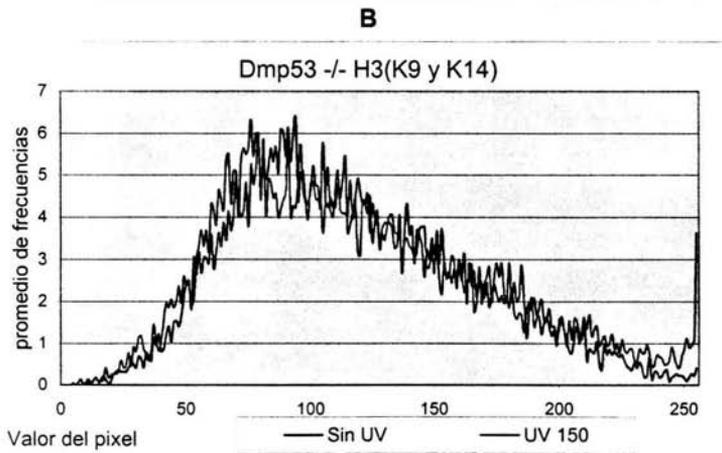
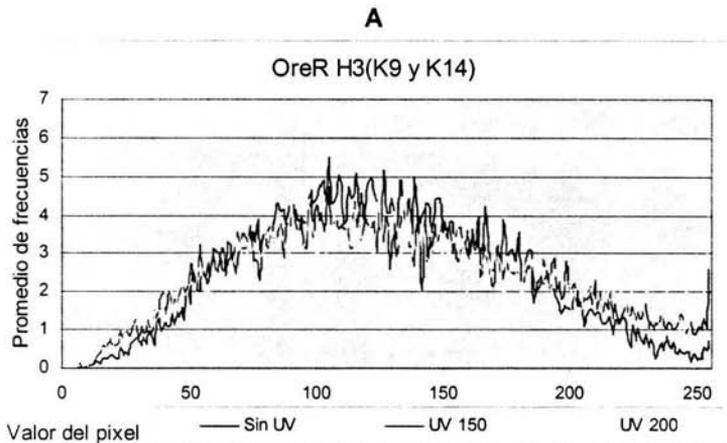
Figura 16

Esquema que muestra la estrategia realizada en la metodología de este proyecto. (A) Se analizaron cuatro tipos de muestra; larvas del tercer estadio silvestres sin irradiar, irradiadas a  $150\text{J/m}^2$  (dosis letal media) o a  $200\text{J/m}^2$ , así como larvas de tercer estadio de la línea *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar, e irradiadas a  $150\text{J/m}^2$ . (B) Preparación de cromosomas politénicos de las cuatro condiciones mencionadas en A. (C) Tratamiento de inmunotinción de los cromosomas con tres tipos distintos de anticuerpos y observación de los cromosomas por microscopía confocal de fluorescencia. (D) Recolección de datos a partir del trazo de transectos a lo largo de los cromosomas y la acumulación de tablas de datos de los valores de los pixeles. (E) Cálculo del promedio de las frecuencias de cada pixel para cada condición.

## Patrón de acetilación de K9 y K14 de la histona H3 en cromosomas politénicos

Los resultados que a continuación se presentan, fueron obtenidos a partir del anticuerpo que reconoce la acetilación de las lisinas 9 y 14 del extremo N-terminal de la H3. Inicialmente se analizó el patrón global de acetilación de la H3 en las moscas silvestres (OreR) y se observó si este patrón cambiaba al irradiar con luz UV a distintas intensidades.

La figura 17A muestra la distribución de la acetilación global de la H3 en la mosca OreR en tres condiciones distintas; sin irradiar, irradiadas a  $150 \text{ J/m}^2$  (dosis letal media) e irradiadas a  $200 \text{ J/m}^2$ .



C

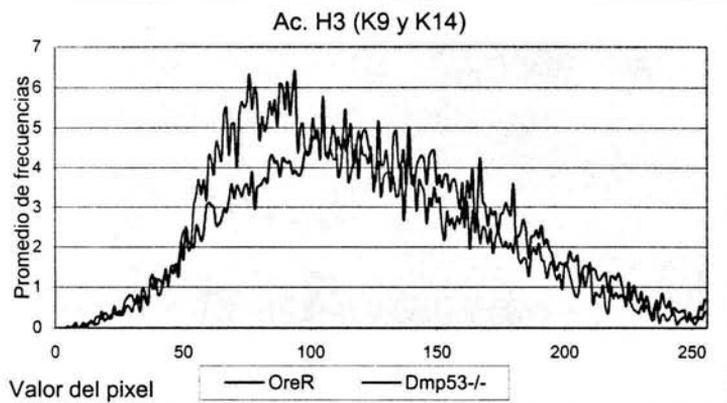


Figura 17

Distribución de la acetilación de la H3 K9 y K14. Se graficó el promedio de las frecuencias de cada píxel (0-255) en distintas condiciones. (A) Patrón de la mosca OreR sin irradiar (azul), irradiada a 150 J/m<sup>2</sup> (rojo) e irradiada a 200J/m<sup>2</sup> (amarillo). (B) Patrón de la mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar (azul) e irradiada a 150 J/m<sup>2</sup> (rojo). (C) Comparación del patrón de la mosca OreR (azul) con la mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> (rojo).

Se puede observar que la distribución de la acetilación K9 y K14 en esta histona sigue un comportamiento Gaussiano en donde la mayor parte de los datos se distribuyen hacia el valor central de la curva. Se puede observar que las distribuciones de las moscas irradiadas a 150 J/m<sup>2</sup> y a 200J/m<sup>2</sup> también presentan un comportamiento Gaussiano, sin embargo se observa un aumento en las frecuencias de los píxeles de más valor (entre 200 y 255) en comparación con la distribución de OreR sin irradiar. Este aumento en la frecuencia de los píxeles más altos genera un pico muy claro en la gráfica, el cuál indica un aumento significativo en la acetilación de la H3 al irradiar con luz UV. También se puede observar que a mayor dosis de luz UV, mayor es el pico de acetilación.

Este resultado corrobora estudios anteriores en donde se reporta un aumento en la acetilación de histonas en respuesta a daño al DNA por luz UV en modelos distintos a *Drosophila melanogaster* (Ramanathan y Smerdon, 1986 y Allison y Milner, 2003).

Posteriormente se analizó el patrón de acetilación de la K9 y K14 en cromosomas politénicos de la mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup>, sin irradiar e irradiadas a 150 J/m<sup>2</sup> (Figura 17B). A partir de este punto se decidió irradiar sólo a la dosis letal media, ya que pudimos ver anteriormente

que  $150 \text{ J/m}^2$  es suficiente para activar una respuesta al daño al DNA que se refleja en la acetilación de la H3.

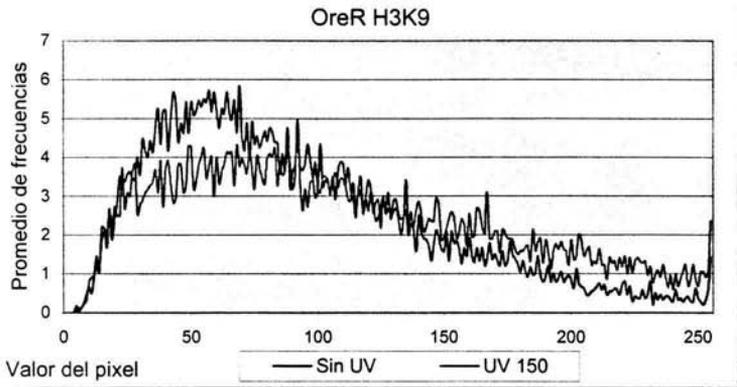
El patrón de acetilación de la K9 y K14 en la H3 en la mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> se muestra en la figura 17B. En éste se encontró que al irradiar con luz UV, los datos se distribuyen de la misma manera que en la mutante sin irradiar, pero se observa un pico en la frecuencia de pixeles de mayor valor, específicamente en el 255. Esto indica que existe un aumento en la acetilación en respuesta a la irradiación con UV, al igual que en los cromosomas politénicos de OreR.

Sin embargo, como se muestra de manera más clara en la figura 17C, la distribución basal de los datos de *Dmp53*<sup>-/-</sup> es significativamente diferente de la distribución de OreR (Ver Anexo1). En la gráfica se observa una diferencia significativa en la distribución de los datos, en donde el patrón de acetilación de *Dmp53*<sup>-/-</sup> no sigue una distribución Gaussiana sino una curva asimétrica que tiene mayor peso en valores menores al valor central de la distribución silvestre. Esto indica que la acetilación de la H3 en la mutante en *Dmp53* disminuye de manera significativa. Lo anterior sugiere que *Dmp53*, directa o indirectamente, tiene un papel importante en el establecimiento y/o mantenimiento del patrón de acetilación de la H3 ya que en su ausencia la acetilación de la K9 y K14 de la H3 disminuye.

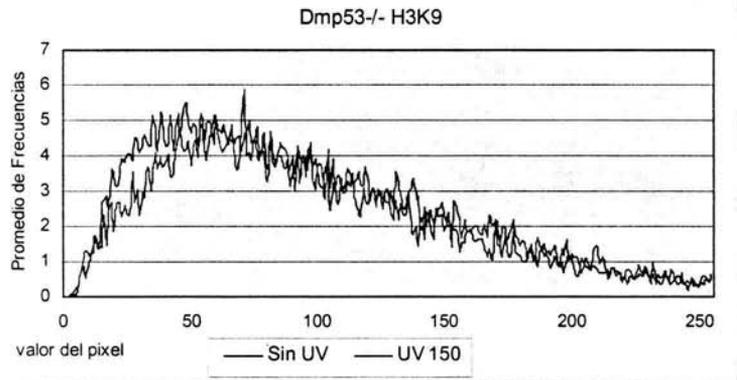
### **Patrón de acetilación de K9 de la histona H3 en cromosomas politénicos**

Debido a que el anticuerpo utilizado en el análisis anterior reconoce de manera simultánea 2 lisinas acetiladas en la cola N-terminal de la H3, era importante determinar si la disminución en la acetilación en la mutante *Dmp53*<sup>-/-</sup> se debía al cambio en la acetilación de alguna de las dos lisinas. Para resolver esta pregunta se analizó el patrón de acetilación de la K9, ya que en estudios previos con células humanas se observó una disminución en la acetilación de este residuo en una línea celular humana deficiente en p53 (Allison y Milner, 2003). Para esto se utilizó un anticuerpo que reconoce de manera específica la acetilación de la lisina 9 de la H3 y se llevó a cabo el mismo tipo de análisis que con el anticuerpo anterior.

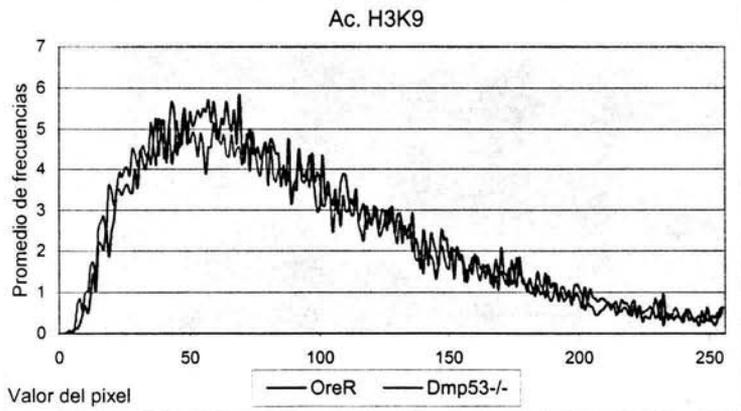
**A**



**B**



**C**



### Figura 18

Distribución de la acetilación de la K9 de la H3. Se graficó el promedio de las frecuencias de cada píxel (0-255) en distintas condiciones (A) Patrón de acetilación de la mosca *OreR* sin irradiar (azul) e irradiadas a  $150 \text{ J/m}^2$  (rojo). (B) Patrón de acetilación de la mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar (azul) e irradiadas a  $150 \text{ J/m}^2$  (rojo). (C) comparación del Patrón de acetilación de *OreR* (azul) con *Dmp53*<sup>-/-</sup> (rojo).

Como se observa en la figura 18A, el patrón basal de la acetilación en la K9 sufre un cambio significativo al irradiar con luz UV a la dosis letal media ( $150 \text{ J/m}^2$ ), es decir, existe un cambio significativo en la distribución de las frecuencias de píxeles. Se puede notar que al irradiar con UV, el valor máximo de frecuencias (o media) disminuye de valor, mientras que aumenta la frecuencia de los píxeles de mayor valor. Esto significa que la acetilación de la K9 aumenta significativamente en respuesta a la irradiación por luz UV en la mosca silvestre.

Por otro lado, al analizar el comportamiento de *Dmp53*<sup>-/-</sup> se puede observar que no hay un cambio significativo al irradiar con luz UV a la misma dosis (Figura 18B). Esto significa que en ausencia de *Dmp53*, no hay un aumento en la acetilación de la K9 en respuesta a la irradiación por UV.

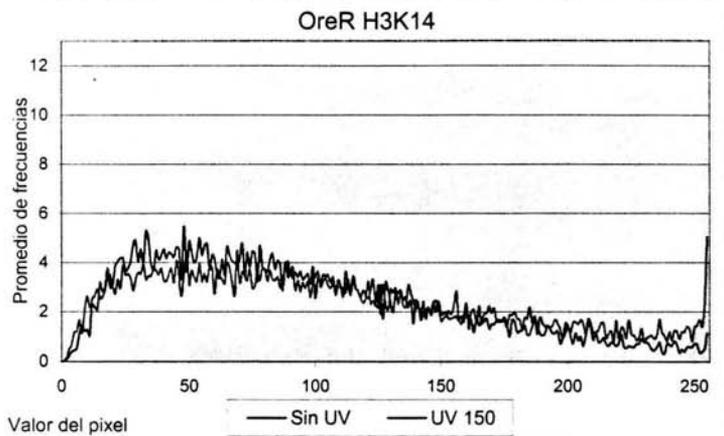
Al comparar el patrón de *OreR* con *Dmp53*<sup>-/-</sup>, como se muestra en la Figura 18C, se puede observar que las distribuciones son extremadamente parecidas y que por lo tanto no hay cambios importantes ni significativos en el patrón de la acetilación de la K9 en la mosca mutante. Al analizar los datos anteriores se puede observar que *Dmp53* no es indispensable para determinar el patrón constitutivo de acetilación en este residuo, ya que la distribución silvestre y la mutante son extremadamente parecidas. Sin embargo, *Dmp53* es importante para causar un aumento en la acetilación de la K9 de la H3 como respuesta a la irradiación por luz UV, ya que en *Dmp53*<sup>-/-</sup> no se presenta un cambio en la acetilación como se observa en *OreR*.

### Patrón de acetilación de la K14 de la histona H3 en cromosomas politénicos

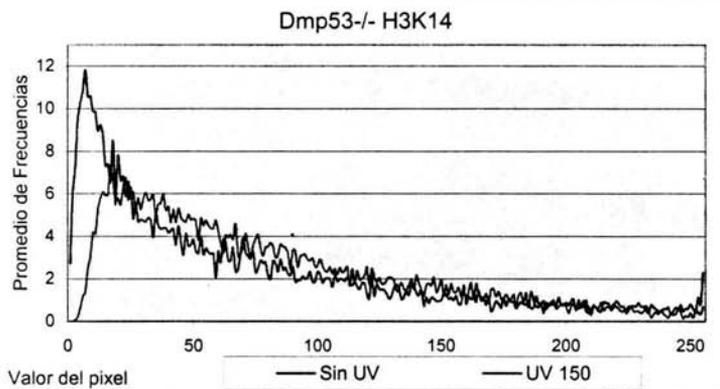
En los resultados anteriores (figura 18) no se observó una disminución en el patrón constitutivo de acetilación de la K9 en *Dmp53*<sup>-/-</sup>. A partir de esto se analizó entonces la acetilación de la K14 con un anticuerpo específico para ésta.

Estos experimentos se analizaron en las condiciones ya establecidas y los datos se muestran en la figura 19A.

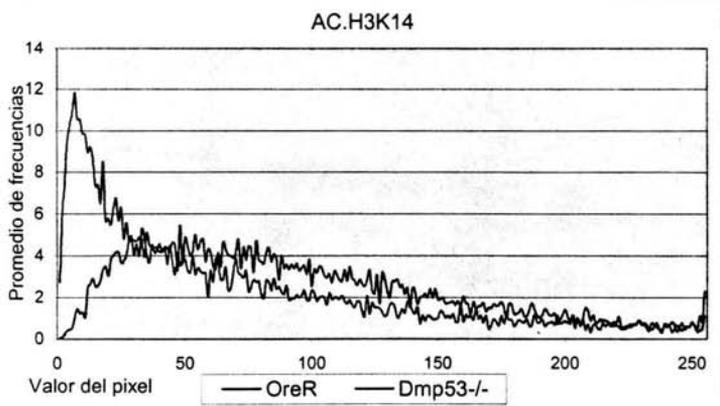
**A**



**B**



**C**



### Figura 19

Distribución de la acetilación de la K14 en la H3. Se graficó el promedio de las frecuencias de cada píxel (0-255) en distintas condiciones. (A) Patrón de acetilación de OreR sin irradiar (azul) e irradiadas a 150 J/m<sup>2</sup> (rojo). (B) Patrón de acetilación de *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar (azul) e irradiadas a 150 J/m<sup>2</sup> (rojo). (C) Comparación del patrón de acetilación de OreR (azul) con *Dmp53*<sup>-/-</sup> (rojo).

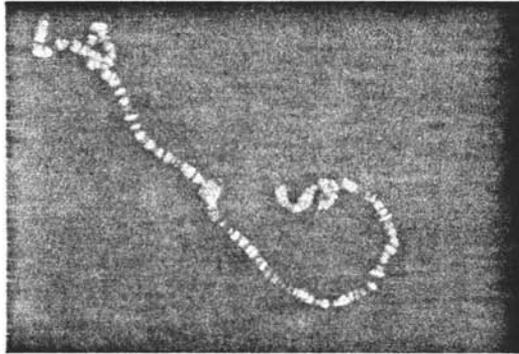
Se observó un patrón equivalente a los análisis previos, en donde la irradiación con UV induce un efecto en la acetilación de la H3 y se caracteriza por un aumento en la frecuencia de los píxeles de mayor valor. En este caso se observa que también el aumento en la acetilación de la K14 ( así como en la K9) de la H3 son componentes de la respuesta al daño al DNA por luz UV en *Drosophila*.

Posteriormente se determinó el patrón de acetilación de la K14 en la H3 en *Dmp53*<sup>-/-</sup> (Figura 19B). Al obtener este patrón se observaron dos cosas importantes. En primer lugar, se observa una respuesta significativa a la irradiación por luz UV pero con un comportamiento distinto al de OreR: no se observa un aumento en la frecuencia de los píxeles con mayor valor pero sí un desplazamiento de la curva hacia la píxeles de mayor valor y una disminución en el pico de mayor frecuencia (255).

En segundo lugar, como se observa de mejor manera en la gráfica 19C, *Dmp53*<sup>-/-</sup> presenta una disminución radical en la acetilación de la K14 que corrobora el efecto observado en el patrón de acetilación de K9 y K14 juntas (Figura 17C). Este resultado da indicios de que Dmp53 es indispensable para la acetilación correcta de la K14 en la H3 en circunstancias normales, es decir, en ausencia de un factor aparente de estrés celular.

Esta disminución clara en la acetilación de la K14 se puede incluso observar directamente en las fotografías de los cromosomas politénicos inmunotefñidos con este anticuerpo (Figura 20).

**A**



**B**



**Figura 20**

Patrón de acetilación de la K14 de la H3 en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. (A) Foto de la mosca silvestre (OreR). (B) Foto de la mosca mutante en *Dmp53* (*Dmp53*<sup>-</sup>). Es de notar la diferencia en patrón de acetilación de la K14 de la H3.

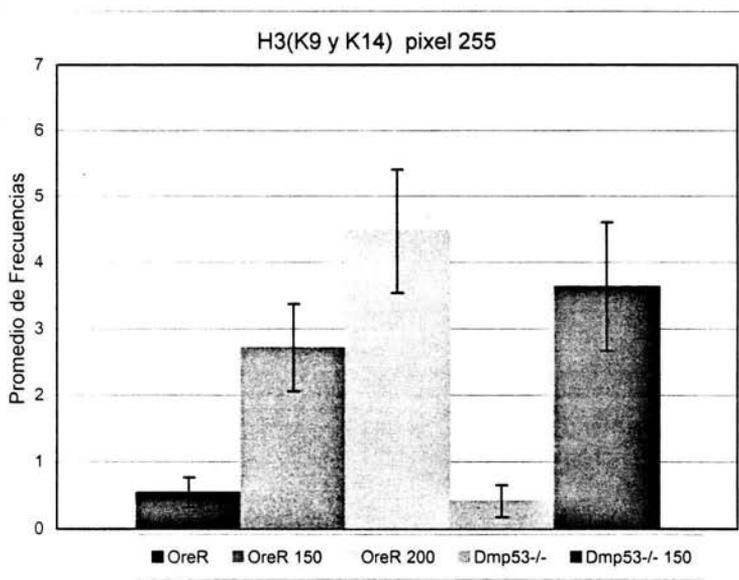
### Análisis del valor del píxel a la máxima intensidad (255)

El valor del píxel a la máxima intensidad es 255, es decir que es la máxima intensidad que cualquier programa computacional puede detectar en un píxel y por lo tanto es el valor de saturación.

La frecuencia del píxel que vale 255 nos da información acerca de los cambios en la acetilación comparando distintas condiciones, ya que un aumento en la frecuencia de este valor es directamente proporcional al aumento en la acetilación.

Se decidió analizar el cambio en la frecuencia de este píxel en las distintas condiciones anteriormente evaluadas y determinar si existen diferencias significativas.

Los cambios en la frecuencia utilizando el anticuerpo que reconoce las tres acetilaciones simultáneas de la cola de la H3 se muestran en la Figura 21



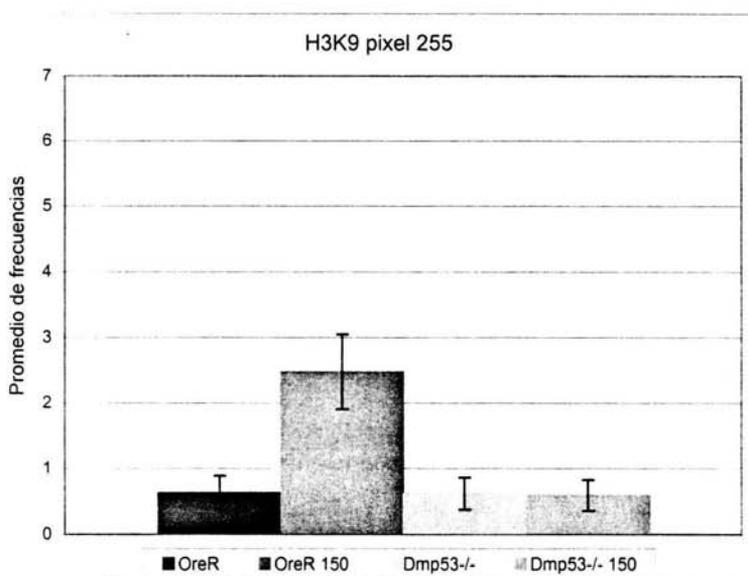
**Figura 21**

Histograma del promedio de las frecuencias del valor del píxel 255, con el anticuerpo que reconoce las acetilación simultánea de K9 y K14 de la H3. OreR sin irradiar (rojo), OreR irradiada a 150J/m<sup>2</sup> (naranja), OreR irradiada a 200J/m<sup>2</sup> (amarillo), Dmp53<sup>-/-</sup> sin irradiar (verde) y Dmp53<sup>-/-</sup> irradiada a 150J/m<sup>2</sup> (azul).

Al analizar el promedio de las frecuencias con su respectivo error estándar se observa un aumento significativo en la acetilación al irradiar con luz UV tanto en OreR como en Dmp53<sup>-/-</sup> al comparar con sus controles no irradiados. Esto indica que la irradiación con luz UV induce un aumento en la acetilación, al menos en los dos residuos analizados en este trabajo.

Por otra parte se puede notar que a mayor dosis de luz UV, mayor es el pico de acetilación que se refleja en la frecuencia del píxel 255 (Figura 21).

Al analizar la acetilación de la K9 en la H3 se puede ver un efecto consistente con lo obtenido en las gráficas que reflejan el patrón de acetilación de la K9H3 y en su respectiva prueba de  $\chi^2$ ; es decir, que en la mutante de p53 no hay cambios al irradiar con UV sino que el grado de acetilación es el mismo que en la silvestre como se muestra en la Figura 22.



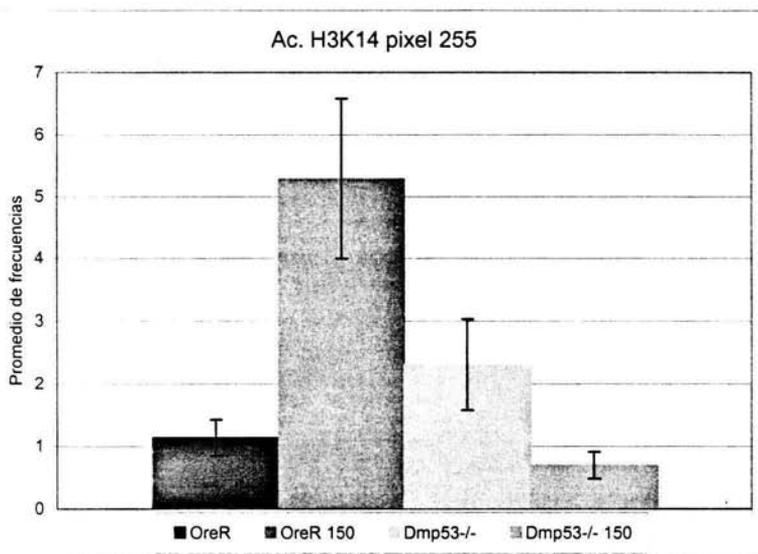
**Figura 22**

Histograma del promedio de las frecuencias del valor del píxel 255, para la acetilación de la K9 de la H3. OreR sin irradiar (rojo), OreR irradiada a 150J/m<sup>2</sup> (naranja), Dmp53<sup>-/-</sup> sin irradiar (amarillo) y Dmp53<sup>-/-</sup> irradiada a 150J/m<sup>2</sup> (verde).

Al analizar la acetilación de la K14 de la H3 con respecto a la frecuencia del píxel 255 se observan cambios diferentes a la acetilación de la K9 (Figura 23).

Tanto en la K9 como en la K14 existe un aumento en la acetilación en OreR al irradiar con luz UV. Este efecto se observa en el análisis de las distribuciones, así como en el análisis del píxel 255. Sin embargo, la ausencia de Dmp53 en la mosca mutante provoca un cambio en la acetilación de la K14 diferente al cambio en la K9. Al analizar sólo la frecuencia del píxel 255, los cromosomas obtenidos de Dmp53<sup>-/-</sup> tienen un aumento significativo en la acetilación en comparación con OreR en condiciones de no irradiación. Sin embargo al irradiar con UV este pico de acetilación disminuye y es menor al valor de la mosca silvestre en condiciones normales (Figura 23). Los valores de acetilación de Dmp53<sup>-/-</sup> en condiciones de no irradiación

y de irradiación, se acercan mucho al valor constitutivo de OreR. Para poder determinar si estos valores son realmente significativos, es necesario aumentar el número de muestra en estas condiciones y así poder estar seguros de este resultado.



**Figura 23**

Histograma del promedio de las frecuencias del valor del píxel 255, para la acetilación de la K14 de la H3. OreR sin irradiar (rojo), OreR irradiada a  $150\text{J/m}^2$  (naranja), *Dmp53<sup>-/-</sup>* sin irradiar (amarillo) y *Dmp53<sup>-/-</sup>* irradiada a  $150\text{J/m}^2$  (verde).

## DISCUSIÓN

### **El patrón de acetilación de la histona H3 en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster***

Al analizar el patrón de acetilación de la histona H3 a partir de los resultados con los tres anticuerpos utilizados, se pudo observar que en cromosomas politénicos de *Drosophila*, existe un patrón característico de acetilación en esta histona (al menos en los dos residuos analizados). Con base en evidencias previas en otros modelos, tanto la acetilación de la K9 como la de la K14 son importantes en la transcripción génica (Strahl y Allis, 2000). Sin embargo, los reportes recientes en cromosomas politénicos de *Drosophila* han cuestionado esta propuesta. En condiciones normales tanto la K9 como la K14 de la H3 se encuentran tanto en zonas de transcripción activa como de inactiva. Al inducir estrés por un choque térmico, la acetilación de ambos residuos parece no cambiar en su distribución y por lo mismo ninguna se concentra en las zonas de transcripción de genes por choque térmico (Nowak y Corces, 2000). Estos datos son contrarios al hecho de que diversos factores transcripcionales involucrados en activación, tales como Gcn5 y TAFII250 (Revisado en Grant, 2001), tienen una actividad intrínseca de acetilación de histonas. Sin embargo, estas evidencias se han encontrado en modelos como levadura y mamífero y no en *Drosophila*. En estudios posteriores, se corroboró el dato de que la K14 de la H3 en *Drosophila*, no está acetilada en promotores de genes en transcripción activa, independientemente del tipo de promotor del que se trate (Labrador y Corces, 2003). Es claro que tanto la acetilación de la K9 como la de la K14 de la H3 son parte constitutiva del código histónico en cromosomas politénicos de *Drosophila*, sin embargo, no se sabe de manera clara cuál es el papel de estas acetilaciones en este modelo. Por lo mismo, los resultados de este trabajo dan indicios de la posible función de estas acetilación en *D. Melanogaster*.

### **La acetilación de la K9 y K14 de la H3 como componentes de la respuesta a daño al DNA**

Se sabe que en respuesta a daño al DNA por luz UV, la acetilación global de las histonas aumenta de forma significativa en células humanas en cultivo (Ramanathan y Smerdon, 1986).

Existen evidencias de que tanto la acetilación de la K9 como de la K14 aumentan significativamente al irradiar cultivos de células humanas con luz UV (Allison y Milner, 2003). Con base en los resultados presentados en esta tesis, podemos concluir que también en cromosomas politénicos de *Drosophila*, existe un aumento en la acetilación de estos residuos al inducir daño al DNA por luz UV.

En el análisis inicial, con el anticuerpo de acetilación simultánea de la K9 y K14 en la H3 (Figura 17A), observamos un aumento significativo en la acetilación al irradiar con luz UV que (Figura 21). Este aumento se reflejaba como un pico en la frecuencia del píxel 255, mientras que la distribución general se mantiene prácticamente igual (Figura 17A). Si el aumento en la acetilación fuera un aumento global a lo largo del genoma observaríamos un corrimiento en la gráfica hacia la derecha. La ausencia de este resultado nos indica que deben existir puntos específicos del genoma que se enriquecen con la acetilación de estos dos residuos.

El cambio en la acetilación que observamos con el anticuerpo simultáneo de K9 y K14, fue analizado de manera individual con el análisis de cada residuo (Figuras 18A y 19A). Al irradiar con luz UV, la acetilación de la K9 y de la K14 aumentaron de manera significativa, como se observa en la distribución de los píxeles (Figura 18A y 19A respectivamente y Anexo2), así como en el análisis del píxel 255 (Figuras 22 y 23 respectivamente). Sin embargo, el cambio en la distribución de la acetilación la K9 es distinto al de la K14. La acetilación de la K9 aumenta de una manera más global, ya que aumenta la frecuencia de los píxeles de mayor valor mientras que disminuye en los píxeles de menor valor (Figura 18A). Por otra parte, la acetilación de la lisina 14 parece tener el mismo comportamiento que observamos en el análisis del anticuerpo simultáneo de K9 y K14. Es decir que la distribución general de la K14 en condiciones de no irradiación (o constitutivas) es prácticamente la misma que irradiar con luz UV, excepto por el pico en el píxel 255 (Figura 19A). Esto nos indica que posiblemente el aumento en la acetilación de la K14 se da en sitios específicos del genoma a diferencia de la acetilación de la K9.

Con base en las evidencias previas y en nuestros resultados, podemos proponer que la acetilación de la K9 y K14 de la histona H3 son parte de la respuesta al daño al DNA inducido por luz UV en eucariontes, y en específico en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. Además, la respuesta en cada uno de los residuos es diferencial, y por lo tanto probablemente estos cambios tengan papeles distintos durante la respuesta al daño al DNA.

Es importante mencionar que a diferencia de los estudios previos en mamíferos, en este trabajo obtuvimos evidencias *in vivo* de los cambios en la acetilación de la histona H3 y de una manera cuantitativa, gracias a las ventajas de los cromosomas politénicos de *Drosophila* como modelo de estudio.

¿Cuál es la función de la acetilación de la K9 y K14 de la histona H3 en la respuesta a daño al DNA por luz UV?

Una posibilidad es que estos cambios en la acetilación provoquen una relajación global de la cromatina que permita la reparación global del genoma (GGR) por NER. Esto podría estar sucediendo en el caso de la acetilación de la K9, ya que en respuesta a la luz UV se da un aumento global a todo lo largo del genoma. Si esto es así, es muy probable que la acetilación en este residuo no sea la única en aumentar, sino que exista una acetilación de otros residuos en la histona H3 o en cualquier otra. Se sabe que, al igual que durante la transcripción, las altas concentraciones de residuos acetilados en los nucleosomas, alteran sus propiedades de exposición, así como las estructuras altamente condensadas de la cromatina. La relajación de la cromatina por el aumento en la acetilación de lisinas, permitiría la entrada de la maquinaria de NER, en específico de las moléculas encargadas de detectar los daños a lo largo del genoma. Sin embargo una relajación global aumentaría el riesgo de exposición del DNA a los agentes del daño.

La otra posibilidad es que acetilaciones como la de la K14 se enriquezcan en sitios específicos del genoma. Esto podría constituir una marca para el reclutamiento de complejos remodeladores o incluso de la maquinaria misma de reparación, en zonas donde la cromatina necesita ser remodelada para reparar el daño al DNA inducido por la luz UV. Una posibilidad, es que las zonas ricamente acetiladas de la cromatina, sean aquellas en donde se generó daño al DNA por luz UV.

**Dmp53 es importante para el aumento en la acetilación de la lisina 9 de la H3 en respuesta a daño al DNA por luz UV**

Al analizar el patrón de acetilación de la K9 en la mosca silvestre, se encontró un aumento significativo en la acetilación en respuesta a la irradiación, tanto a lo largo de la distribución como en el píxel 255 (Figuras 18A y 22 respectivamente). Al evaluar el patrón de la acetilación

de este residuo en la *Dmp53<sup>-/-</sup>*, se observan dos cosas. En primer lugar, el patrón de acetilación en cromosomas no irradiados de *Dmp53<sup>-/-</sup>*, es prácticamente igual al patrón de los cromosomas silvestres en las mismas condiciones. Es decir, que en condiciones constitutivas, la presencia de Dmp53 no altera de manera significativa el patrón de acetilación de histonas. En segundo lugar, el patrón de acetilación de los cromosomas *Dmp53<sup>-/-</sup>* no cambia al irradiar con luz UV, es decir los cromosomas sin irradiar presentan el mismo patrón que los irradiados (Figura 18B y 22). Con base en estos resultados, podemos decir que la presencia de Dmp53 es importante para el aumento en la acetilación de la K9 como parte de la respuesta a daño al DNA generado por luz UV, ya que en su ausencia (es decir en *Dmp53<sup>-/-</sup>*) no se da el aumento en la acetilación que observamos en los cromosomas obtenidos de la línea silvestre.

¿Porqué Dmp53 es importante para la acetilación en este residuo?

Al inducir daño al DNA en mamífero, diversos procesos antes mencionados culminan en la activación de p53. Una vez activado, p53 es capaz de reclutar a diversas HATs entre las que se encuentran CBP/p300 (Barlev *et al.*, 2001 y Kusch *et al.*, 2003). Esta última es capaz de acetilar diversos residuos de la H3 y H4, y es reclutada por p53 a los sitios del daño al DNA en respuesta a luz UV en células humanas (Rubbi *et al.*, 2003). Con base en estas evidencias y en los resultados de este trabajo, podemos proponer que en respuesta a daño al DNA por luz UV, Dmp53 podría reclutar HATs como CBP/p300 y así propiciar la acetilación de histonas y por ende se provocaría la relajación de la cromatina. Es factible pensar que la acetilación de la K9 de la H3 es una de tantas acetilaciones en las histonas necesaria para la relajación de la cromatina. Esta relajación permite entonces la entrada a la maquinaria de reparación por NER. La actividad de p53 en mamífero parece ser importante, sino indispensable, en el este evento. Sin embargo es necesario realizar estudios posteriores que comprueben la interacción de CBP con Dmp53 en *Drosophila melanogaster* en respuesta a daño al DNA por luz UV y evalúen si Dmp53 está funcionando como p53 de mamífero.

### **Dmp53 es importante para mantener los niveles constitutivos de acetilación de la K14 de la histona H3**

En condiciones de no irradiación, el patrón de la acetilación simultánea de K9 y K14 de la mosca *Dmp53<sup>-/-</sup>* disminuye significativamente con respecto a la mosca silvestre (Figura 17C y

Anexo2). Esto nos llevó a evaluar cuál de los dos residuos estudiados se afectaba específicamente por la ausencia de Dmp53. La acetilación de la K9 en los cromosomas de *Dmp53<sup>-/-</sup>*, no presenta ninguna diferencia significativa con respecto al patrón de OreR en condiciones constitutivas (Figura 18C). Esto difiere de las evidencias en células de carcinoma humano, en donde la línea nula para *p53* carece por completo de esta acetilación en las mismas condiciones (Allison y Milner, 2003).

Sin embargo, al analizar los cambios en la acetilación de la K14, se observó una diferencia dramática entre el patrón silvestre y el de la mutante en *Dmp53*. En condiciones de no irradiación, la ausencia de Dmp53 en *Dmp53<sup>-/-</sup>* conlleva a una drástica disminución de la acetilación en esta lisina (Figura 19C), efecto que se distingue incluso en las mismas fotos de los cromosomas politénicos (Figura 20A y 20B). Este resultado también difiere de lo observado en células de carcinoma humano, ya que en estas últimas los niveles constitutivos de acetilación de la K14 son idénticos entre la línea deficiente en *p53* y la línea que si presenta *p53*.

¿Porqué nuestros resultados son distintos a los obtenidos en células de carcinoma humano en cultivo?

Por un lado, es importante señalar que el estudio en células humanas, es un estudio *in vitro* a partir de clonas isogénicas *p53<sup>+/+</sup>* y *p53<sup>-/-</sup>* derivadas de carcinomas humanos. Los efectos reales de la ausencia de *p53* pueden estar enmascarados por efectos colaterales provenientes de la misma naturaleza de estas células. Es decir, que una célula cancerígena puede presentar numerosas alteraciones mas allá de la presencia o ausencia de *p53*, y por ende, no podemos estar completamente seguros de que este efecto en la acetilación de histonas se deba únicamente al efecto de la deficiencia en *p53*.

La acetilación de histonas juega un papel crucial en la activación transcripcional en los humanos y en la levadura, pero aparentemente es distinto al que tiene en *Drosophila* y por lo tanto es factible pensar que la acetilación de la K9 y la de la K14 tengan también implicaciones diferentes.

Al irradiar *Dmp53<sup>-/-</sup>* se observó un efecto en la acetilación de la K14. El pico de máxima frecuencia se recorre hacia la derecha pero, a diferencia de lo observado en OreR, no observamos un pico en el valor de mayor intensidad. Esto nos indica que la mosca mutante sí

responde a la irradiación, pero esta respuesta es diferente a la respuesta silvestre debido a la ausencia de *Dmp53*. Para entender qué es lo que está cambiando con respecto la respuesta a daño al DNA es necesario realizar estudios mas profundos.

¿Por qué la ausencia de *Dmp53* en nuestro modelo altera drásticamente la acetilación de un residuo específico en las colas de histonas?

En estudios previos en mamífero, se ha demostrado que p53 al activarse, tiene la capacidad de reclutar tanto a CBP/p300 como a TRRAP a promotores de genes como *p21* en (Barlev *et al.*, 2001). TRRAP es una proteína que forma parte de los complejos PCAF/hGcn5 y Tip60 en humanos. El reclutamiento de estos complejos a la cromatina, culmina en la acetilación de histonas y en la consecuente activación transcripcional (Agalioti *et al.*, 2002). Tanto TRRAP como CBP tienen sus homólogos en *Drosophila melanogaster*, al igual que en otros eucariontes (Kusch *et al.*, 2003), y es de esperar, que *Dmp53* pueda también reclutar HATs a sitios específicos del genoma, y tener como consecuencia la acetilación de histonas.

Pero ¿por qué se afecta la acetilación de la K14 y no de la 9?

Muy recientemente, estudios en *Drosophila* comprobaron que *Dmp53* interactúa con dGcn5 (homólogo de hGcn5) y con dAda2b (Kusch *et al.*, 2003). Estas dos proteínas, junto con PCAF, forman parte de complejos como SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetilasa), que pueden acetilar histonas y modular la activación transcripcional. En estudios en levadura, se ha mostrado que, a pesar de tener la capacidad de acetilar diversos residuos de las colas de histonas, Gcn5 y PCAF son HATs que acetilan preferentemente la K14 de la H3 (Revisado en Grant, 2001).

Con base en lo anterior, podríamos especular que *Dmp53* tiene la capacidad de reclutar a la cromatina a complejos como SAGA, para así acetilar de manera específica la K14 de la H3. Bajo la suposición de que *Dmp53* fuera un componente esencial para el reclutamiento de estas HATs, es posible explicar el porqué de nuestros resultados. En ausencia de *Dmp53*, no se reclutarían complejos como dGcn5 y PCAF a la cromatina y por lo tanto disminuiría de manera clara la acetilación de la K14 de la H3.

¿Cuáles son las implicaciones funcionales de la acetilación de la K14 de la histona H3?

Estudios muy recientes en *S.cerevisiae* han descrito la existencia de una proteína llamada Rsc4 que se une específicamente a la acetilación de la K14 de la H3 (Kasten *et al.*, 2004).

Rsc4 es una proteína con dos bromodominios en tandem, que forma parte del complejo remodelador RSC en levadura. Este complejo remodelador está involucrado tanto en la activación como en la represión de genes. Sin embargo en este estudio sugieren que cuando Rsc4 forma parte del complejo, RSC tiene una función sólo en la activación génica. Es interesante que mutantes en *Rsc4* son letales al interactuar con mutantes deficientes en *Gcn5* (Kasten *et al.*, 2004). Esto sugiere que el complejo RSC, por medio de Rsc4, reconoce la acetilación de la K14 de la H3, previamente modificada por Gcn5, y que este proceso es esencial para la sobrevivencia del organismo.

Las consecuencias directas de la disminución de la acetilación de la K14 de la H3 en *Drosophila* no se conocen. Sin embargo este residuo podría ser reconocido por ciertos complejos remodeladores con el objetivo de remodelar ciertas regiones de los cromosomas, y probablemente exista también una proteína capaz de reconocer de manera específica esta modificación. La disminución drástica de la acetilación en este residuo, debe tener consecuencias claras en la dinámica celular, que sin lugar a dudas requieren de estudios mucho más profundos al respecto.

En ausencia de estrés celular, p53 se mantiene en niveles muy bajos en la célula de mamífero (Mazan-Mamczarz *et al.*, 2003), ya que se encuentra regulada negativamente por la proteína Mdm2 (Oren, 2003). En *Drosophila* no existe un homólogo de Mdm2, como se mencionó en la introducción, y se desconoce algún mecanismo de regulación de Dmp53. Si Dmp53 tuviera un mecanismo de regulación negativa como en mamífero, los resultados de este trabajo darían pauta a diversas preguntas. Si Dmp53 se encuentra inactivo y en niveles constitutivos bajos en la célula, al igual que en mamífero, en condiciones de no irradiación, porque la ausencia de Dmp53 causa cambios detectables e incluso drásticos en las modificaciones histonas (en específico K9 y K14 de la H3).

Con respecto a los resultados obtenidos en esta tesis, una posibilidad es que las condiciones en que realizamos los experimentos hayan generado el estrés suficiente para desencadenar una respuesta celular y propiciar la activación y traducción de Dmp53. Sin embargo, es difícil pensar qué factor durante el desarrollo de los experimentos pudo haber causado este efecto, ya que las condiciones ambientales en las que mantuvimos a las moscas están consideradas como condiciones favorables para el desarrollo de este organismo.

Otra posibilidad es que los bajos niveles de p53 en la célula, sean más que suficientes para ejercer una función celular que culmine en la correcta acetilación de histonas.

Es importante considerar que, a pesar de las evidencias que vinculan a p53 con la remodelación de cromatina y con la reparación del DNA, los efectos en la acetilación de histonas que observamos en este trabajo, pueden ser consecuencia de una desregulación global por la ausencia de Dmp53. Dicho de otra forma, debido a que p53 es un factor transcripcional importante para la regulación de una gran cantidad de genes, no es difícil pensar que el efecto que vemos en las histonas en ausencia de Dmp53 sea un efecto colateral. Para descartar esta posibilidad es necesario realizar experimentos posteriores que vinculen de manera directa la función de Dmp53 con la acetilación de histonas en *Drosophila* y el mecanismo de reparación por NER.

Con base en los resultados obtenidos, tanto de la acetilación de la K9 como de la K14 de, podemos especular que Dmp53 ejerce una función diferencial al nivel de la cromatina dependiendo del estado en el que se encuentra la célula. Esto implica que en distintas condiciones Dmp53 tendría la capacidad de interactuar con diferentes proteínas ejerciendo respuestas celulares diferenciales dependiendo del contexto celular. La proteína p53 en mamífero, sufre distintas modificaciones postraduccionales mencionadas previamente en la introducción, que modulan su función y determinan su afinidad a distintas proteínas. Este código de modificaciones sobre p53 determina si ésta activará vías apoptóticas o de detención celular o favorecerá la reparación del DNA, dependiendo de las condiciones en las que la célula se encuentre (Brooks y Gu, 2003). Con base en lo anterior, podemos pensar que este código de modificaciones postraduccionales, es también capaz de modular la interacción de p53 con distintas HATs dependiendo del contexto celular. En específico, p53 podría interactuar con HATs como dGcn5 en condiciones celulares en equilibrio, y modificar su afinidad aumentando su interacción con CBP/p300 en respuesta a daño al DNA por luz UV.

## CONCLUSIONES

La acetilación de la lisina 9 y de la lisina 14 de la histona H3 son parte constitutiva del código histónico en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*, presentando un patrón específico en la cromatina, corroborando los datos obtenidos previamente por Corces *et al.*

La acetilación de la lisina 9 y 14 de la histona H3 son parte de la respuesta a daño al DNA inducido por luz UV en eucariontes. En específico, la acetilación de ambos residuos aumenta en respuesta a daño al DNA por luz UV en cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. Esta respuesta es diferencial y por lo tanto podrían participar de manera distinta en el proceso de reparación del DNA.

Dmp53 es importante para el aumento en la acetilación de la lisina 9 como parte de la respuesta a daño al DNA por luz UV, ya que en su ausencia no existe la respuesta que observamos en la condición silvestre.

Dmp53 es esencial para mantener los niveles constitutivos de acetilación de la lisina 14 de la histona H3. La deficiencia en *Dmp53* causa una disminución dramática en la acetilación de este residuo, y esto debe tener una implicación directa en el funcionamiento celular de la mosca *Dmp53<sup>-/-</sup>*.

## PERSPECTIVAS

### **La acetilación de la lisina 9 y 14 de la H3 como componentes de la respuesta a daño al DNA en *D.melanogaster***

En nuestros resultados observamos que el aumento en la acetilación de estos residuos son parte de la respuesta a daño al DNA generado por luz UV. Sería interesante evaluar si existen sitios específicos del genoma que se enriquecen en estas acetilaciones. Si evaluamos el enriquecimiento en la acetilación a partir de distintos eventos de irradiación, podemos decir si el aumento en la acetilación se localiza siempre en las mismas zonas o dependen de cada evento de irradiación.

Si los sitios en donde la acetilación aumenta son diferentes en cada evento de irradiación, es posible que estas acumulaciones funcionen para señalar los sitios en donde se generaron lesiones en el DNA, y entonces, sería interesante evaluar qué complejos remodeladores son los responsable de reconocer estas acetilaciones en *Drosophila*.

Si los sitios en donde la acetilación aumenta son los mismos a lo largo del genoma, es posible analizar que genes son los que sufren estas acetilaciones. Por medio de CHIPs (inmunoprecipitaciones de cromatina) y de mapeo de cromosomas politénicos, es posible determinar qué genes se encuentran en los nucleosomas acetilados y si alguno de ellos tiene un papel específico en la reparación por NER. Si esto sucede, podríamos evaluar mediante northern y westerns, si estos genes están siendo transcritos y traducidos, respectivamente. Los resultados de este análisis podrían darnos indicios de la posible función de estas acetilaciones en *Drosophila*.

### **La importancia de Dmp53 en la respuesta a daño al DNA por luz UV en *D.melanogaster***

Debido a los resultados obtenidos en esta tesis, es interesante evaluar el papel de Dmp53 al nivel de la cromatina en respuesta al daño al DNA. Una de las formas de abordarlo de manera directa es la inmunolocalización de Dmp53 en la cromatina en cromosomas politénicos.

La localización de esta proteína antes y después de la irradiación nos puede dar pistas de la función directa en la reparación del DNA por NER.

Por otro lado, al colocalizar Dmp53 con las distintas acetilaciones de histonas podríamos fortalecer la hipótesis de que p53 es capaz de reclutar diversas acetilasas a los sitios del DNA a los que esta proteína se une. La capacidad de p53 de reclutar acetilasas al DNA y por ende inducir la acetilación de histonas es un proceso más estudiado en el contexto de las otras funciones de p53. En específico, se han analizado las acetilaciones de histonas en genes involucrados en la detención del ciclo celular dependientes de p53 (Barlev *et al.*, 2001). Sin embargo, inicialmente Dmp53 parece no tener implicaciones en el ciclo celular, pero sería interesante evaluar esta capacidad de reclutamiento de HATs en el contexto del daño al DNA por luz UV.

### **p53 y HATs**

p53 es capaz de interactuar con diversas acetilasas, entre las que se encuentra CBP/p300, Gcn5 entre otras. En *D.melanogaster* existen mutantes hipomórficas para CBP que presentan defectos en el desarrollo embrionario. Una manera de evaluar la interacción de Dmp53 con CBP es a partir de la genética. Si la cruce de ambas mutantes genera una progenie con fenotipos claros que pueden causar hasta letalidad podemos saber que existe una interacción genética entre estas dos proteínas.

El observar un fenotipo en las moscas a partir de la cruce mencionada nos habla de que existe una interacción entre estas dos moléculas, sin embargo no nos dice a que nivel se está darnos esta interacción. CBP/p300 no solo es reclutada por p53 a la cromatina (Rubbi *et al.*, 2003) sino también es la acetilasa encargada de acetilar a p53 y estabilizarla (Revisado en Brooks y Gu, 2003), por lo que sería interesante evaluar la función de estas dos proteínas al nivel de la cromatina.

Utilizando como modelo los cromosomas politénicos de *Drosophila*, podemos realizar colocalizaciones de Dmp53 con CBP en condiciones normales y al irradiar con luz UV. Si estas dos proteínas colocalizan al irradiar las larvas con luz UV podemos suponer que la interacción se da al nivel de la cromatina.

## ANEXO 1

A continuación se presentan los valores de p al realizar la prueba de  $\chi^2$  al comparar los patrones mostrados en las gráficas anteriores. El \* indica que existe una diferencia significativa entre las distribuciones comparadas.

Anticuerpo	Condiciones comparadas	Valor de p
Ac. H3 K9 y K14	Wt Vs Wt(UV 150)	1.75980 E-06 *
	Wt Vs Wt(UV 200)	4.76453 E-19 *
	Wt(UV 150) Vs Wt(UV 200)	0.874932
	Dmp53 <sup>-/-</sup> Vs Dmp53 <sup>-/-</sup> (UV 150)	0.000014 *
	Dmp53 <sup>-/-</sup> Vs Wt	0.000015 *
Ac.K9H3	Wt Vs Wt(UV 150)	2.09636 E-12 *
	Dmp53 <sup>-/-</sup> Vs Dmp53 <sup>-/-</sup> (UV 150)	0.319714
	Dmp53 <sup>-/-</sup> Vs Wt	0.953097
Ac.K14H3	Wt Vs Wt(UV 150)	0.000059 *
	Dmp53 <sup>-/-</sup> Vs Dmp53 <sup>-/-</sup> (UV 150)	7.34474 E-14 *
	Dmp53 <sup>-/-</sup> Vs Wt	1.48027 E-139 *

**Tabla 4**

Analizar los resultados de la prueba de  $\chi^2$  nos permitió sustentar varias observaciones. En el análisis del patrón de acetilación de la K9 y K14 de la H3 se observa una diferencia significativa entre OreR sin irradiar y el irradiado tanto a 150J/m<sup>2</sup> como a 200J/m<sup>2</sup>. Sin embargo no hay diferencia significativa entre la irradiación a 150J/m<sup>2</sup> y a 200J/m<sup>2</sup>. De igual forma, en Dmp53<sup>-/-</sup> también se observa una diferencia significativa al irradiar a 150J/m<sup>2</sup> así como al comparar el patrón Dmp53<sup>-/-</sup> con el silvestre.

Al comparar los tratamientos con respecto a la acetilación de la K9 pudimos verificar lo que observábamos en las gráficas, es decir, que la única diferencia significativa se observa entre el patrón de OreR si irradiar y la irradiada a la dosis letal media. Por lo anterior, podemos decir

que el patrón de *Dmp53*<sup>-/-</sup> es extremadamente parecido al silvestre y que no existe una respuesta a la irradiación por UV en ausencia de Dmp53, al menos en la acetilación de la K9. Por otra parte, al evaluar el efecto sobre la acetilación de la K14, observamos que al irradiar con UV se da un cambio significativo tanto en OreR como en *Dmp53*<sup>-/-</sup>, sin embargo al comparar el patrón del silvestre con el mutante obtuvimos el valor más bajo de p en toda la prueba. Lo anterior nos permite corroborar que la mutante en Dmp53 sufre una disminución dramática en la acetilación de la K14 que se refleja de manera contundente tanto en las gráficas como en el valor de p al realizar la prueba de  $\chi^2$ .

## **ANEXO 2**

Fotos de cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* de los distintos  
tratamientos analizados.

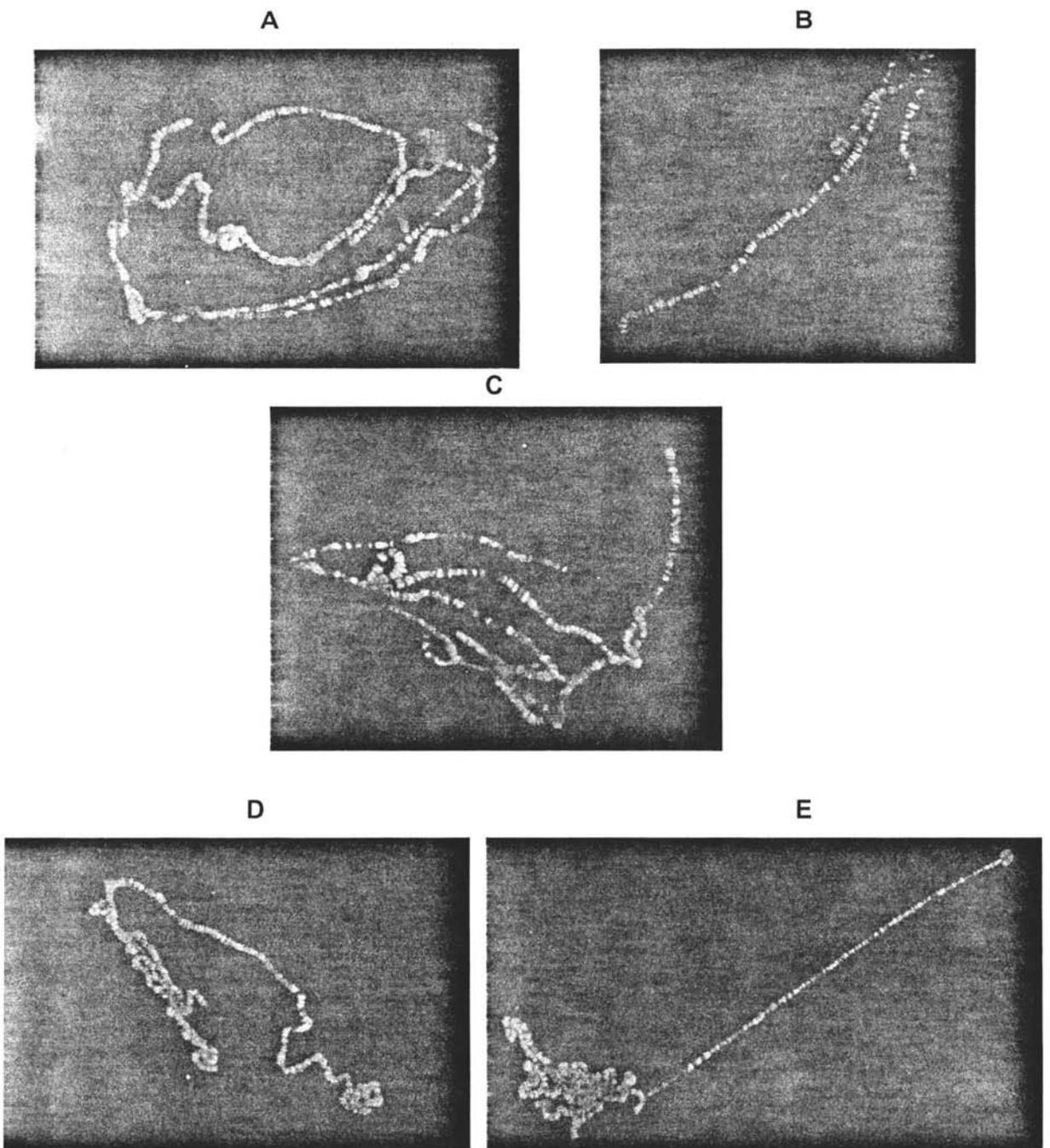


FIGURA 1

Cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* inmunoteñidos con el anticuerpo Anti-Acetilación que reconoce de manera simultánea la acetilación de la K9 y K14 de la histona H3. (A) mosca silvestre (OreR) sin irradiar. (B) mosca silvestre irradiada a  $150\text{J/m}^2$  (C) mosca silvestre irradiada a  $200\text{J/m}^2$  (D) mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar. (E) mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> irradiada a  $150\text{J/m}^2$ .

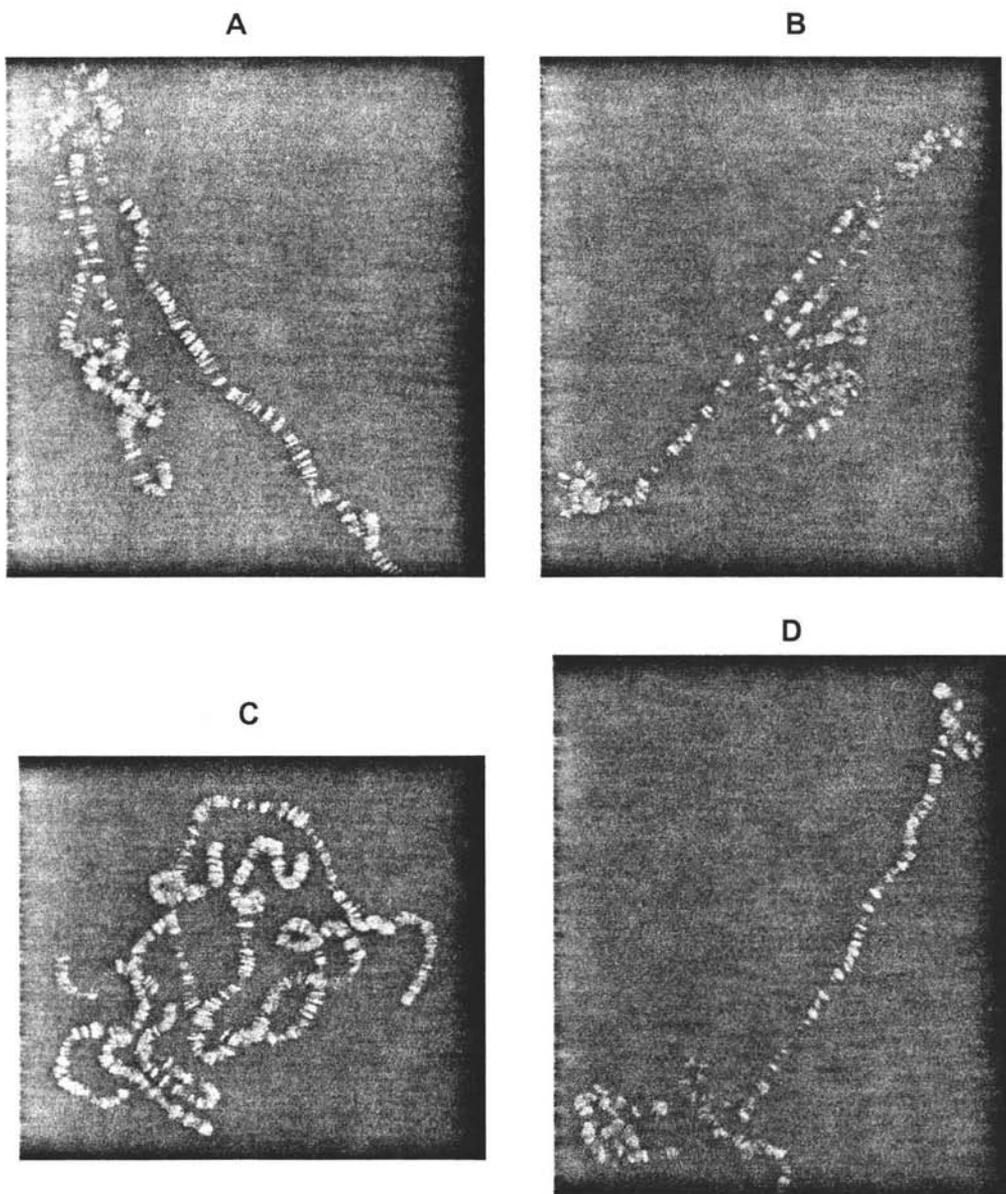
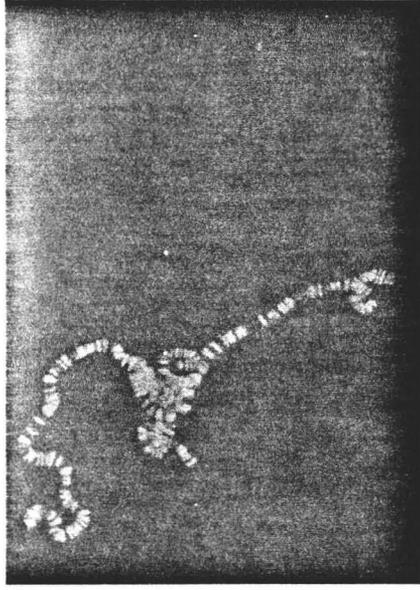


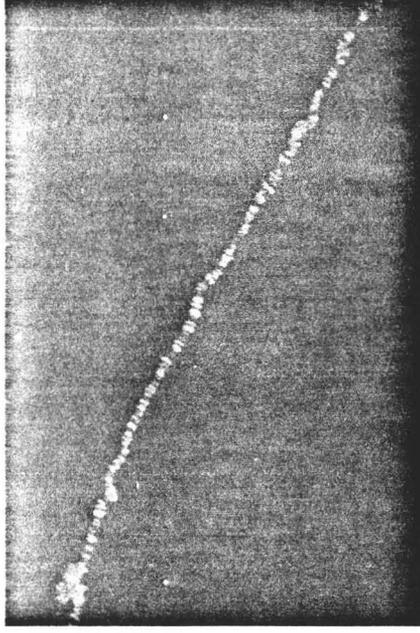
FIGURA 2

Cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* inmunoteñidos con el Anticuerpo Anti-Acetilación de la K9 de la histona H3. (A) mosca silvestre (OreR) sin irradiar. (B) mosca silvestre irradiada a  $150\text{J/m}^2$  (C) mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> sin irradiar (D) mosca *Dmp53*<sup>-/-</sup> irradiada a  $150\text{J/m}^2$ .

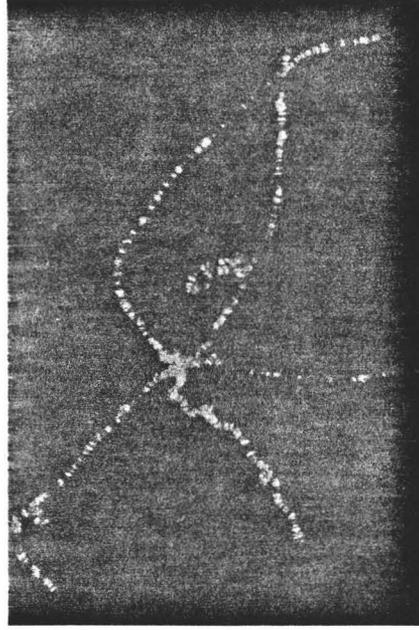
A



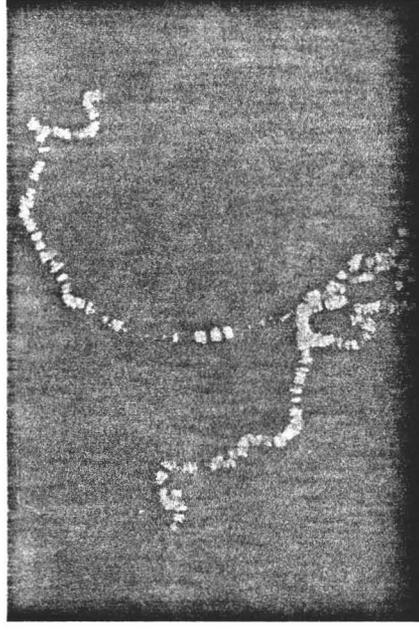
B



C



D



**FIGURA 3**

Cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* inmunoteniados con el Anticuerpo Anti-Acetilación de la K14 de la histona H3. (A) mosca silvestre (OreR) Sin irradiar. (B) mosca silvestre irradiada a  $150\text{J/m}^2$  (C) mosca *Dmp53<sup>-/-</sup>* sin irradiar (D) mosca *Dmp53<sup>-/-</sup>* irradiada a  $150\text{J/m}^2$ .

## REFERENCIAS

- Agalioti T, Chen G, Thanos D, 2002, **Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene**, Cell 111:381-392
- Ahmad K & Henikoff S, 2002, **Epigenetic consequences of nucleosome dynamics**, Cell, 111:281-284
- Allison SJ & Milner J, 2003, **Loss of p53 has site-specific effects on Histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy**, Cancer Research, 63:6674-6679
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002, **Molecular Biology of the Cell**, 4ta Edición, Garland Science, NY, pp 191-233
- Attardi LD & DePinho RA, 2004, **Conquering the complexity of p53**, Nature genetics, 36:7-8
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, *et al*, 2001, **Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain**, Nature, 410:120-124
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, 2001, **Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases**, Molecular Cell, 8:12453-1254
- Birger Y, West KL, Postnikov YV, Lim JH, Furusawa T, Wagner JP, *et al.*, **Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin**, EMBO Journal, 22:1665-1675
- Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SYR, *et al.*, 2001, **Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae***, Genes and Development, 15: 3286-3295
- Brodsky MH, Weinert BT, Tsang G, Rong YS, McGinnis NM, Golic KG, *et al.*, 2003, ***Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage**, Molecular and Cellular Biology, 24:1219-1231
- Brooks CL y Gu W, 2003, **Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation**, Current Opinion in Cell Biology, 15:164-171

- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, *et al.*, 1998, **Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53**, *Science*, 281:1677-1679
- Cheung LW, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, *et al.*, 2003, **Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase**, *Cell*, 113:507-517
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P, 2000, **Signaling to chromatin through histone modifications**, *Cell*, 103:263-271(A)
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD, 2000, **Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation**, *Molecular Cell*, 5:905-915(B)
- Darnell J, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, *et al.*, 2004, **Molecular Cell Biology**, 5ta Edición, W.H. Freeman and Company, NY, pp 424-433
- De Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ, 1999, **Molecular mechanism of nucleotide excision repair**, *Genes and Development*, 13:768-785
- Frit P, Bergmann E, Egly J-M, 1999, **Transcription factor IIF: a key player in the cellular response to DNA damage**, *Biochimie*, 81:27-38
- Fyodorov DV y Kadonaga JT; 2001, **The many faces of chromatin remodeling:SWitching beyond transcripción**, *Cell*, 106:523-525
- Gontijo AM de MC, Green CM, Almouzni G, 2003, **Repairing DNA damage in chromatin**, *Biochimie*, 85: 1133-1147
- Grant PA, 2001, **A tale of histone modifications**, *Genome Biology*, 2:1-6
- Green CM y Almouzni G, 2002, **When repair meets chromatin**, *EMBO Reports*, 3: 28-33
- Jenuwein T, 2001, **Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases**, *Trends in Cell Biology*, 11:266-272
- Jenuwein T y Allis CD, 2001, **Translating the histone code**, *Science*, 293:1074-1079
- Kasten M, Szerlong H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Werner M y Cairns BR, 2004, **Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14**, *The EMBO Journal*, 23:1348-1359

- Kusch T, Guelman S, Abmayr SM, Workman JL, 2003, **Two *Drosophila* Ada2 homologues function in different multiprotein complexes**, Molecular and Cellular Biology, 23(9):3305-3319
- Labrador M y Corces VG, 2003, **Phosphorylation of histone H3 during transcriptional activation depends on promoter structure**, Genes and Development, 17:43-48
- Lee JH, Lee E, Park J, Kim E, Kim J, Chung J, 2003, ***In vivo* p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila***, FEBS letters, 550:5-10
- Lisuka M y Smith MM, 2003, **Functional consequences of histone modifications**, Current Opinion in Genetics and Development, 13:154-160
- Madigan JP, Chotkowski HL, Glaser RL, 2002, **DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis**, Nucleic Acids Research, 30: 3698-3705
- Marmostein R y Berger SL, 2001, **Structure and function of bromodomains un chromatin-regulating complexes**, Gene, 272:1-9.
- Mazan-Mamczarz K, Galbán S, López de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, *et al.*, 2003, **RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation**, PNAS, 100:8354-8359
- Mujtaba S, He Y, Zeng L, Yan S, Plotnikova O, Sachchidanand, *et al.*, 2004, **Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation**, Molecular Cell, 13:251-263
- Narlikar GJ, Fan H-Y, Kingston RE, 2002, **Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription**, Cell, 108:475-487
- Nelson DL y Cox MM, 2000, **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3era Edición Worth Publishers, NY, pp 923-924
- Nordstrom W y Abrams JM, 2000, **Guardian ancestry: fly p53 and damage-inducibile apoptosis**, Cell Death and Differentiation, 7:1035-1038
- Nowak SJ y Corces VG, 2000, **Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci**, Genes and Development, 14: 3003-3013
- Nowak SJ y Corces VG, 2004, **Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation**, Trends in Genetics, 20(4):214-220

- Oren M, 2003, **Decision making by p53: life, death and cancer**, Cell Death and Differentiation, 10:431-442
- Peterson CL y Côte J, 2004, **Cellular machineries for chromosomal DNA repair**, Genes and Development, 18:602-616
- Ramanathan B y Smerdon MJ, 1986, **Changes in nuclear protein acetylation in u.v.-damaged human cells**, Carcinogenesis, 7: 1087-1094
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun Z-W, Schmid M, *et al.*, 2000, **Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases**, Nature, 406: 593- 599
- Reynaud E, Lomelí H, Vázquez M, Zurita M, 1999, **The *Drosophila melanogaster* homologue of the Xeroderma Pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes**, Molecular Biology of the Cell, 10:1191-1203
- Roth SY, Denu JM, Allis CD, 2001, **Histone acetyltransferases**, Annual Reviews in Biochemistry, 70:81–120
- Rubbi CP y Milner J, 2003, **p53 is a chromatin accesibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage**, The EMBO Journal, 22:975-986
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH, 2001, **Regulation and function of the p53 tumor supressor protein**, Current Opinion in Cell Biology, 13:332-337
- Smerdon MJ, Lan SY, Calza RE, Reeves R, 1982, **Sodium butyrate stimulates DNA repair in UV-irradiated normal and Xeroderma Pigmentosum human fibroblasts**, The Journal of Biological Chemistry, 257: 13441-13447
- Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, *et al.*, 2000, **p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes**, Molecular and Cellular Biology, 20:3705-3714
- Sogame N, Kim M, Abrams JM, 2003, ***Drosophila* p53 preserves genomic stability by regulating cell death**, PNAS, 100:4696:4701
- Strahl BD y Allis CD, 2000, **The language of covalent histone modifications**, Nature, 403:41-45
- (Editado por) Sullivan W, Ashburner M y Hawley RS, 2000, ***Drosophila* protocols**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp 111-117

- Wang Q-e, Zhu Q, Wani MA, Chen J, Wani AA, 2003, **Tumor supressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage**, DNA repair, 2:483-499
- Xiao T, Hall H, Kizer KO, Hall MC, Borchers CH y Strahl BD, 2003, **Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast**, Genes and Development, 17: 654:663
- Zar JH, 1984, **Biostatistical Analysis**, 2da Ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp 40-77
- Zhang Y y Reinberg D, 2001, **Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails**, Genes and Development, 15:2343-2360
- Zhu Q, Wani MA, El-mahdy M, Wani AA, 2000, **Decreased DNA repair efficiency by loss or disruption of p53 function preferentially affects removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and slow repair sites in transcribed strand**, The Journal of Biological Chemistry, 275:11492-11497