



**CONTROL DE LA PROCESIVIDAD DE LA RESECCIÓN DEL ADN POR
LAS PROTEÍNAS CtIP, BRCA1 Y LAS TOPOISOMERASAS DE TIPO II.**

Tesis Doctoral

Universidad de Sevilla

2016

Autor

Andrés Cruz García

Director

Dr. Pablo Huertas Sánchez

Tutor

Dr. Ralf Wellinger



**CONTROL DE LA PROCESIVIDAD DE LA RESECCIÓN DEL
ADN POR LAS PROTEÍNAS CtIP, BRCA1 Y LAS
TOPOISOMERASAS DE TIPO II.**

Trabajo realizado en el Departamento de Biología Molecular, CABIMER, y
en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de
Sevilla, para optar al grado de Doctor en Genética Molecular y
Biomedicina, por el Licenciado Andrés Cruz García.

Sevilla, octubre 2016

El Doctorando

Andrés Cruz García

El Tutor

Dr. Ralf Wellinger

El director de Tesis

Dr. Pablo Huertas Sánchez

Agradecimientos

Se cumple una meta más que me he propuesto pero, este logro lejos de ser mío, es el conjunto de la participación de varias personas e instituciones, aprovecharé este espacio para expresarles mi gratitud.

Un profundo agradecimiento al Dr. Pablo Huertas Sánchez, por la confianza al recibirme en su laboratorio, por el apoyo, la paciencia y la guía brindada durante el desarrollo de este trabajo.

Al gobierno de México, en concreto al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la oportunidad de realizarme en el extranjero, sin su financiación hubiese sido imposible realizar este doctorado.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, por su apoyo, sus acertadas observaciones, gran disposición y todos los gratos momentos compartidos tanto dentro como fuera del mismo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Sonia Barroso y al Dr. Andrés Aguilera, por permitirme “*colaborar*” con sus equipos y conocimientos, sin tu ayuda Sonia esto jamás hubiese sido posible.

A mi familia en Sevilla, los guiris (italianos, peruano, portuguesa y costarricense) y sobre todo a mi gueto mexicano, que me dieron su apoyo, y cariño incondicional, que me han hecho sentirme como en casa.

Finalmente, a mi familia, aunque estuvieran lejos, por su amor e infinita paciencia, por el apoyo y la motivación brindada en todas las ocasiones que no veía salida, por acompañarme en este duro camino, por compartir este logro y hacerme sentir inquebrantable ante las adversidades.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
I. La respuesta al daño en el ADN.....	17
II. Reparación de cortes de doble cadena (DSBs).....	20
a. Reparación por unión de extremos no homólogos vía clásica (NHEJ).	21
b. Reparación por unión de extremos no homólogos vía alternativa (alt-NHEJ).	23
c. Reparación por recombinación homóloga (HR).	24
i. La resección.....	27
ii. Proteínas clave en la resección.	29
iii. Los pasos clave y factores fundamentales en la resección.	30
a. Iniciación por MRN y CtIP.	30
b. Extensión de la resección por EXO1 y DNA2.	31
c. Regulación de la resección.	32
iv. Invasión en HR.	35
v. Migración de la estructura de Holliday (HJ).....	37
vi. Resolución en la HR.	37
d. Reparación por alineamiento de cadena sencilla (<i>Single Strand Annealing, SSA</i>).38	
III. La proteína CtIP (<i>CtBP Interacting Protein</i>).	39
a. Principales funciones de CtIP.....	41
i. Correpresor transcripcional.	41
ii. CtIP promueve la transición G1/S.	42
iii. Participación en el <i>checkpoint</i> de G2/M.	44
iv. CtIP y replicación del ADN.....	44
b. Regulación de CtIP.	46
c. Enfermedades relacionadas con CtIP.	48
IV. Aspectos generales de la proteína BRCA1 (<i>Breast Cancer 1</i>).	50
a. Los dominios de BRCA1.....	50
b. Diversos complejos de BRCA1.....	52
i. Complejo BRCA1-A.	53
ii. Complejo BRCA1-B.....	54

iii. Complejo BRCA1-C.....	54
iv. Otros complejos de BRCA1.....	56
V. Topoisomerasas de ADN y la reparación de cortes de doble cadena.....	57
a. Estructura de las topoisomerasas tipo II.....	59
b. Ciclo catalítico de las topoisomerasas tipo II.....	61
c. Inhibición de la actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II con agentes anticancerígenos.....	65
d. Uso clínico de la inhibición de las topoisomerasas tipo II.....	67
e. Regulación de las topoisomerasas tipo II.....	67
f. CtIP y topoisomerasas.....	69
OBJETIVOS	71
RESULTADOS.....	75
CAPITULO I:.....	77
REGULACIÓN DE LA VELOCIDAD DE RESECCIÓN POR EL COMPLEJO CtIP-BRCA1.....	77
I. Caracterización de clones estables que expresan variantes de CtIP en el sitio de interacción con BRCA1.....	79
II. Los mutantes de CtIP en la serina 327 modifican la interacción con BRCA1.....	80
III. Respuesta del complejo CtIP-BRCA1 frente a roturas de doble cadena.....	83
IV. El complejo CtIP-BRCA1 y el procesamiento del ADN.....	85
V. El complejo CtIP-BRCA1 y la activación del checkpoint de ATR.....	89
VI. Las discrepancias en los resultados no se deben por la competencia de 53BP1-RIF1 con el complejo CtIP-BRCA1.....	92
VII. <i>Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART)</i>	94
VIII. La resección de ADN es más lenta en el mutante GFP-CtIP-S327A.....	104
CAPITULO II:.....	107
IMPLICACIÓN DE LAS TOPOISOMERASAS TIPO II EN LA RESECCIÓN DEL ADN.....	107
I. Topoisomerasas tipo II y el procesamiento del ADN.....	109
II. Las topoisomerasas tipo II están involucradas en la resección de ADN.....	112
III. La actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II facilita la resección del ADN.	115
IV. El complejo CtIP-BRCA1 y el papel de la topoisomerasa tipo II en la resección de ADN.	119
V. Topoisomerasa II alfa es reclutada al sitio de corte de doble cadena.....	123

VI.	La resección de ADN facilitada por las topoisomerasas tipo II no depende de la función estructural de RAD50.	127
VII.	Vías de reparación afectadas por la topoisomerasa tipo II.	128
I.	<i>SMART</i> , nueva técnica para el análisis de la resección.	135
II.	El papel sutil en resección de la interacción entre CtIP y BRCA1	140
III.	El complejo CtIP y BRCA1 en el procesamiento de extremos bloqueados en su extremo 5'	143
IV.	Las topoisomerasas tipo II en la resección.	145
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	157
	Técnicas de cultivo celular	159
A.	Líneas Celulares y métodos de cultivo.....	159
B.	Crio conservación y descongelación de células.....	162
C.	Transfecciones	162
a.	FuGENE.....	162
b.	Fosfato de Calcio	163
D.	Producción y Transducción viral	163
a.	Para silenciamiento génico.	163
b.	Para expresión de la BFP-ISceI.	164
E.	Citometría de flujo.	165
a.	Análisis del Ciclo Celular.....	165
b.	Titulación de la producción lentiviral.....	165
c.	Análisis de proteínas fluorescentes y vías de reparación in vivo por FACs	166
d.	Descripción de los Sistemas de Reparación in vivo	167
a.	DR-GFP.....	167
b.	SA-GFP	167
c.	EJ5.....	168
F.	Ensayos de supervivencia celular (Clonogénicos)	169
	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	169
A.	Manipulación del ADN	169
	Amplificación de ADN plasmídico.....	169
	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	170
	Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	170

Contenido

B.	Análisis del ARN	171
	Extracción de ARN	171
	Cuantificación de ARN total.....	171
	Síntesis de ADN complementario.....	171
	PCR Cuantitativa	171
C.	Análisis de proteínas.....	172
a.	Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	172
	Extracción de proteínas en condiciones nativas	172
	Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop.....	172
	Cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford.....	173
	Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	173
	Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	173
	Inmunodetección de proteínas (western blot)	174
	Inmunoprecipitación (IP) de proteínas con GFP TRAP	174
D.	Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART).....	176
E.	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en línea U2OS AsiSI-ER (DIVA).....	178
a.	Cultivo y extracción de la cromatina.....	178
b.	Inmunoprecipitación	179
	Microscopía.....	181
a.	Inmunofluorescencia de RPA y γ H2AX.....	181
b.	Inmunofluorescencia para 53BP1 y γ H2AX.....	183
c.	Inmunofluorescencia para RIF1	183
d.	Microscopía para SMART.....	183
	Análisis Estadístico	184
	REFERENCIAS	185
	PUBLICACIONES	199

Contenido de figuras

Figura I1. Tipo de lesiones en el ADN.....	16
Figura I2. Respuesta al daño en el ADN (DDR).....	19
Figura I3. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	22
Figura I4. Reparación por recombinación homóloga.....	25
Figura I5. Resección del ADN.....	28
Figura I6. Regulación de la resección del ADN.....	34
Figura I7. Proteína CtIP.....	40
Figura I8. Principales funciones de CtIP.....	43
Figura I9. Proteína BRCA1 y sus funciones.....	52
Figura I10. Tipos de topoisomerasas de ADN.....	59
Figura I11. Estructura de las topoisomerasas tipo II.....	60
Figura I12. Ciclo catalítico de las topoisomerasas tipo II.....	63
Figura I13. Inhibidores de las topoisomerasas tipo II.....	66
Figura R1. Niveles de expresión de los derivados de GFP-CtIP.....	80
Figura R2. Mutantes de CtIP que modifican la interacción con BRCA1.....	82
Figura R3. Ensayo de viabilidad de células mutantes de CtIP expuestas a agentes genotóxicos.....	84
Figura R4. Ensayo clonogénico de células silenciadas de BRCA1 frente a agentes genotóxicos.....	85
Figura R5. Papel del complejo CtIP-BRCA1 en el procesamiento de los cortes en el ADN...	86
Figura R6. Detección de la forma fosforilada de RPA32.....	88
Figura R7. Análisis de la activación del checkpoint de ATR en mutantes de CtIP.....	90
Figura R8. Análisis de la activación del <i>checkpoint</i> de ATR en ausencia de BRCA1.....	91
Figura R9. Análisis del antagonismo de los complejos CtIP-BRCA1 y 53BP1-RIF1.....	93
Figura R10. Representación esquemática de la limitación del uso de focos de RPA como indicativo de la resección de ADN.....	95

Contenido

Figura R11. <i>Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART)</i>	97
Figura R12. <i>SMART</i> como técnica para medir resección de ADN.....	98
Figura R13. Respuesta del <i>SMART</i> a diferentes tiempos después de daño en el ADN.....	100
Figura R14. Validación de la técnica de <i>SMART</i>	102
Figura R15. La resección de ADN es más lenta en el mutante GFP-CtIP-S327A.....	105
Figura R16. La actividad de la topoisomerasa tipo II y el procesamiento del ADN.....	110
Figura R17. La topoisomerasa II está implicada en la resección de ADN.....	113
Figura R18. La pérdida de ambas isoformas de la topoisomerasa II, tiene un impacto en la resección de ADN.....	116
Figura R19. El reclutamiento de RPA se ve afectado por la pérdida de la actividad catalítica de la topoisomerasa tipo II.....	118
Figura R20. El complejo CtIP-BRCA1 y el papel de la topoisomerasa II en la resección de ADN.....	121
Figura R21. La ausencia de BRCA1 disminuye los focos de RPA en presencia de inhibidores de topoisomerasa II.....	124
Figura R22. La topoisomerasa II alfa es reclutada a sitios de corte de doble cadena en una manera dependiente de daño.....	126
Figura R23. RAD50 no está implicado en el mecanismo por el cual las topoisomerasa II se involucran en resección de ADN.....	127
Figura R24. Vías de reparación afectadas por la topoisomerasa II.....	131
Figura D1. El papel sutil de la interacción entre CtIP y BRCA1 en resección.....	143
Figura M1. Representación gráfica de los Sistemas de Reparación in vivo.....	168

Contenido de Tablas

Tabla I1. Daños en el ADN por factores exógenos.....	14
Tabla I2. Enfermedades asociadas a mutaciones en genes involucrados en la detección y reparación del ADN.....	15

Tabla M1. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.....	160
Tabla M2. shARN utilizados en esta tesis.....	164
Tabla M3. Plásmidos utilizados en esta tesis.....	170
Tabla M4. Oligonucleótidos para qPCR utilizados en esta tesis.....	172
Tabla M5. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.....	175
Tabla M6. Anticuerpos Secundarios usados en esta tesis.....	176
Tabla M7. Oligonucleotidos usados en CHIP en esta tesis.....	181
Tabla M8. Agentes y drogas utilizados en esta tesis.....	182

INTRODUCCIÓN

El ADN o ácido desoxirribonucleico, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas necesarias para el desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos. La molécula de ADN está constituida por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Ya que el papel principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de dicha información, una duplicación fiel del genoma y su propagación son esenciales para garantizar la viabilidad celular y el correcto desarrollo del organismo. El enorme tamaño de las moléculas de ADN que comprenden los cromosomas en los eucariontes superiores incrementa la susceptibilidad a daños mecánicos y alteraciones químicas (Mladenov, Magin et al. 2016); de hecho, los diferentes procesos celulares pueden convertirse en una amenaza para la integridad de los genomas, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la replicación, la transcripción o la reparación del ADN (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). Además, la exposición de las células a diferentes agentes externos, tales como la radiación ionizante, ultravioleta (UV), mutágenos químicos u otros genotóxicos provoca alteraciones en el ADN; algunos ejemplos de los daños ocasionados por agentes externos se enlistan en la tabla I1. Aun así, cierta inestabilidad del genoma es necesaria para la generación de variabilidad genética y la evolución, pero es también una característica del envejecimiento, la tumorigénesis y enfermedades genéticas, que pueden estar acompañadas o no con un aumento de la propensión al cáncer.

Las lesiones del ADN generadas por los factores mencionados anteriormente incluyen desemparejamiento de bases, entrecruzamientos inter e intra-cadenas, aductos en el ADN, roturas de una sola cadena del ADN (SSB, del inglés *Single Strand Breaks*) y roturas de doble cadena (DSB, *Double Strand Breaks*, por sus siglas en inglés), que pueden traducirse en mutaciones, inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *Chromosome Instability*), grandes reordenamientos cromosómicos (GCR, *Gross Chromosomal Rearrangements*), hiper-recombinación y la pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss Of Heterozygosity*)(Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). Como se esquematiza en la figura I1, dependiendo de la naturaleza de los daños, estos pueden ser reparados por diferentes vías, las cuales están altamente reguladas favoreciendo una óptima reparación de los

mismos, previniendo alteraciones en la estructura y secuencia del ADN durante los procesos de desarrollo celular. Los fallos en esas vías de reparación son también una causa importante de inestabilidad del genoma y como consecuencia, surgen muchas enfermedades humanas por el consiguiente deterioro de la reparación del ADN (Ciccia and Elledge 2010). En la tabla 12 se presentan algunas enfermedades humanas relacionadas con mutaciones en genes involucrados en la detección y reparación del ADN.

Daños en el ADN por factores exógenos		
Fuente de daño	Tipo de lesión generada	Número estimado de lesiones por célula
Picos de horas de luz	Dímeros de pirimidinas, fosfoproductos	100.000 al día
Humo de cigarrillos	Aductos aromáticos de ADN	45-1029
Radiografía de pecho	DSBs*	0.0008 ⁽¹⁾
Radiografía dental	DSBs	0.0002 ⁽²⁾
Mamografía	DSBs	0.016 ⁽²⁾
Tomografía computarizada de cuerpo	DSBs	0.028 ⁽²⁾
Tomografía computarizada de cabeza	DSBs	0.08 ⁽²⁾
Angioplastia coronaria	DSBs	0.88 ⁽²⁾
PET scan (F18)	DSBs	0.4 ⁽²⁾
Tratamiento con Iodo 131	DSBs	2.8-6
Radioterapia	DSBs	72-80 ⁽³⁾
Viaje en avión	DSBs	0.0002/Hr
Misión espacial (60 días)	DSBs	2
Accidente de Chernóbil	DSBs	12
Bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki	DSBs	0.2-160

(1) Aductos de ADN detectados en pulmones de fumadores de entre 1-2 paquetes de cigarrillos al día durante aproximadamente 40 años

(2) Dosis efectiva recibida por la totalidad del cuerpo, absorbida por un tejido específico sería más alta.

(3) Dosis típica administrada por día en el tratamiento de cáncer.

*DSB (*Double Strand Breaks*), roturas de doble cadena.

Tabla 11. Daños en el ADN por factores exógenos. Clasificación de las fuentes de daño según su origen, los tipos de lesiones generadas y estimación del número de lesiones. Tabla modificada de (Hartlerode and Scully 2009)

Enfermedades asociadas a mutaciones en genes involucrados en detección y reparación del ADN	
Enfermedad o síndrome	Genes involucrados
Xeroderma pigmentosa	XPA-XPG, Pol η
Síndrome de Bloom	BLM
Predisposición a cáncer y linfomas (deficiencia en la recombinación V(D)J)	KU (Ku70/Ku80)
Síndrome Lig4, inmunodeficiencia con microcefalea	Ligasa IV de ADN, XLF/Cerunnos
RS-SCID (Inmunodeficiencia severa combinada radiosensible), linfomas	Artemis
Cáncer de mama y ovario (Deficiencia en la recombinación homóloga)	BRCA1, BRCA2
Anemia de Fanconi	FANCA-FANCM, BRCA2, FANCD2 (FANCD1)
Síndrome de Lynch o HNPCC (cáncer colorectal no poliposico hereditario)	MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2
Predisposición a cáncer de mama familiar distinto BRCA1/2	CHK2, MRN, ATM, PALB2
Ataxia talangiectasia	ATM
Desorden similar a ataxia talangiectasia	MRE11
Síndrome Li-Fraumeni (sarcomas, cáncer de mama y cerebro)	P53, CHEK2
Síndrome de Nijmegen (NBS)	NBS1
Síndrome similar a NBS	RAD50
Síndrome RIDDLE (radiosensibilidad, inmunodeficiencia, distrofia y dificultades de aprendizaje)	RNF168
Retinoblastoma	RB
Síndrome de Seckel	ATR, CTIP, SCKL3

Tabla I2. Enfermedades asociadas a mutaciones en genes involucrados en la detección y reparación del ADN. Los defectos en genes implicados en las diferentes fases de la respuesta al daño conllevan a la predisposición a padecer cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otros síndromes. Tabla modificada de (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Hartlerode and Scully 2009; Jackson and Bartek 2009; Cicia and Elledge 2010).

Agentes causantes de daños en el ADN

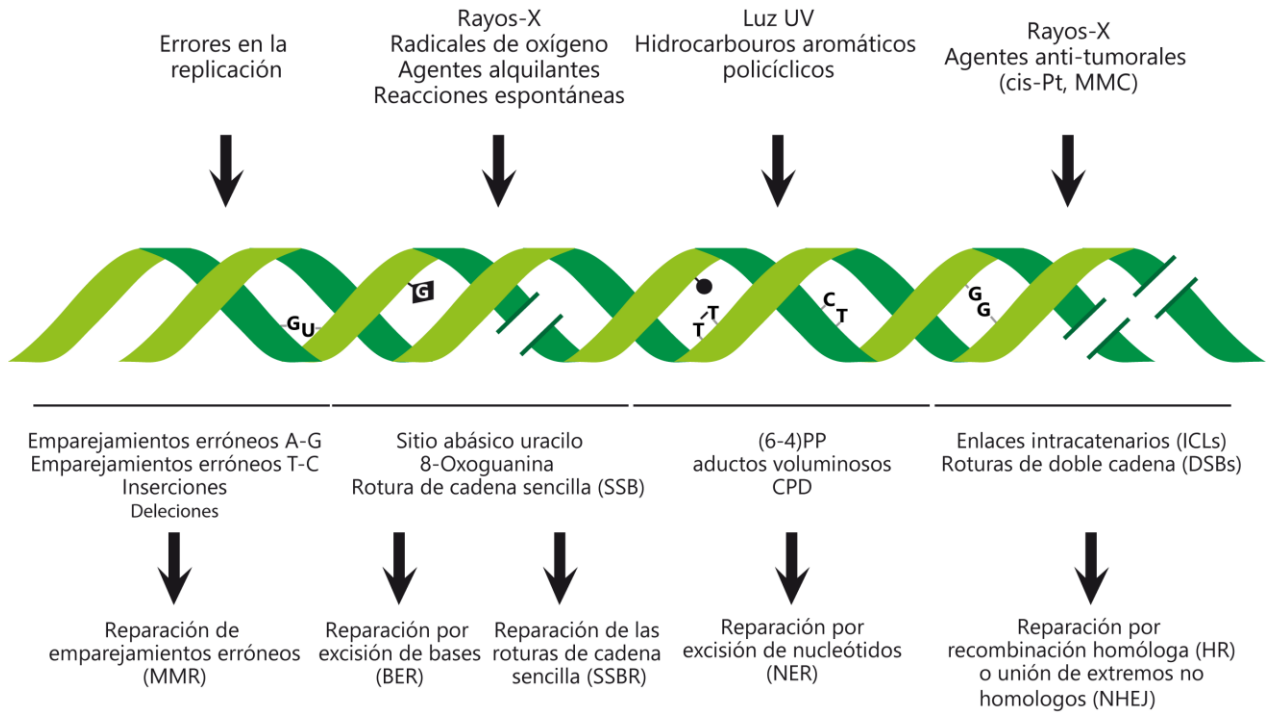


Figura 11. Tipo de lesiones en el ADN. Representación esquemática de diversos agentes que dañan el ADN, así como los tipos de lesiones que provocan. Nótese que para cada tipo de daño corresponden vías de reparación específicas. Para más detalles ver (Hoeijmakers 2001).

Las roturas de doble cadena o DSBs ocurren cuando ambas cadenas del ADN se rompen simultáneamente y son la mayor alteración que puede sufrir el mismo, pudiendo provocar la aparición de mutaciones, un aumento de la inestabilidad cromosómica o la muerte celular (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008; Hartlerode and Scully 2009). Para minimizar el efecto de estos daños, las células han desarrollado diferentes mecanismos para la detección, señalización y reparación de estas roturas. Estos procesos forman una cascada de señalización mejor conocida como respuesta al daño en el ADN o DDR (por sus siglas en inglés *DNA Damage Response*). Los mecanismos implicados varían en función del tipo de daño así como de la fase del ciclo celular donde éstas se produzcan (Lavin and Kozlov 2007; Cimprich and Cortez 2008; Hartlerode and Scully 2009; Ciccia and Elledge 2010; Huertas 2010).

En esta tesis nos enfocamos en la regulación de la reparación de cortes de doble cadena, desde un punto de vista de la recombinación homóloga, concretamente exploramos procesos que controlan la procesividad de la resección del ADN (ver más abajo), relacionados con las funciones de la proteína humana CtIP (*CtBP Interacting Protein*). Esta introducción abarca los aspectos más importantes sobre la reparación por cortes de doble cadena, la resección y el papel de CtIP en conjunto a su asociación con BRCA1 (*Breast Cancer 1*), un importante supresor de tumores. Así como también algunos aspectos generales sobre la topología del ADN y las topoisomerasas de tipo II, ya que nuestros resultados arrojan datos interesantes sobre la participación de estas proteínas en la resección del ADN.

I. La respuesta al daño en el ADN.

La respuesta al daño en el ADN o DDR esquematizado en la figura I2, se puede dividir en tres etapas principales: la detección del DSB por proteínas sensoras, el reclutamiento al sitio de lesión de proteínas transductoras, que van a amplificar y diversificar la señal y, por último, el reclutamiento de las proteínas mediadoras o efectoras que regulan diversos aspectos de la función celular, incluyendo la reparación del ADN (Jackson 2002; Ting and Lee 2004). La DDR está iniciada principalmente por proteínas que pertenecen a la familia de quinasas PIKKs (*Phosphatidylinositol 3-kinase-like protein*, por sus siglas en inglés), como ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*, por sus siglas en inglés), ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*, por sus siglas en inglés) y DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*, por sus siglas en inglés) (Ciccina and Elledge 2010). ATM y DNA-PK son activadas por ADN roto, como el producido por la radiación ionizante. ATR por su parte, responde principalmente frente al estrés replicativo y a la presencia de ADN de cadena sencilla (ADNcs). Como consecuencia de la señalización se desencadena un proceso de detención del ciclo celular, denominado punto de control o *checkpoint*, que puede inducir un retraso transitorio en las fases G1 y G2, un arresto en la entrada a la fase S o evitar la entrada a la fase M, impidiendo así la replicación y segregación del ADN dañado y por

tanto, la segregación de ese ADN defectuoso (Ciccia and Elledge 2010; Mladenov, Magin et al. 2016).

El *checkpoint* de las roturas en el ADN se puede activar de dos modos diferentes, como se detalla en la figura 12. Brevemente, por un lado, los cortes de doble cadena pueden ser detectados por la proteína ATM que va a fosforilar en último término a la quinasa CHK2. Esta ruta actúa a todo lo largo del ciclo celular (Lavin and Kozlov 2007). Sin embargo, en las fases S y G2, pero no en la fase G1, el ADN roto puede ser procesado, es decir, se puede producir la degradación de una de las cadenas para formar ADNcs (Huertas 2010). Este proceso, llamado resección, permite la activación de ATR, una proteína homóloga a ATM, que va a fosforilar a la quinasa CHK1 (Cimprich and Cortez 2008), análoga a CHK2. Entonces, de manera general, CHK2 se activa por la presencia de DSB mientras que CHK1 lo hace por presencia de ADNcs, producto tanto de problemas durante la replicación como de la resección durante la recombinación homóloga (HR, del inglés *Homologous Recombination*). Así, tanto la activación de CHK2 por ATM como de CHK1 por ATR van a servir para coordinar el metabolismo celular con la reparación de la lesión, incluyendo la parada del ciclo celular y la acumulación a nivel local de múltiples proteínas que van a ser necesarias para la señalización y la reparación del corte en el ADN (Lavin and Kozlov 2007; You, Shi et al. 2009). Esta acumulación es detectable al microscopio debido al acopio de proteínas en los sitios donde el ADN está roto, llamados generalmente “focos” y cuando son inducidos por radiación ionizante, focos inducidos por radiación ionizante, IRIF (*Ionizing Radiation Induced Foci*, por sus siglas en inglés). Uno de los IRIF ampliamente usado en el campo del estudio de la reparación del ADN, son los focos de la histona H2AX fosforilada en la serina 139 (p-S139), mejor conocida como γ H2AX. Esta modificación postraduccional es el principal marcador de daño en el ADN, específicamente para la presencia de cortes de doble cadena. Se han hecho observaciones que muestran una redundancia funcional entre ATM, ATR y DNA-PKcs para realizar esta fosforilación de H2AX en respuesta al daño (Stiff, O'Driscoll et al. 2004). Así mismo, se ha visto que el complejo MRN en conjunto con MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*, por sus siglas en inglés) y γ H2AX, reclutan ATM, facilitando la expansión de la señalización

debido a la creación de más γ H2AX, llegando hasta 2 mega bases desde el sitio de daño (Jackson 2002; Ciccia and Elledge 2010).

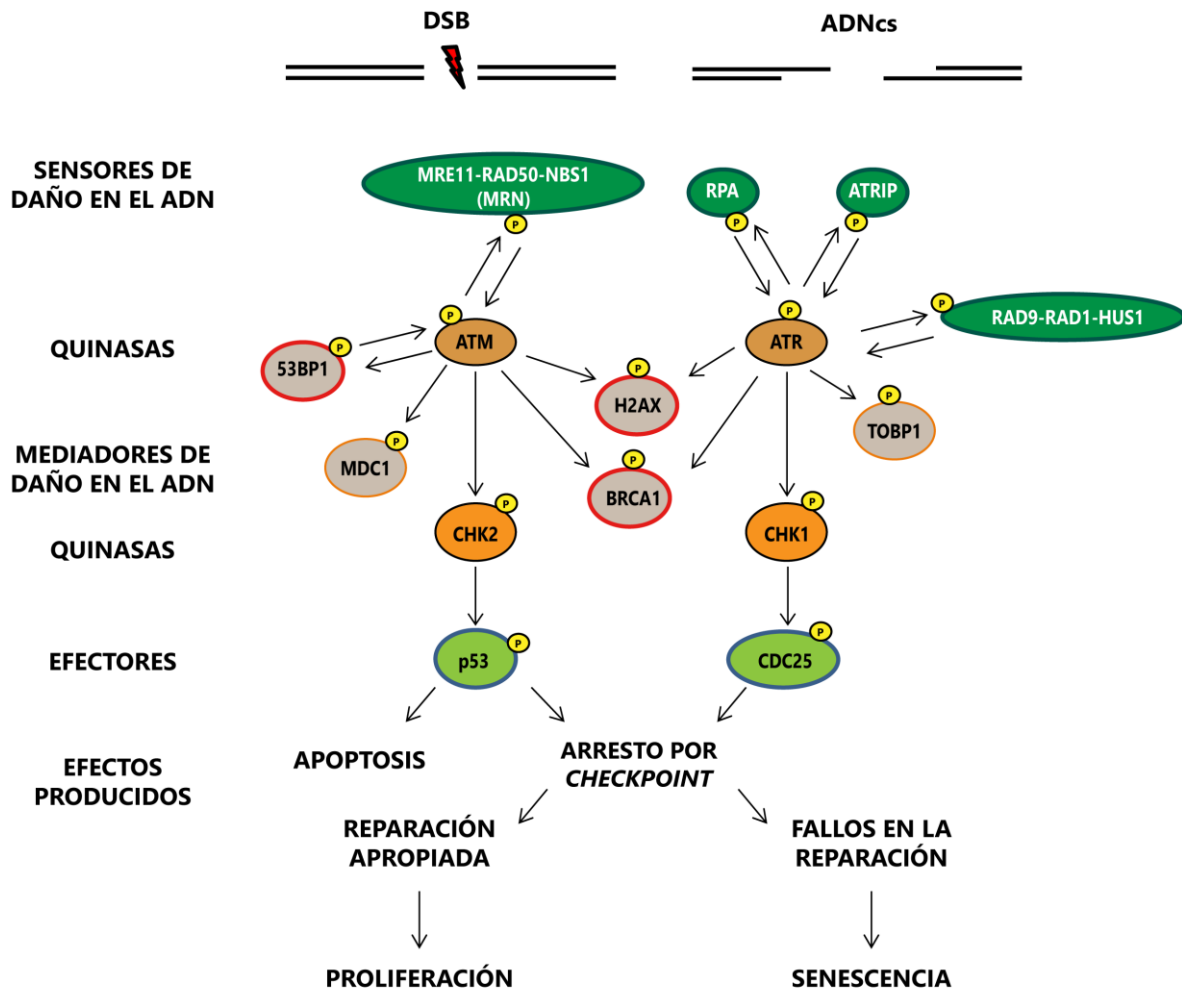


Figura 12. Respuesta al daño en el ADN (DDR). Tras la inducción de una rotura de cadena sencilla o doble cadena (SSB o DSB), una serie de proteínas se encargan de sensor el daño ocasionado. El DDR se compone de dos proteínas sensoras principales, el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) que detecta los DSBs; y la proteína de replicación A (RPA) junto al complejo 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) que detectan regiones expuestas de ADNcs. Estos sensores reclutan, respectivamente, a las quinasas ataxia talangiectasia mutada (ATM) y ataxia talangiectasia relacionada con Rad3 (ATR) unida a la proteína de interacción con ATR (ATRIP). De esta manera, ATM es predominantemente activada por los DSBs mientras que ATR responde a estrés genotóxico como el estrés replicativo o incluso casado por algunos oncogenes. γ H2AX es requerido para reclutar a MDC1, que se encarga de amplificar la señal del daño, lo que conlleva a una acumulación de más complejo MRN y activación de ATM. BRCA1 es entonces reclutado al sitio de daño por acción de fosforilaciones de

ATM y ATR. 53BP1 (proteína de unión a p53) está muy involucrada en el mantenimiento de la señalización del DDR, al promover la activación de ATM. Eventualmente la señalización del DDR se extiende lejos del sitio dañado debido a la participación de las quinasas CHK2 (fosforilada por ATM) y CHK1 (fosforilada por ATR), así la señal converge en los efectores tales como p53 y CDC25 (*cell division cell cycle 25, por sus siglas en inglés*). Como resultado, la actividad de la CDK es inhibida y la progresión del ciclo celular se retardada en las fases G1 a S (*checkpoint G1/S*) o en la fase G2 a M (*checkpoint G2/M*) para facilitar la reparación del ADN lesionado. El resultado final de la cascada conlleva a procesos celulares como la muerte celular programada (apoptosis), arrestos en fases del ciclo celular, reparación del daño en el ADN y la reanudación de la proliferación o la senescencia celular causada por un daño persistente sin ser propiamente reparado. Imagen modificada de Sulli G., et al. Nature Reviews Cancer. 2012

II. Reparación de cortes de doble cadena (DSBs).

En lo relativo a la reparación de los cortes de doble cadena las células poseen al menos tres vías para repararlos, la recombinación homóloga (HR), la unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end joining, NHEJ*) y la unión de extremos no homólogos vía alternativa (*alt-NHEJ*). Sin embargo, los dos mecanismos principales y alternativos de reparación de los DSBs son NHEJ y HR. El primero consiste en la ligación de dos fragmentos de ADN adyacentes y no posee ninguna actividad que garantice la fidelidad de la reparación (Lieber 2008). Por el contrario, la recombinación homóloga utiliza una secuencia homóloga, preferentemente la cromátida hermana, como molde para reparar los daños sin producir mutaciones (San Filippo, Sung et al. 2008; Ciccio and Elledge 2010).

La elección del mecanismo de reparación (NHEJ frente a HR), al igual que la del mecanismo de *checkpoint* (ATM frente a ATR) que se va a llevar a cabo viene determinada por la resección (Huertas 2010). Así, los DSBs que no se reseccionan activan exclusivamente a ATM y son reparados por NHEJ. Sin embargo, cuando un corte en el ADN se resecciona, ocurre una transición desde el *checkpoint* de ATM al de ATR, inhibiéndose la NHEJ y activando la ruta de HR. Como la resección sólo tiene lugar en las fases S y G2 ni la HR ni la activación de ATR por un corte de doble cadena ocurren en G0 o G1, mientras

que en las fases S y G2 coexisten los *checkpoints* de ATM y ATR, así como la reparación por NHEJ o HR (Ciccia and Elledge 2010).

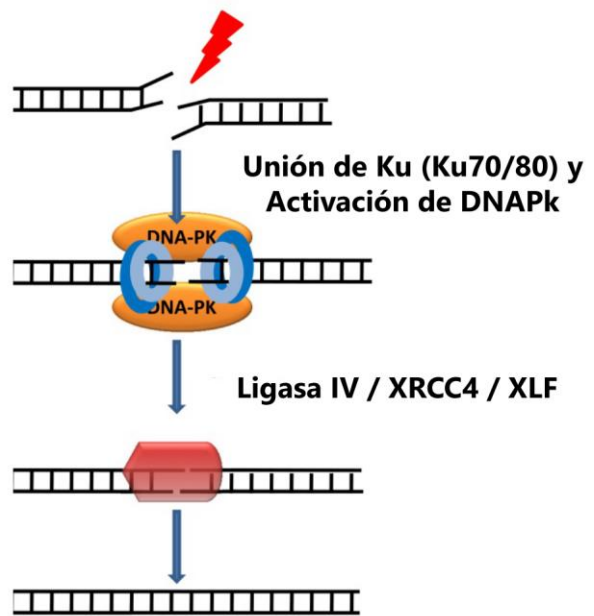
a. Reparación por unión de extremos no homólogos vía clásica (NHEJ).

Este tipo representa la ruta de reparación más común de los DSB en eucariontes superiores. Permite la unión de cadenas por sus extremos, no requiere de una secuencia complementaria u homóloga para su unión y es llevada a cabo con poco o nulo procesamiento del ADN. NHEJ es el único proceso activo para reparar cortes de doble cadena en las fases G0 y G1 del ciclo celular, y es también el mayoritario durante las fases S y G2 (Pardo, Gomez-Gonzalez et al. 2009; Ciccia and Elledge 2010). Brevemente (Figura I-3), el sitio de corte es reconocido por Ku, un complejo con forma de anillo compuesto de dos proteínas KU70 y KU80, que protegen el ADN de la acción de exonucleasas y mantienen unidas las cadenas (Feldmann, Schmiemann et al. 2000; Walker, Corpina et al. 2001). Se ha visto que este complejo se une al DSB a los pocos segundos de haber ocurrido la rotura (Blier, Griffith et al. 1993). Posteriormente, el heterodímero Ku unido a ADN recluta al sitio de daño a la quinasa DNA-PKcs. El complejo formado por Ku-DNA-PKcs estimula la actividad quinasa serina/treonina de esta última, orquestando así la reparación por NHEJ mediante la fosforilación de diversas proteínas (Downs and Jackson 2004; Chiruvella, Liang et al. 2013). Además, se produce un desplazamiento del complejo Ku hacia el interior de la cadena de ADN, permitiendo que dos moléculas de DNA-PKcs interactúen, estabilizando los extremos del ADN roto, previniendo la resección y así la recombinación homóloga (Smith and Jackson 1999; Yoo and Dynan 1999). Finalmente y para completar la reparación, se procede a la ligación de los extremos, paso llevado a cabo por el complejo X4-L4 compuesto por XRCC4, la ligasa IV (enzima que une extremos de ADN) y el factor estimulante XLF/Cernunnos (Grawunder, Wilm et al. 1997), siendo la actividad de la ligasa IV estimulada por XRCC4 y XLF. Se conoce que la ligasa IV en solitario tiene la capacidad de ligar tanto extremos romos como sobresalientes compatibles,

mientras que en la forma del complejo X4-L4, tiene la capacidad de ligar una cadena con un mínimo de emparejamientos de bases (Andres, Vergnes et al. 2012; Roy, Andres et al. 2012; Chiruvella, Liang et al. 2013). Además, es capaz de ligar algunos extremos de ADN incompatibles con extremos cortos sobresalientes (Grawunder, Wilm et al. 1997). Con la unión de las cadenas, se restaura la continuidad del genoma, pero no necesariamente su secuencia. En humanos esta vía es muy eficiente para reparar DSB; sin embargo, puede provocar reordenamientos cromosómicos.

Figura I3. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).

La generación de un DSB genera extremos en el ADN a los que se puede unir el heterodímero Ku. Su desplazamiento al interior de las cadenas permite el reclutamiento de DNA-PKs en los extremos del ADN roto. Las dos moléculas de DNA-PKs en cada extremo pueden interactuar formando un puente entre los extremos de DSB. Esta sinapsis de DNA-PKs, induce su autofosforilación alterando su conformación y dinámica. La fosforilación de DNA-PKs permite el reclutamiento de Artemis y de otros factores para el procesamiento de los extremos. Una vez procesados, el complejo X4-L4 junto con XLF se encargan de ligar los extremos reparando la rotura. Imagen modificada de Lopez-Contreras A. y Fernandez-Capetillo O. Signalling DNA Damage, 2012.



Es frecuente que el esqueleto azúcar-fosfato y las bases próximas a los extremos presenten alteraciones. Por ello debe darse un procesamiento previo que permita recuperar la configuración típica de extremos 3' OH y 5' fosfato necesario para llevar a cabo el proceso de ligación, actividad llevada principalmente por Artemis. Esta proteína es una metalo- β -lactamasa específica de vertebrados que posee actividad exonucleasa 5'-3' *in vitro* sin embargo, en presencia de DNA-PKs, se convierte en una endonucleasa que actúa sobre multitud de sustratos (Moshous, Callebaut et al. 2001; Ma, Pannicke et al.

2005). La actividad endonucleasa de Artemis es dependiente de la interacción con DNA-PKcs y de la actividad catalítica de esta quinasa. De hecho esta última permite su reclutamiento a los sitios de rotura (Goodarzi, Yu et al. 2006). Se ha propuesto que Artemis, a diferencia de otros componentes fundamentales del proceso de reparación por NHEJ, podría participar en la reparación de determinados tipos de DSB en los que fuese necesario modificar los extremos generados durante la rotura (Kurosawa, Koyama et al. 2008). De acuerdo con esta idea, se ha visto que su inactivación produce sensibilidad a radiación, pero no conlleva defectos importantes en la reparación de los DSB sugiriendo que solo un subconjunto de roturas es reparado de manera dependiente de Artemis (Wang et al 2005). Además, existen reportes que proponen que aproximadamente el 10% de los eventos de NHEJ dependientes de Artemis son regulados por ATM (Jeggo and Lobrich 2005). De hecho, Artemis en conjunto con las nucleasas APLF y la quinasa PNK son fosforiladas por ATM antes de la ligación del ADN (Mahaney, Meek et al. 2009).

b. Reparación por unión de extremos no homólogos vía alternativa (alt-NHEJ).

Esta ruta es también conocida como reparación por extremos dependientes de microhomología (MMEJ), se activa en ausencia de algunos factores importantes para NHEJ como Ku, XRCC4 o la ligasa IV. Funciona como un mecanismo de respaldo al NHEJ, sin embargo, esta vía de alt-NHEJ implica por lo regular pequeñas deleciones. Alt-NHEJ necesita tramos cortos de homología en el DSB (Bennardo, Cheng et al. 2008). Esta ruta es la predilecta en la recombinación V(D)J responsable de la variabilidad genética del sistema inmunitario. Se ha descrito un decaimiento en esta vía, en estudios con levaduras con ausencia del complejo MRX, sugiriendo así la implicación de este complejo en esta vía de reparación. Sin embargo, en células de mamífero se desconocen a ciencia cierta las proteínas involucradas en alt-NHEJ, aunque se ha visto una implicación de PARP1 y 2, XRCC1, LIG1, LIG3 y CtIP (Frit, Barboule et al. 2014). A diferencia del NHEJ clásico, el Alt-

NHEJ siempre requiere de un cierto procesamiento, resección, de los extremos de ADN (Truong, Li et al. 2013).

c. Reparación por recombinación homóloga (HR).

Hasta la fecha, se han descrito cuatro mecanismos de reparación que dependen de la homología de secuencia representados en la figura I4. Los cuales son, la recombinación homóloga clásica (HR clásica), el alineamiento de cadena sencilla (SSA, del inglés *Single Strand Annealing*), el alineamiento de cadena sencilla dependiente de síntesis (SDSA, del inglés *Synthesis-Dependent Strand Annealing*) y la replicación inducida por rotura (BIR, del inglés *Break-Induced Replication*). HR clásica y SDSA se han descrito como vías de reparación conservativas, mientras que tanto SSA como BIR se describen como vías de reparación mutagénicas, ya que el SSA siempre produce deleciones entre las secuencias homólogas reparadas por esta vía, mientras que el BIR conlleva pérdida de heterocigosidad. Aunque HR clásica y SDSA son vías conservativas como se menciona anteriormente, éstas no están exentas de provocar mutaciones, ya que puede ocurrir que el molde donador de información se encuentre alterado o bien utilice un molde diferente a la cromátida hermana (Hartlerode and Scully 2009; Mladenov, Magin et al. 2016).

La reparación por recombinación homóloga es una vía altamente conservada usando los mismos principios desde bacterias hasta humanos. En estas vías, los DSBs son reconocidos y procesados para generar extremos protuberantes 3' de ADNcs, proceso denominado resección de ADN o simplemente resección, evento compartido por las cuatro vías dependientes de homología (Mladenov, Magin et al. 2016).

Vías de recombinación homóloga

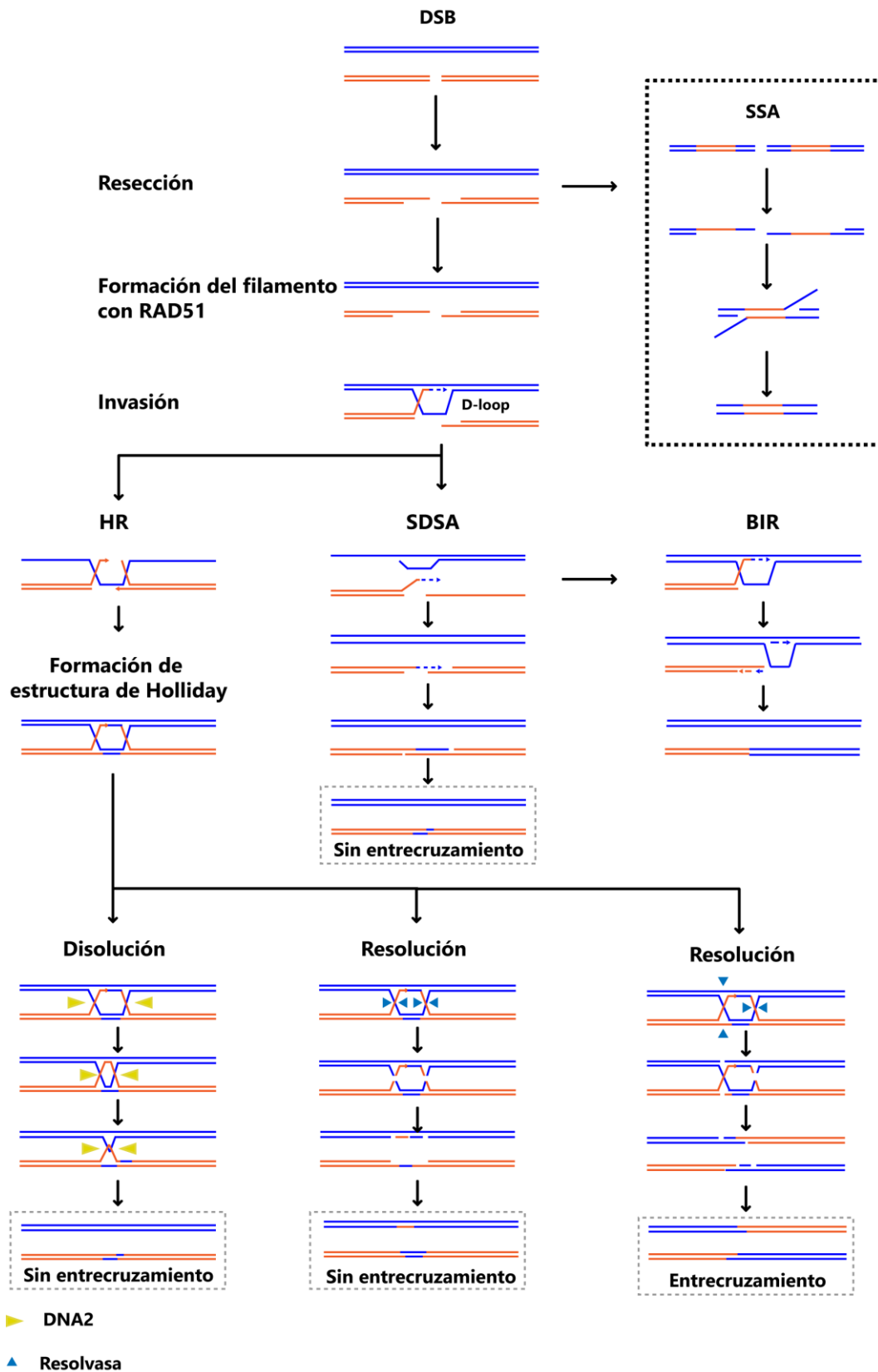


Figura 14. Reparación por recombinación homóloga. La presencia de un DBS es reconocida por el complejo MRN que mantiene los extremos de ADN unidos y participa en su procesamiento. Después CtIP, promueve la resección de ADN. La proteína RPA se une al ADNcs protegiéndolo y evitando la formación de estructuras secundarias. BRCA1 promueve la acumulación de BRCA2 y esta promueve el intercambio de RPA por RAD51, creando un filamento ADNcs-RAD51. Este filamento comienza la búsqueda de homología. A continuación, se pueden seguir diferentes alternativas para la reparación por HR. La HR clásica, SDSA (alineamiento de cadena sencilla dependiente de síntesis) y el BIR (replicación inducida por rotura). En la recombinación clásica las estructuras de Holliday formadas pueden resolverse con o sin entrecruzamiento de cadenas de ADN. El SSA (alineamiento de cadena sencilla), puede ocurrir después de la resección, se representa entre el recuadro punteado. Imagen modificada de Lee A, et al. 2014

HR clásica, SDSA y BIR comparten además el paso de la búsqueda de homología mediada por RAD51, así como el intercambio de cadena catalizado por esta proteína (Figura 14) (Hartlerode and Scully 2009; Mladenov, Magin et al. 2016). Es entonces cuando se inicia el periodo de síntesis, usando la cadena que es invadida como molde. El destino final de esta cadena sintetizada es lo que caracteriza a cada una de estas tres vías. En la HR clásica la síntesis de ADN llega hasta el final del ADN reseccionado, generando por consecuente una estructura comúnmente conocida como estructura de Holliday (*Holliday Junction*, HJ, por sus siglas en inglés) (Hartlerode and Scully 2009; Mladenov, Magin et al. 2016). En el SDSA, las cadenas sintetizadas a ambos lados del corte son desplazadas del molde y alinean entre sí. En el BIR, la síntesis de ADN procede hasta el final del cromosoma. A diferencia de lo que ocurre en la HR clásica y el SDSA, en el BIR se requiere la síntesis de la cadena retrasada y parece ser mediado por la formación de una horquilla de replicación clásica, al menos como se ha demostrado con levaduras (Lydeard, Schulman et al. 2013). Como consecuencia, el BIR implica la copia extensiva del donador pudiendo conducir a diversas alteraciones cromosómicas, según la posición de la secuencia usada como molde, como translocaciones no recíprocas, y a otros tipos de reorganizaciones genómicas (Lydeard, Schulman et al. 2013). Aunque el BIR ha sido utilizado para explicar algunos ejemplos de inestabilidad genómica en células de mamíferos, cada vez hay más dudas acerca de la contribución real de esta ruta de reparación (Hartlerode and Scully 2009; Ciccia and Elledge 2010; Mladenov, Magin et al. 2016).

i. La resección.

Como se ha mencionado, la resección es la degradación de una de las cadenas de ADN a ambos lados del DSB común para todos los tipos de HR (Huertas 2010; Mimitou and Symington 2011; Liu and Huang 2016). La resección ocurre en una dirección 5' a 3' generando extremos 3' protuberantes, que son rápidamente cubiertos por la proteína de replicación A (RPA), un complejo heterotrimérico conformado por RPA1, RPA2 y RPA3 que estabiliza las regiones de ADNcs generadas durante la replicación o la resección del ADN (Figura I5). RPA unida a ADNcs es después remplazada por RAD51 durante la HR, excepto en el SSA. (Symington and Gautier 2011; Aparicio, Baer et al. 2014)

La estructura de ADNcs-RPA consecuencia de la unión de RPA sirve también como señal para activar a ATR, lo que coordina la reparación del ADN con otros eventos celulares (Zou and Elledge 2003). Además, la generación de ADNcs indirectamente inhibe la vía de NHEJ (Huertas 2010). Por lo tanto, la resección es considerada ser el principal evento en el DDR que dictamina no solo la elección en las vías de reparación de los cortes de doble cadena sino también el tipo de *checkpoint* que se activará (Hartlerode and Scully 2009; Mladenov, Magin et al. 2016).

Mientras que la NHEJ puede ocurrir durante todas las fases del ciclo celular, la HR ocurre principalmente en las fases S y G2, cuando las cromátidas hermanas se encuentran disponibles. Esta regulación de la HR por el ciclo celular es en parte controlada por la regulación de la resección en gran medida gobernada por la acción de las quinasas dependientes de ciclina o CDKs. La resección juega también un papel importante en el mantenimiento de los extremos 3' protuberantes en los telómeros y en la reparación de los extremos “descubiertos” al final de los cromosomas (Huertas ; Hartlerode and Scully 2009; Mladenov, Magin et al. 2016).

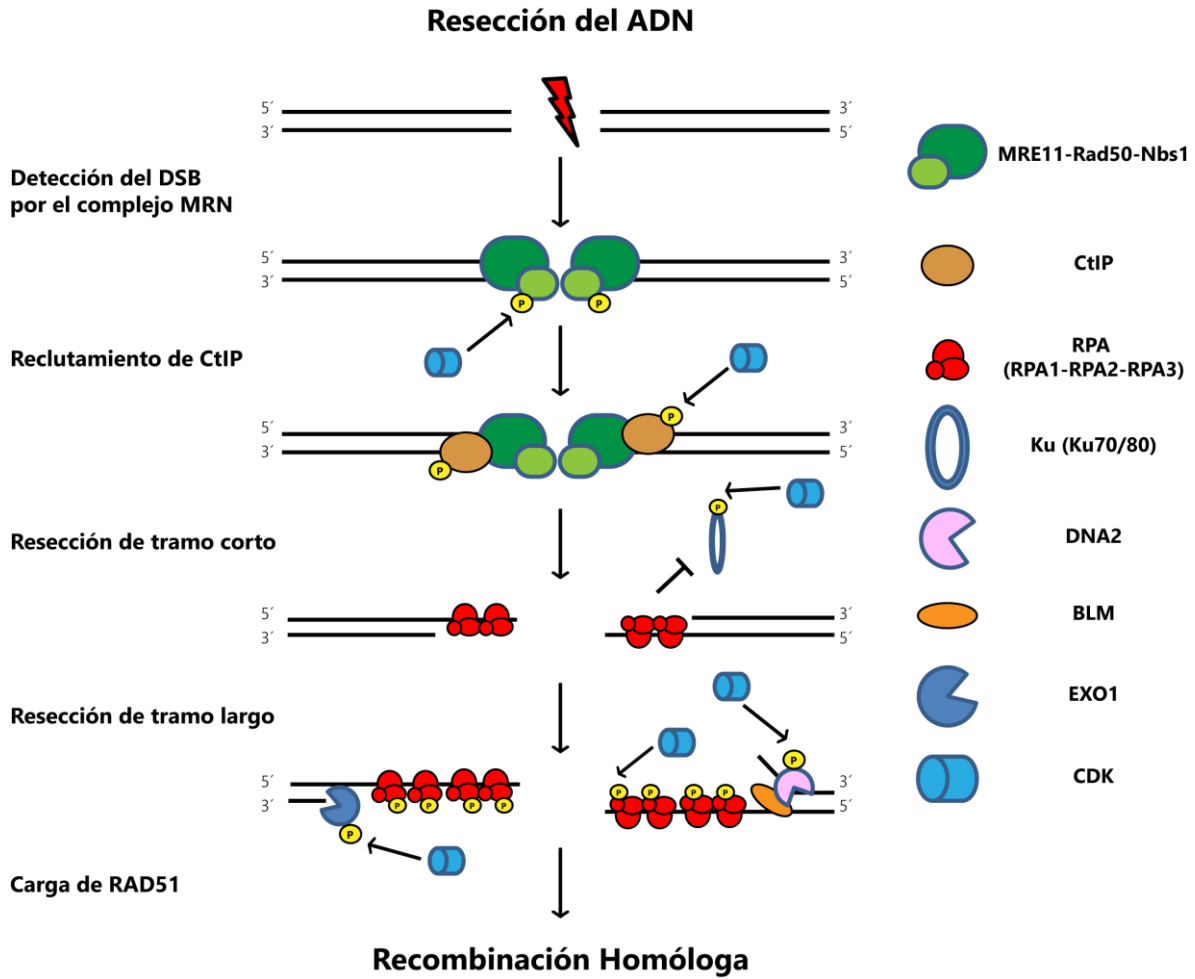


Figura 15. Resección del ADN. Como respuesta al DSB, el complejo MRN rápidamente se localiza en el sitio de daño. Durante la fase S y G2 del ciclo celular, la reparación de DSB por HR comienza con la resección del ADN, degradación nucleolítica de una de las cadenas a ambos lados del corte. CtIP es fosforilada mediante CDK y ATM y ubiquitinada por BRCA1, siendo reclutada al sitio de daño. Por lo que, la resección de tramo corto, llevada a cabo por el complejo MRN y CtIP, colaboran para la creación de tramos cortos de ADN de cadena sencilla con extremos 3' protuberantes, los cuales son rápidamente cubiertos por la proteína RPA. Es de notar que el procesamiento del ADN inhibe la unión del complejo Ku a los extremos dañados, por lo que la vía de NHEJ ya no puede llevarse a cabo. Comienza entonces la resección de tramo largo, catalizada por MRE11 y BLM en conjunto con DNA2. Subsecuentemente RPA es reemplazado por RAD51, paso crucial para la invasión y búsqueda de homología. Imagen modificada de Ferreti L, et al. 2013.

ii. Proteínas clave en la resección.

Las proteínas involucradas en la activación de la resección son MRE11, RAD50 y NBS1 que constituyen el complejo MRN (MRX (Mre11-Rad50-Xrs2, en *Saccharomyces cerevisiae*), y CtIP (Sae2/Ctp1, en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente)(Huertas 2010; Williams, Lees-Miller et al. 2010; Mimitou and Symington 2011; Symington 2016). MRE11 presenta una actividad endonucleasa en ADN de doble cadena (ADNdc) y exonucleasa en ADNdc que es dependiente de Mn^{2+} , así como también una actividad exonucleasa 3'-5' tanto en ADNcs como ADNdc (Paull and Gellert 1998). Para la actividad de MRE11 es esencial su dimerización tanto para unión al ADN como su interacción con RAD50 (Williams, Moncalian et al. 2008; Williams, Lees-Miller et al. 2010). RAD50 por su parte, contiene dominios con actividad ATPasa y adenilato quinasa, interactúa con el ADN y junto a MRE11 conforman el núcleo del complejo MRN (Williams, Lees-Miller et al. 2010). Mientras que MRE11 como RAD50 se encuentran conservados desde bacterias hasta humanos, tanto NBS1 como su homólogo en levaduras Xrs2 sólo se presentan en eucariontes (Huertas 2010). RAD50 estimula la unión al ADN y la actividad nucleasa de MRE11, facilitando así el anclaje del complejo MRN al ADN. Por su parte, NBS1 no tiene actividad enzimática, pero es reclutada a los DSBs y es esencial para la activación de ATM y, por lo tanto, del inicio del DDR. NBS1 tiene dominio de unión a fosfopéptidos denominado FHA y repeticiones BRCT, coordinando de esta manera las actividades de MRE11-RAD50 con proteínas fosforiladas en respuesta al daño en el ADN (Lloyd, Chapman et al. 2009; Williams, Dodson et al. 2009). Un interactor importante de NBS1, por medio de estos dominios es CtIP, que como hemos mencionado tiene un papel esencial en la activación de MRN y la resección del ADN (Eid, Steger et al. 2010; Makharashvili and Paull 2015).

Tanto CtIP en humanos como sus ortólogos en otros eucariontes (Sae2, Ctp1), son los principales encargados de promover la resección y son esenciales para la recombinación meiótica. (Limbo, Chahwan et al. 2007; Sartori, Lukas et al. 2007; Huertas 2010). Esto se debe a diversas interacciones con elementos del complejo MRN; como se menciona

anteriormente con NBS1, o con interacciones con MRE11 (Limbo, Chahwan et al. 2007), así como también con otras proteínas. Estas interacciones son controladas por medio de modificaciones postraduccionales en CtIP, por ejemplo, la interacción entre CtIP y MRN es facilitada por múltiples fosforilaciones dependientes de CDK en diferentes sitios de CtIP, modificaciones que a su vez facilitan las fosforilaciones dependientes de ATM y ATR en CtIP (Makharashvili and Paull 2015). En el apartado III (La proteína CtIP (*CtBP Interacting Protein*)) se profundiza sobre la participación de esta proteína en la resección.

EXO1 por su parte, es un miembro de la familia de nucleasas RAD2/XPG, la cual está comprendida por proteínas como XPG, FEN1 y GEN1 (Rass, Compton et al. 2010; Zakharyevich, Ma et al. 2010). EXO1 tiene una actividad nucleasa 5'-3' en ADNdc y endonucleasa 5'-flap, actividad nucleasa en ADNcs con extremo 5' protuberante; además, tiene participación en un gran número de procesos celulares como la replicación, recombinación, reparación del ADN, la activación del *checkpoint* y el mantenimiento de los telomeros (Zakharyevich, Ma et al. 2010).

Otras proteínas involucradas en la resección son BLM (Bloom Syndrome) y DNA2, que se encuentran implicadas en pasos tardíos de la resección (Symington 2016), para más detalle revisar el apartado sobre la extensión de la resección (apartado II.c.iii.b.).

iii. Los pasos clave y factores fundamentales en la resección.

a. Iniciación por MRN y CtIP.

Diversos estudios en levaduras, células humanas y estudios *in vitro* con proteínas purificadas sugieren que la resección del ADN después de un DSB, es iniciada por la acción concertada del complejo MRN junto a la proteína CtIP. El complejo MRN es el primer conjunto de proteínas en llegar a los sitios de daño, como se ha indicado anteriormente al describir su papel en la activación de ATM (Figura I2), cuenta con una gran afinidad por los

extremos de DSB y tiene un papel muy importante en la detección de los cortes de doble cadena en la cromatina. La subunidad NBS1 del complejo MRN se encarga de coordinar el reclutamiento de CtIP a través de la interacción directa con MRE11, CtIP y ATM (Wang, Shi et al. 2013). La actividad endonucleasa de MRE11 es la que se cree que inicia la resección, creando cortes internos en 5' y generando oligonucleótidos que serán liberados, mientras que la actividad exonucleasa produce los extremos 3' protuberantes (Paudyal and You 2016). CtIP interacciona directamente con NBS1 promoviendo la actividad nucleolítica de MRE11, en concreto promoviendo su actividad endonucleasa (Sartori, Lukas et al. 2007; You, Shi et al. 2009; Paudyal and You 2016). De esta manera MRN en conjunto con CtIP, son los encargados de la resección de tramo corto (o iniciación) donde se eliminan de 50-100 nucleótidos en los extremos de las roturas (Mimitou and Symington 2009), produciendo extremos 3' protuberantes de ADNcs que son objeto de la segunda fase de la resección, la extensión o resección de tramo largo que se describe en el siguiente apartado.

b. Extensión de la resección por EXO1 y DNA2.

Una resección limitada por MRN-CtIP puede conducir a una reparación del ADN por una vía menos común y altamente propensa a errores, como la mencionada unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), la cual involucra el alineamiento de cadenas cortas de ADNcs antes de la ligación (Huertas 2010). Mientras que la resección limitada mediada por MRX-Sae2 en levaduras, se ha mostrado como suficiente para una reparación por HR, una resección más extensa parece ser requerida para evitar la MMEJ y promover la HR en células humanas (Huertas 2010). La extensión de la resección es llevada a cabo por EXO1 y DNA2 en dos vías paralelas, que pueden llegar a producir ADNcs de varias kilobases de longitud.

La función de EXO1 en la resección está regulada positivamente por MRN, la helicasa BLM, RPA, PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, por sus siglas en inglés) y el complejo 9-1-1

(Rad9-Hus1-Rad1). Se ha descrito que CtIP promueve la llegada de EXO1 a los sitios de daño, sin embargo regula negativamente su actividad nucleasa (Paudyal and You 2016). El otro componente importante en la extensión de la resección es DNA2, una helicasa y endonucleasa, que es bien conocida por su participación en la maduración de los fragmentos de Okazaki y el procesamiento de las estructuras G-quadruplex producidas durante la replicación del ADN (Zheng, Zhou et al. 2008; Duxin, Moore et al. 2012). En la resección, DNA2 trabaja junto Sgs1 (*S. cerevisiae*) y BLM (mamíferos) (Nimonkar, Genschel et al. 2011). Aunque DNA2 es una helicasa y nucleasa, solo su actividad nucleasa es esencial para la extensión de la resección (Paudyal and You 2016). La gran fibra de ADNcs generada por acción de EXO1 o DNA2 sirve como sustrato para la HR y al mismo tiempo previene la reparación por NHEJ y MMEJ (Paudyal and You 2016).

c. Regulación de la resección.

En la fase G1 del ciclo celular los DSBs son reparados por NHEJ o MMEJ, dos vías que requieren un poco procesamiento del ADN. La resección del ADN en G1 es suprimida por la baja actividad de las CDKs y por la alta actividad de los factores de NHEJ (Chapman, Taylor et al. 2012). El heterodimero Ku70-Ku80, el principal factor de NHEJ, se une a los DSBs durante G1 promoviendo esta vía e indirectamente inhibiendo la resección (Mladenov, Magin et al. 2016). No obstante, debido a las actividades de MRN y CtIP es posible que ocurra un limitado procesamiento del ADN en G1 (Quennet, Beucher et al. 2011).

Durante las fases S y G2 del ciclo celular, los DSBs pueden ser reparados por HR que requiere una resección más extensa, y permite la unión de RAD51 formando el filamento para la búsqueda de la homología en la cromátida hermana. La longitud de la resección es el resultado de la alta actividad de CDKs, que promueven la función de los principales factores de la resección, MRN, CtIP, EXO1 y DNA2 (Ferretti, Lafranchi et al. 2013). Por ejemplo NBS1 es fosforilada por CDK en la S432 durante S, G2 y fase M, pero no en G1

(Ferretti, Lafranchi et al. 2013). MRE11 interactúa directamente con CDK2 promoviendo la fosforilación de CtIP/Sae2 por esta quinasa (Buis, Stoneham et al. 2012), fenómeno crucial para la resección durante las fases S y G2 (Huertas, Cortes-Ledesma et al. 2008; Huertas and Jackson 2009). En humanos, CtIP es fosforilado por CDK en múltiples sitios, siendo especialmente relevantes las S327 y la T847. La primera controla la unión con BRCA1 y la segunda es crucial para la resección y la HR en S y G2 (Yu and Chen 2004; Yu, Fu et al. 2006; Huertas and Jackson 2009). La fosforilación de CtIP por CDK2 promueve la resección en parte, a través del incremento en el reclutamiento de CtIP a los sitios del daño así como la interacción con MRN (Buis, Stoneham et al. 2012; Makharashvili and Paull 2015). Las CDKs regulan también la extensión de la resección por la directa fosforilación de EXO1 y DNA2, así como su reclutamiento a los sitios del corte (Ferretti, Lafranchi et al. 2013).

En los últimos años, se ha descrito un circuito antagónico entre las proteínas CtIP-BRCA1 y 53BP1-RIF1 que está en armonía con la regulación de la resección a lo largo del ciclo celular representado en la figura I6. CtIP y BRCA1 tienen una clara participación en la HR (descrito más adelante en la sección IV.b.). Las células deficientes en BRCA1 presentan letalidad sintética con el uso de inhibidores de PARP que puede ser rescatada al eliminar 53BP1 (*p53 Binding Protein*, por sus siglas en inglés), una proteína importante para la reparación por NHEJ (Bunting, Callen et al. 2010). Esto indica que la letalidad sintética depende de un incremento del NHEJ en ausencia de BRCA1, y no de la falta de recombinación homóloga. Tanto BRCA1 como 53BP1 actúan de manera antagónica para regular la resección. Durante G1, 53BP1 inhibe la resección a través del reclutamiento de RIF1 (*Rap1 Interacting Factor 1 homolog*, por sus siglas en inglés) en una manera dependiente de la fosforilación de 53BP1 por ATM (Chapman, Barral et al. 2013; Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013). BRCA1 no es capaz de ir a los sitios de DSB debido a la acción de RIF1 en conjunto con 53BP1. Así, se ha propuesto a RIF1 como un efector crítico de 53BP1 favoreciendo la NHEJ (Figura I6). La participación de RIF1 en el cambio de clase de las inmunoglobulinas viene a reforzar esta idea (Di Virgilio, Callen et al. 2013). De acuerdo con esto, se ha visto que RIF1 suprime la resección y la formación del nucleofilamento de RAD51 en células carecientes de BRCA1 (Escribano-Diaz, Orthwein et

al. 2013). La acción de RIF1 está limitada a la fase G1 ya que es mermada por acción de CtIP-BRCA1 durante las fases S/G2 del ciclo celular (Chapman, Barral et al. 2013; Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013). Además, BRCA1 recluta una E3 ubiquitín ligasa (UHRF1), al sitio de DSB, y esta ubiquitina a RIF1 para eliminarla del sitio de corte en el ADN, por lo tanto promoviendo la resección (Zhang, Liu et al. 2016).

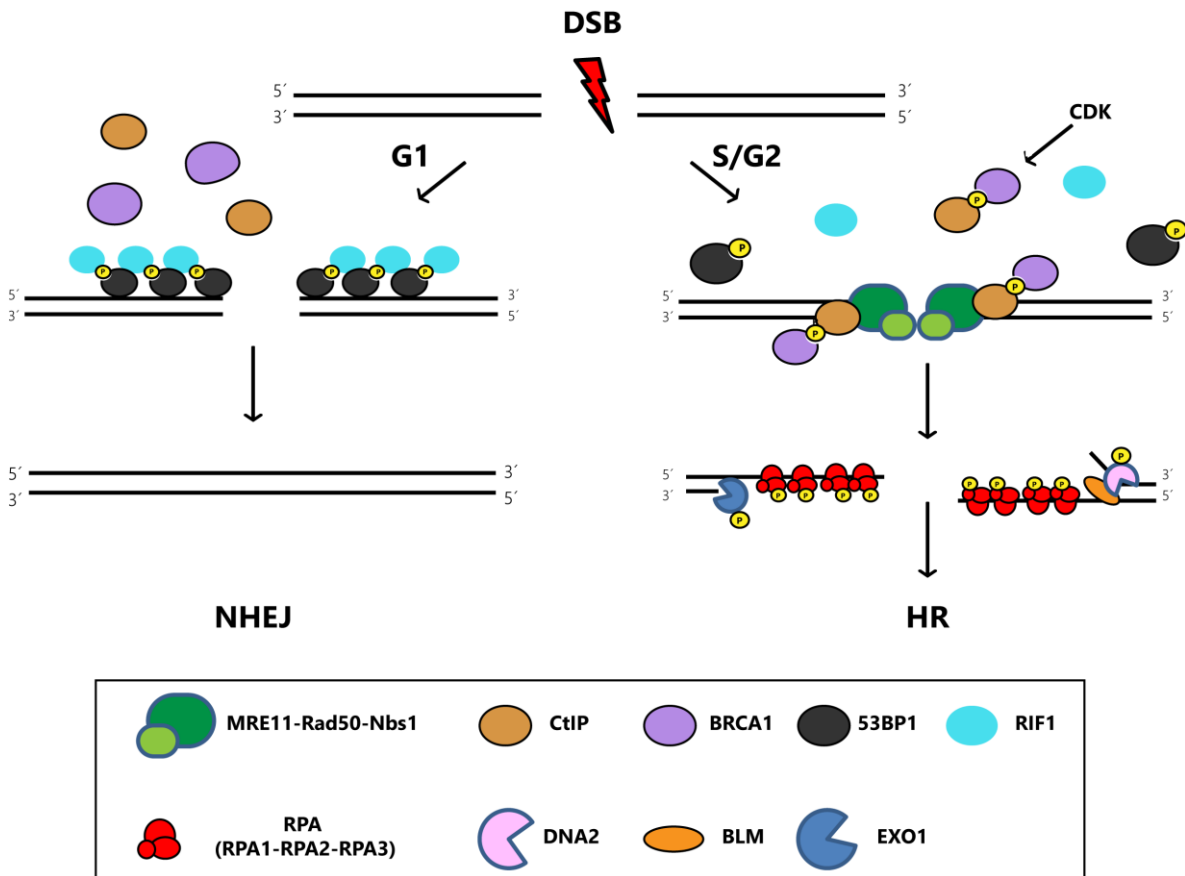


Figura 16. Regulación de la resección del ADN. La elección de la vía de reparación de las roturas de doble cadena es gobernada por las actividades opuestas de 53BP1 y BRCA1. 53BP1 estimula la reparación por NHEJ, mientras que BRCA1 la HR. 53BP1 funciona como un inhibidor de la acumulación BRCA1 a los sitios de DSB, especialmente durante la fase G1 del ciclo celular. Mediante la fosforilación de 53BP1 por ATM, se recluta RIF1, el principal efector de 53BP1 durante la reparación del DSB. Además, la acumulación de RIF1 a los sitios de daño antagoniza con BRCA1 y la interacción con CtIP. Sugiriendo así un ciclo regulador de la resección no solo mediante la fase del ciclo celular sino también por la acción antagónica entre 53BP1-RIF1 y CtIP-BRCA1, asegurando que NHEJ sea el predominante en la fase G1 y favoreciendo la HR en S/G2 del ciclo celular. Imagen modificada de James Daley et al 2013.

Por otro lado, aunque el ADNcs generado por la resección es esencial para la activación del *checkpoint* de ATR y la HR, una resección descontrolada podría ser perjudicial para la integridad del genoma, ya que el ADNcs es más susceptible a ser degradado lo que conduciría a la pérdida de la información genética. Por lo tanto, es de esperarse que cuando el ADNcs alcance una determinada longitud, la resección sea detenida. Sin embargo, los mecanismos para terminar la resección aun necesitan ser esclarecidos. Ensayos en levaduras y células humanas sugieren que la actividad de EXO1 es controlada de manera dependiente del *checkpoint*, por ejemplo en levaduras la actividad nucleasa de Exo1 es inhibida por Mec1 (homólogo de ATR) y Rad53 en los telómeros descubiertos (Jia, Weinert et al. 2004). La fosforilación de Exo1 por Rad53 inhibe su actividad en el procesamiento de los DSB, los telómeros descubiertos y las horquillas de replicación bloqueadas. En células humanas, la fosforilación de EXO1 por ATR conlleva a la degradación de este durante el estrés replicativo (Paudyal and You 2016).

iv. Invasión en HR.

Una vez terminada la resección, la proteína RPA unida al ADNcs es sustituida por RAD51, pero esta se une con menos afinidad al ADN que RPA (Peterson, Li et al. 2011). Por tanto, son necesarias modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, defosforilaciones y sumoilaciones para modificar la afinidad de RPA y formar el filamento ADN-RAD51 (Dou, Huang et al. 2010; Lee, Pan et al. 2010). Una de las proteínas clave en el intercambio de RPA por RAD51 es BRCA2, ayudada por otras proteínas como PALB2, RAD52, los parálogos de RAD51 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2, Xrcc3) y BRCA1 (Li and Heyer 2008). Se ha visto que todas estas proteínas son necesarias para la formación de focos de RAD51 después de daño con radiación ionizante (IR, del inglés *Ionizing Radiation*). Sin embargo, la carga directa de RAD51 al filamento de ADN es llevada a cabo por BRCA2 (Krejci, Altmannova et al. 2012). Además, la interacción entre RAD51 y BRCA2 es dependiente de la fosforilación por CDK en la S329 en RAD51 (Li and Heyer 2008), por lo que se encuentra limitada a las fases S y G2 del ciclo celular (Krejci, Altmannova et al. 2012). BRCA2 tiene

importancia clínica ya que mutaciones heterocigóticas del gen predisponen a cáncer de mama, ovario y otros tipos de tumores (Li and Heyer 2008), más aún, la pérdida de la función de BRCA2 produce Anemia de Fanconi (Kennedy and D'Andrea 2005). Por otro lado, RAD51 es sustrato de CHK1, siendo su fosforilación necesaria para el reclutamiento de RAD51 al sitio de daño (Sorensen, Hansen et al. 2005).

De esta manera, los filamentos de cadena sencilla de ADN-RAD51 median la búsqueda de homología y la invasión seguida de la síntesis de ADN, denominada colectivamente sinapsis, llegando a la formación de estructuras de Holliday y finalizando con la ligación de ADN, restaurando así la integridad del genoma (Figura I4) (Li and Heyer 2008).

Como se mencionó anteriormente, la reparación a continuación puede producirse por SDSA, BIR y HR clásica (Figura I4). La invasión de una cadena en una secuencia homóloga genera un intermediario llamado *D-loop*, que tiene forma de lazo y en el que el extremo 3'OH de la cadena invasora es extendido por una polimerasa, es entonces realineado para procesar el segundo extremo de la rotura (West 2003).

En SDSA, el *D-loop* se disuelve después de una cierta síntesis de ADN y las cadenas invasoras realinean desvinculadas con el segundo extremo del DSB, siempre sin producir entrecruzamientos (Li and Heyer 2008), se propone que esta vía es promovida por la helicasa RTEL (Uringa, Youds et al. 2011). El aspecto de la evitación de entrecruzamientos es una de las características clave de SDSA que hicieron que este modelo sea atractivo para la reparación de DSB en células somáticas.

La ruta de reparación por BIR ocurre cuando el extremo 3' de la cadena que invade conduce a la formación de una horquilla de replicación que potencialmente puede copiar tramos largos desde la molécula de ADN donante conllevando a pérdida de heterocigosidad (Li and Heyer 2008). El aporte de BIR a la reparación de DSB es incierta, aunque RAD51 o MRE11, hacen una contribución significativa a esta ruta de reparación de DSB (Krejci, Altmannova et al. 2012). Sin embargo, BIR parece ser al menos un mecanismo responsable del alargamiento alternativo de los telómeros, ya que ambas vías comparten requisitos genéticos comunes (Heyer, Ehmsen et al. 2010). BIR puede emplear

mecanismos similares para la reparación de una horquilla de replicación rota, que implica resección, la formación de filamentos RAD51, y la formación del *D-loop* (Li and Heyer 2008).

v. Migración de la estructura de Holliday (HJ).

Si se forma una estructura de Holliday se genera una región de heterodúplex, es decir, en la que la molécula de ADN está formada por una cadena de la molécula invasora y otra de la que actúa como donadora de información. Estas estructuras de Holliday pueden desplazarse a lo largo del ADN, en un proceso dependiente de ATP, desplazamiento comúnmente denominado migración. Este fenómeno aumenta o disminuye la longitud del heterodúplex dependiendo en sí de la dirección del desplazamiento. Si los DSBs ocurren durante la fase S o G2 del ciclo celular, se usa la cromátida hermana como molde para realizar la reparación, en teoría totalmente libre de errores (Johnson and Jasin 2000). Sin embargo, cuando se usa otro donador de información este heterodúplex puede presentar pequeñas zonas en las que las bases no aparean correctamente. Su posterior reparación explica el fenómeno de conversión génica (Krejci, Altmannova et al. 2012). En la mayoría de los eventos de HR ya sea en levaduras o en células de mamíferos se copia un fragmento pequeño desde la molécula donadora y es lo que se denomina STGC (*short tract gene conversion*, por sus siglas en inglés). Una pequeña proporción de eventos de HR en mamíferos copia un fragmento superior de varias kilobases y se denomina LTGC (*long tract gene conversion*, por sus siglas en inglés) (Puget, Knowlton et al. 2005). Se han demostrado que mutaciones en algunos parálogos de RAD51 como XRCC3, RAD51C y XRCC2 favorecen la HR con LTGC (Nagaraju, Hartlerode et al. 2009).

vi. Resolución en la HR.

Una vez formada la estructura de Holliday, las moléculas de ADN tanto del molde como la invasora quedan unidas entre sí. Por ello, la resolución es procesada por varios complejos

enzimáticos. BLM formando un complejo con la topoisomerasa III α (TOPOIII α) puede disolver la estructura de Holliday, derivando en productos sin entrecruzamiento (Wu and Hickson 2003). BLM migra las dos uniones una hacia otra (Plank, Wu et al. 2006; Manthei and Keck 2013), mientras que TOPOIII α elimina los hemicatenados, topológicamente unidos por los dos dúplex. La recombinación en las células somáticas está raramente asociada con entrecruzamientos ya que estos tienen el potencial de generar reordenamientos genómicos y pérdidas de heterocigosidad (Li and Heyer 2008). Sin embargo, la disolución de las estructuras de Holliday por BLM-TOPOIII α en productos sin entrecruzamientos reafirma la posibilidad de que estas estructuras puedan ser un intermedio en la reparación de DSB en células somáticas (Manthei and Keck 2013).

Alternativamente, estas pueden ser cortadas por nucleasas dependientes de estructura, lo que conlleva a productos con entrecruzamiento (Wu and Hickson 2003). Existen al menos tres complejos con esta actividad; el complejo MUS81-EME1, GEN1, que promueve la resolución de HJ por un corte simétrico y SLX4 (Wyatt and West 2014).

d. Reparación por alineamiento de cadena sencilla (*Single Strand Annealing, SSA*).

Este tipo de reparación ocurre cuando un DSB se localiza en un sitio con secuencias repetidas adyacentes (Figura I4). Después de la resección, las zonas homologas se exponen lo que predispone a un alineamiento directo entre las cadenas debido a las secuencias repetidas (Hartlerode and Scully 2009). Esto puede ser favorecido por RAD52 sin la participación de RAD51 (McDonald and Rothstein 1994). Ya que ocurre el alineamiento los extremos sin hibridar son eliminados por la proteína XPF/ERCC1. Este tipo de reparación es mutagénica ya que se conlleva una eliminación una de las secuencias repetidas y la secuencia intermedia entre las repeticiones. (Prado and Aguilera 2003; Hartlerode and Scully 2009)

III. La proteína CtIP (*CtBP Interacting Protein*).

CtIP es una de las proteínas más importantes implicada en el proceso de resección en humanos. Fue originalmente identificada como un interactor del correpressor transcripcional CtBP (Schaeper, Subramanian et al. 1998) a través del motivo PLDLS (Schaeper, Boyd et al. 1995; Molloy, Barral et al. 2001), el cual está altamente conservado en proteínas virales y celulares que se unen a CtBP, además se observó que la interacción entre CtBP y CtIP se interrumpía por la oncoproteína EA1 del adenovirus. (Schaeper, Subramanian et al. 1998)

El gen *CtIP* humano está localizado en el cromosoma 18q11.2 (Fusco, Raymond et al. 1998). CtIP, también conocido como RBBP8 o Rim por su interacción con Retinoblastoma (RB), es una proteína que contiene 897 aminoácidos (Schaeper, Subramanian et al. 1998; Yu and Baer 2000). La proteína CtIP contiene varios dominios, entre ellos se destacan los siguientes: la secuencia PXDLS, un dominio conocido por mediar la interacción entre E1A/CtBP y es igualmente necesaria para la unión de CtIP con CtBP; el dominio LXCXE en la fracción N-terminal, es común en una variedad de proteínas tanto virales como celulares que interactúan con RB (Figura I7). CtIP se une de una manera fosfodependiente a BRCA1, mediante la interacción de la serina 327 fosforilada de CtIP con los dominios BRCT de BRCA1 (Yu and Baer 2000; Yu and Chen 2004; Chen, Nievera et al. 2008; Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Reczek, Szabolcs et al. 2013). Estos sitios de unión con supresores tumorales como BRCA1 y RB, se encuentran frecuentemente mutados en cáncer humano (Chinnadurai 2006). La región N-terminal de CtIP se propone que forma una estructura *Coiled-coil* para la tetramerización de CtIP (Davies, Forment et al. 2015).

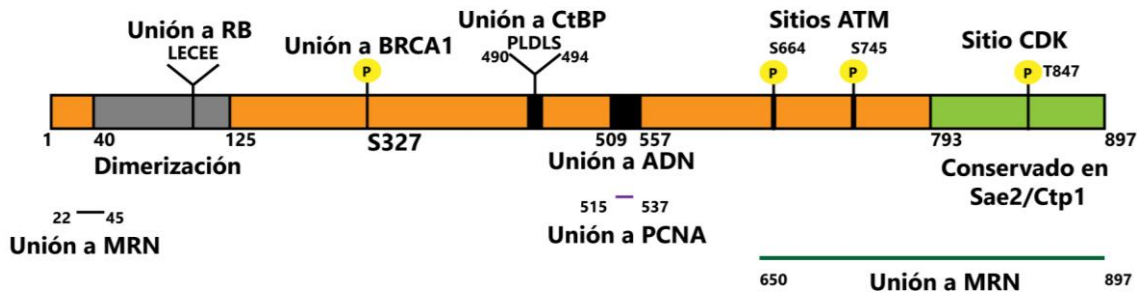


Figura 17. Proteína CtIP. Representación esquemática de diversos dominios de la proteína CtIP, importantes para su regulación y funciones. CtIP contiene en el extremo amino terminal, un dominio de multimerización (aminoácidos 40-165) y un sitio de unión a RB (LECEE). En la región central cuenta con motivo de unión a CtBP (PLDLS). En el extremo carboxilo terminal una región similar a Sae2 y Ctp1 (aminoácidos 793-897), región muy conservada desde levaduras hasta humanos. La fosforilación de la S327 media la unión a BRCA1, la ubiquitinación por BRCA1 localiza CtIP en la cromatina dañada. La región de los aminoácidos 509-557, tiene capacidad de la unión a ADN, al menos *in vitro*, se cree que regula la unión al ADN después de daño. Tiene dos lisinas muy conservadas en vertebrados dentro de esta región, K513 y K515, que son importantes para la unión al ADN. Ha sido identificado también un motivo de unión a PCNA en la región de unión al ADN. Tanto en los dominios amino (aminoácidos 22-45) y carboxilo (aminoácidos 650-897) terminal se han identificado sitios de unión al complejo MRN. Las serinas 664 y 745, son objeto de fosforilación por ATM. Mientras que la T847, fosforilada por CDK, es importante para la resección del ADN.

Adicionalmente, se ha demostrado que ATM puede fosforilar a CtIP en dos residuos de serina en forma dependiente a la presencia de daño en el ADN (Wu-Baer and Baer 2001). Además cuenta con cuatro señales de localización nuclear por lo que se detecta predominantemente como una proteína nuclear (Yu and Baer 2000). Existe una variante de CtIP, producto de un *splicing* alternativo, que codifica una región C-terminal diferente, pero la función biológica de esta proteína queda aún por explorar (Ute Schaeper 1998; Chinnadurai 2006; Yun and Hiom 2009).

En humanos, aunque es ampliamente expresada en varios tejidos, la proteína CtIP muestra en el timo y testículos niveles de expresión más elevados con respecto al resto de tejidos, al igual que otras proteínas como BRCA1 y RAD51 (Shinohara, Ogawa et al. 1993; Miki, Swensen et al. 1994; Wong, Ormonde et al. 1998). La secuencia primaria de

aminoácidos de CtIP esta conservada entre los mamíferos. Tanto los homólogos en aves como en invertebrados como *Xenopus* comparten un alto grado de identidad sobre todo en las regiones carboxilo y amino terminal, incluido el motivo de unión a CtBP (Chinnadurai 2006).

a. Principales funciones de CtIP.

Además de ser una proteína clave en promover la resección del ADN, se han descrito más funciones para CtIP, las cuales se describen a continuación y se encuentran representadas en la figura 18.

i. Correpresor transcripcional.

Como se ha mencionado anteriormente CtIP fue inicialmente identificado como un interactor del correpresor CtBP. Tanto CtIP como CtBP pueden reprimir la activación transcripcional al unirse con GAL4 *DNA binding domain* (Meloni, Smith et al. 1999). Se ha mostrado que CtBP interacciona con un gran número de factores transcripcionales por medio del motivo PXDLS, tanto con proteínas virales como E1A, EBNA3A (*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A*), EBNA3C (*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C*) y MEQ (*Marek's disease virus*), como proteínas celulares tales como Knirps, Snail, Hairy, Krüppel/BKLF, AREB6, FOG, Evi-1, ZEB/ δ EF1, RIP140, Ikaros y Smad6 (Chinnadurai 2006; Wu and Lee 2006; Makharashvili and Paull 2015).

Aun cuando el papel como represor transcripcional de CtIP no está del todo claro, existen varios modelos propuestos en los que CtIP funciona como corepresor transcripcional. En el primero, CtIP recluta a CtBP funcionando como un represor de la transcripción. Por ejemplo, CtBP a su vez puede reclutar a represores transcripcionales como HDACs (*Histone deacetylases*)(Shi, Sawada et al. 2003) o PcG/YY1 (*Polycomb group/Yin Yang 1*) (Srinivasan and Atchison 2004) o acetil transferasas como p300 (Kim, Cho et al. 2005). En el segundo, CtIP coordina la represión de la transcripción de una manera independiente

de HDAC con ayuda de Ikaros, (Koipally and Georgopoulos 2002). Ikaros pueden reprimir la transcripción de una manera dependiente e independiente de HDAC. Este último está mediado por CtIP y RB, pero no CtBP (Koipally and Georgopoulos 2000; Koipally and Georgopoulos 2002). En el tercero, LMO4 (*LIM Domain Only 4*), interactúa tanto con BRCA1 y CtIP y retransmite la señal de la represión a los genes diana (Sum, Peng et al. 2002). De acuerdo con esto, BRCA1 puede tender un puente entre CtIP y el represor de la transcripción específico de secuencia ZBRK1, lo que permite la represión de un subconjunto de genes tales como el factor de ANG1 (Zheng, Pan et al. 2000).

ii. CtIP promueve la transición G1/S.

Una de las funciones esenciales de CtIP durante el desarrollo embrionario temprano es promover la entrada en la fase S. Blastocitos *Knock out* para CtIP (CtIP $-/-$) no entran a esta fase y exhiben aumento de la muerte celular (Chen, Liu et al. 2005). Por otra parte, el silenciamiento de CtIP resultado del tratamiento con ARNi resulta en una detención en G1/S en líneas celulares de cáncer y fibroblastos de ratón con Rb, pero no en aquellos fibroblastos deficientes de Rb; confirmando la implicación de CtIP en la promoción de entrada en la fase S (Chen, Liu et al. 2005). En estas líneas celulares se detectó la acumulación de p21WAF1, indicando que el arresto en G1 es en parte mediada por p21WAF1, la expresión del cuál es parcialmente reprimida por CtIP en ciertos contextos (Chen, Liu et al. 2005).

Estudios previos han descrito que CtIP se une tanto a los promotores de su propio gen como a CCND1 (gen de la ciclina 1), y promueve la activación transcripcional de CtIP y ciclina D1 durante la transición de G1 a S (Liu and Lee 2006). La evidencia favorece un modelo en el que CtIP se requiere para desalojar RB de los promotores. Tras la eliminación de RB, CtIP se queda en los sitios E2F para promover su activación transcripcional y por consiguiente inducir la entrada en la fase S (Figura 18). Por lo tanto, CtIP es más bien un activador de la vía RB/E2F, directamente opuesto a la hipótesis previa como un corepresor

(Meloni, Smith et al. 1999). Esta función de CtIP recuerda la acción de factores virales como el antígeno grande de SV40 y la oncoproteína E7 del virus de papiloma humano, que inducen la entrada en la fase S mediante la inactivación de RB.

Una considerable evidencia sobre el papel de CtIP en la transición G1/S viene dada porque la inactivación homocigótica del gen *CTIP* causa letalidad embrionaria temprana durante el desarrollo del ratón en el estadio temprano E4 (Chen, Liu et al. 2005).

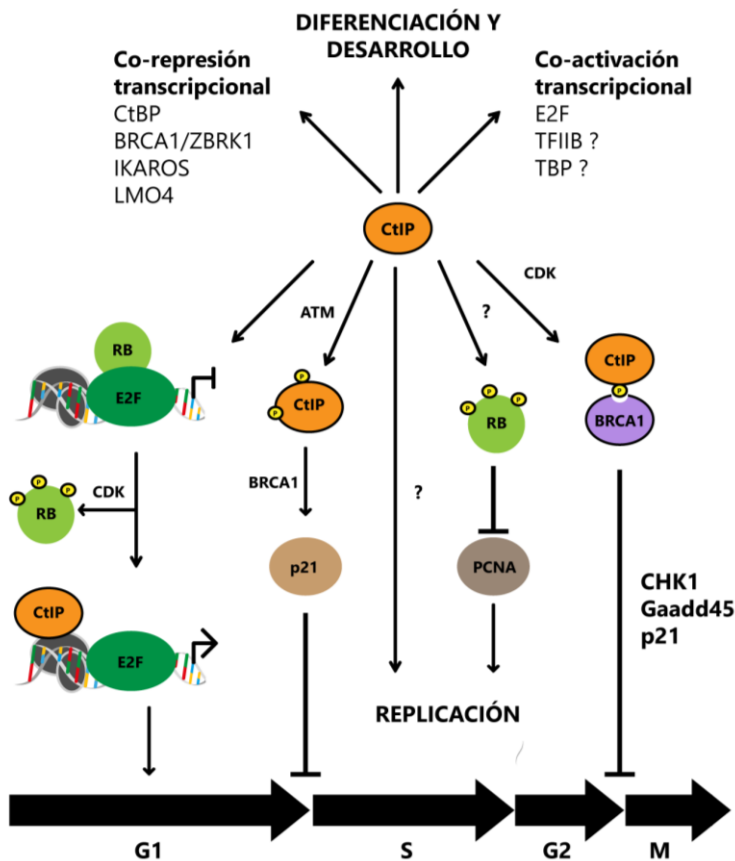


Figura 18. Principales funciones de CtIP.

Resumen de las funciones de CtIP en DDR. Después de la inducción de un DSB se activan los *checkpoint* de G1/S, S o G2/M. G1/S, y G2/M bloquean la entrada a S y M respectivamente, mientras que el *checkpoint* dentro de la fase S, inhibe la activación de las horquillas de replicación retrasadas, y disminuye la velocidad en la elongación en las horquillas que ya están replicando el ADN. CtIP es necesario para una correcta activación de G2/M, y muy probablemente también actúe en el *checkpoint* de S. La fase del ciclo celular determina la vía de reparación de una DSB. Mientras

que en G1 se repara principalmente por NHEJ, durante S/G2 se puede reparar tanto por NHEJ como por HR. La vía de HR requiere de CtIP junto con MRN, BRCA1, CDK y ATM para iniciar la resección del ADN. CtIP también se involucra en MMEJ, una forma de NHEJ que necesita una limitada resección del ADN. Imagen modificada de Zhongsheng You y Julie M. Bailis, 2010.

iii. Participación en el *checkpoint* de G2/M.

CtIP juega un papel en el *checkpoint* de G2/M, principalmente por su interacción con BRCA1 (Figura I8) (Chinnadurai 2006; Wu and Lee 2006; Makharashvili and Paull 2015). La asociación CtIP-BRCA1 puede provocar al menos dos resultados funcionales en diferentes contextos fisiológicos. CtIP puede ser físicamente ligado a ZBRK1 a través de BRCA1, que utiliza regiones moleculares distintas para interactuar con CtIP y ZBRK1. Juntos, el trímero reprime la expresión de un subconjunto de genes incluyendo ANG1 durante la proliferación celular y la diferenciación (Furuta, Wang et al. 2006). Bajo una condición relacionada con el estrés como el daño en el ADN, CtIP es fosforilada en la serina 664 y 745 en una forma dependiente de ATM (Li, Ting et al. 2000). Entonces la represión es aliviada, para permitir la expresión de p21WAF1 y Gadd (Li, Ting et al. 2000), dos moléculas inhibitoras Cdc2 que participan en el *checkpoint* G2/M. CtIP puede contribuir al *checkpoint* de G2/M a través de un segundo mecanismo, mediante la interacción con BRCA1, complejo formado mediante la fosforilación de CDK en la S327 de CtIP que solo ocurre durante la fase G2 (mencionado anteriormente). En conjunto, CtIP y BRCA1 se requieren para la activación de Chk1 por ATM/ATR y en consecuencia la activación inmediata del *checkpoint* G2/M (Yu and Chen 2004). Además, la proteína reguladora del *checkpoint*, Claspinga, se encuentra implicada en la activación de Chk1 durante el daño del ADN por la vía de ATR mediante el reclutamiento de BRCA1 y Chk1 en los sitios dañados de la cromatina (Lin, Li et al. 2004). Es posible que CtIP pueda ser un cofactor para la activación de Chk1 mediada por Claspinga y BRCA1 (Chinnadurai 2006).

iv. CtIP y replicación del ADN.

En eucariotas, el daño en el ADN encontrado durante la replicación y la fase G2 del ciclo celular se repara predominantemente a través de recombinación homóloga (Jazayeri, Falck et al. 2006). Horquillas de replicación estresadas o bloqueadas producen regiones de ADNcs que activa ATR (Zeman and Cimprich 2014). La activación óptima de ATR requiere

al menos dos eventos: el reclutamiento del complejo Rad9-Hus1-Rad1 y el complejo ATR-ATRIP, desencadenado por ADNcs recubierto por RPA (Nam and Cortez 2011). Los trastornos genéticos asociados a CtIP tienen fenotipo muy similar a los trastornos asociados con las mutaciones hipomórficas de ATR, y CtIP también es fosforilada por ATR (Peterson, Li et al. 2013). Esto sugiere una interacción epistática entre estos dos productos génicos (Griffith, Walker et al. 2008; Qvist, Huertas et al. 2011). Es probable que CtIP participe en el procesamiento de estructuras secundarias, productos intermedios de ADN, que surgen durante la replicación, así como en la iniciación de la resección de DSBs formadas durante la replicación (Makharashvili, Tubbs et al. 2014; Wang, Li et al. 2014). Específicamente, CtIP promueve la eliminación de estructuras secundarias de ADN, aductos de proteínas de ADN, así como entrecruzamientos entre hebras de ADN, todos los cuales actúan como bloqueadores de la horquilla de replicación.

Además de sus actividades en la reparación del ADN, CtIP puede estar directamente involucrado en la regulación de la replicación, ya que interactúa con RB, un importante regulador del ciclo celular como se ha mencionado anteriormente. Cuando RB se encuentra hiperfosforilada, permite a las células la correcta progresión en la fase S (Figura 18). La ausencia de CtIP impide la hiperfosforilación de RB y la progresión del ciclo celular a esta fase.

En conjunto los datos anteriores indican que CtIP de vertebrados es una proteína multifuncional formando múltiples complejos para mediar la regulación del ciclo celular y los *checkpoints* de daño del ADN, así como la reparación del mismo. De hecho, se mostró una interacción entre PCNA y CtIP, dicha interacción está mediada por una región de 42 aminoácidos de CtIP conocida como secuencia de direccionamiento a focos de replicación (RFTS, del inglés *Replication Foci Targeting Sequence*) que contiene un motivo consenso para interactuar con PCNA (Warbrick 1998). CtIP es reclutada a focos de replicación de ADN por interacción directa con PCNA. (Gu and Chen 2009). La proteína CtIP silvestre expresada mediante transfección transitoria colocaliza con PCNA en los focos de replicación, mientras que mutaciones en el RFTS anulan esa colocalización. Al interferir la interacción entre CtIP y PCNA a través de la sobreexpresión de una construcción

quimérica RFTS-GFP, que se comporta como un dominante negativo, se produjo el arresto del ciclo celular en la transición S/G2 y el cese de la proliferación celular. Además, células expresando los RFTS quiméricos provocaron daño en el ADN y la activación *checkpoint* de daño, mientras que los RFTS mutantes, defectuosos en interacción con PCNA no lo hicieron. Estos resultados sugieren que el complejo CtIP-PCNA podría desempeñar un papel en la estabilización de las horquillas de replicación atascadas. Ya que, CtIP juega un papel en la reparación del ADN, es posible que la función del complejo CtIP-PCNA sea la vigilancia de las horquillas de replicación con potencial de ser bloqueadas.

b. Regulación de CtIP.

Como se ha mencionado anteriormente, CtIP interacciona con un gran número de proteínas involucradas en una variedad de procesos celulares como la reparación del ADN, la replicación y regulación de la transcripción. Para asegurar el apropiado funcionamiento de estos procesos, CtIP es objeto de varias modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, neddilaciones e isomerizaciones de prolina, que en conjunto alteran la interacción con otras proteínas ó afectan la estabilidad de la proteína llevándola a una degradación por vía del proteosoma (Kaidi, Weinert et al. 2010; Steger, Murina et al. 2013; Jimeno, Fernandez-Avila et al. 2015; Makharashvili and Paull 2015). Se han descrito varios residuos para estas modificaciones tales como las K432, K526, K604 objeto de acetilación (Kaidi, Weinert et al. 2010). Sitios de fosforilación S/TP y S/TQ, como S276, T315, S327, S347, T847, y S231, S664, S745, T859, respectivamente (Figura I7) (Huertas 2010; Ferretti, Lafranchi et al. 2013; Makharashvili and Paull 2015).

Las serinas S347 y S276 son parte de un grupo de sitios blanco de CDK identificados por Wang et al, que promueven la unión de NBS1 a CtIP, para promover la posterior fosforilación por ATM (Wang, Shi et al. 2013), por lo tanto, algunas de las modificaciones de CtIP son claramente esenciales para sus múltiples funciones. Curiosamente, la quinasa no dependiente de ciclina PLK3 se mostró que fosforila los sitios S327 y T847 en las fases

del ciclo celular G₀/G₁ en respuesta a los DSBs (Barton, Naumann et al. 2014), en consonancia con otros informes que sugieren un papel de CtIP en G₁ (Yun and Hiom 2009; Helmink, Tubbs et al. 2011; Quennet, Beucher et al. 2011). Sin embargo, en ausencia de maquinaria de reparación HR estas modificaciones involucran a CtIP y MRN en la reparación mediada por MMEJ (Quennet, Beucher et al. 2011).

Efectos similares se observan con los sitios S/TQ modificados por quinasas dependientes de daño en el ADN, y en algunos casos modificaciones por CDK son necesarias para mediar la fosforilación por ATM (Wang, Shi et al. 2013), muy similar a las modificaciones de Sae2 en levadura (Fu, Chow et al. 2014). Los sitios de fosforilación de ATM en CtIP, S664, S745 y se propusieron originalmente como modificaciones de CtIP que bloqueaban la interacción con BRCA1 después de daño (Li, Ting et al. 2000).

Se ha demostrado que ATR puede fosforilar a CtIP en un sitio TQ, dependiente de daño, la T859 en CtIP humana y T818 en *Xenopus*, aunque hay evidencia que apoya la fosforilación por ATM de estos sitios (Peterson, Li et al. 2013; Wang, Shi et al. 2013). Los sitios dependientes de CDK y la quinasa PIKK mostraron ser esenciales para el reclutamiento de EXO1 y BLM a los sitios de daño (Wang, Shi et al. 2013).

Se ha documentado que la de-acetilación de los residuos K432, K526, y K602 de CtIP por SIRT6 juegan un papel crítico en la respuesta al daño promoviendo el reclutamiento de CtIP a la cromatina (Kaidi, Weinert et al. 2010). La ubiquitina ligasa APC/C(C) (dh1) modifica a CtIP mediante la interacción con la caja KEN conservada de CtIP y altera los niveles de esta durante la fase G₁ del ciclo celular y después de daño en la fase G₂ (Lafranchi, de Boer et al. 2014). La isomerización de prolina fosfodependiente de PIN1, se ha demostrado que promueve la ubiquitination de CtIP y su consiguiente degradación (Steger, Murina et al. 2013). También BRCA1 puede ubiquitinar a CtIP *in vitro* (Yu, Fu et al. 2006); la forma ubiquitinada de CtIP no se degradó en este caso, pero muestra una asociación más eficiente con la cromatina (Yu, Fu et al. 2006). También se ha demostrado que la neddilación modula la interacción entre BRCA1 y CtIP, alterando los perfiles de resección (Jimeno, Fernandez-Avila et al. 2015); sin embargo, no está claro aún si esta

modificación altera la fosforilación del sitio S327, que está implicado en la interacción CtIP-BRCA1.

c. Enfermedades relacionadas con CtIP.

El gen *CtIP* contiene una repetición del mononucleótido adenina (A9) y uno de los alelos está mutado con alta frecuencia en el cáncer de colon con inestabilidad de microsatélites (Vilkki, Launonen et al. 2002). De hecho, los ratones heterocigotos de *CtIP* (+/-) desarrollan múltiples tipos de tumores que sugieren que la insuficiencia haploide de *CtIP* conduce a la tumorigénesis (Chen, Liu et al. 2005). Entre los diversos tipos de tumor observados en los ratones heterocigotos, los linfomas grandes en linfocitos B y T son los más prevalentes (Ute Schaeper 1998; Chinnadurai 2006; Wu and Lee 2006). Con todas estas interacciones entre *CtIP* y supresores tumorales como BRCA1, RB e Ikaros se plantea la posibilidad de que *CtIP* puede ser en sí un gen de susceptibilidad al tumor (Chinnadurai 2006; Wu and Lee 2006). De acuerdo con esta idea, se ha reportado que la poca o nula expresión de la proteína *CtIP* correlaciona con una mala prognosis en pacientes con cáncer de mama proponiéndose además como con marcador para la respuesta al tratamiento con inhibidores de PARP (Soria-Bretones, Saez et al. 2013; Wang, Ding et al. 2016).

Por otro lado, se han propuesto que dos mutaciones en el gen de *CtIP* que resultan en una versión truncada de la proteína ocasionan la enfermedad de síndrome de Seckel (Qvist, Huertas et al. 2011), una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al grupo de enfermedades conocidas como desordenes relacionados con DDR (O'Driscoll and Jeggo 2006), caracterizada por microcefalia (cabeza anormalmente pequeña), *dwarfismo* (forma de enanismo proporcionado) y facies peculiar. Las células derivadas de todos los pacientes Seckel se ven afectados en la señalización mediada por el daño del ADN y proteínas sensibles por la quinasa ATR (Alderton, Joenje et al. 2004). Existe otra enfermedad relacionada con *CtIP*, que es una versión similar al síndrome de Seckel, este otro es mejor conocido como síndrome de Jawad, provocado por una delección en dos bases del gen que,

provoca un cambio en la pauta de lectura, dando como resultado una proteína CtIP aberrante que funciona como un mutante negativo (Qvist, Huertas et al. 2011).

IV. Aspectos generales de la proteína BRCA1 (*Breast Cancer 1*).

BRCA1, es uno de los principales genes supresores de tumor ya que mutaciones en este gen incrementan la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama y de ovario (Prakash, Zhang et al. 2015). *BRCA1* fue inicialmente identificado como un gen mutado en cáncer familiar de mama y de ovario (Miki, Swensen et al. 1994). Desde su descubrimiento, diversos estudios han revelado que BRCA1 participa en diversos procesos celulares, como el aseguramiento de la estabilidad genómica y el control de los *checkpoint* (Caestecker and Van de Walle 2013). Especialmente, BRCA1 es esencial para la reparación por HR, por lo tanto, mutaciones dentro del gen *BRCA1* conllevan a una inapropiada reparación por esta vía, lo que eventualmente conduce a inestabilidad genómica y cáncer (Moynahan, Chiu et al. 1999). La importancia fisiológica de BRCA1 se ve reflejada por la evidencia que muestra que el 55-66 % de mujeres con mutaciones patogénicas en este gen tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama, y que el 39% de las mujeres con las mutaciones peligrosas en *BRCA1* desarrollarán cáncer de ovario para la edad de 70 años (Antoniou, Pharoah et al. 2003; Chen and Parmigiani 2007).

a. Los dominios de BRCA1.

El gen *BRCA1* está localizado en el cromosoma 17q21.3 y codifica para una proteína de 1863aa (Miki, Swensen et al. 1994). El gen *BRCA1* también codifica al menos para dos variantes más pequeñas debido al *splicing* alternativo (Huen, Sy et al. 2010; Thompson, Fares et al. 2012). La proteína madura y completa de BRCA1 se localiza en el núcleo celular y tiene tres dominios funcionales, un dominio RING (*Really Interesting New Gene*) en el amino terminal, dominios BRCT (BRCA1-C Terminal) (Caestecker and Van de Walle 2013) y un dominio *coiled-coil* en el carboxilo terminal, responsables de interacción con otras proteínas (Figura I9). Mutaciones dentro de los dominios RING y BRCT son de importancia clínica (Prakash, Zhang et al. 2015). El dominio RING está implicado en la ubiquitinación de

proteínas a través de la interacción con la enzima E2 y también es importante para la interacción con BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*, por sus siglas en inglés) (Baer and Ludwig 2002; Huen, Sy et al. 2010). El mutante I26A de BRCA1 pierde la capacidad de interactuar con la enzima E2, afectando la frecuencia en el desarrollo de tumores y la estabilidad genómica (Shakya, Reid et al. 2011). Por otro lado, el mutante patogénico C61G de BRCA1, que interrumpe no solo la actividad de E3 sino también la interacción con BARD1, conduce a deficiencias en la reparación de ADN y posteriormente a cáncer, como se ha demostrado en ratones (Drost, Bouwman et al. 2011). Los dos dominios BRCT, son los encargados en la unión a fosfopéptidos por medio de reconocimiento del motivo fosfo-SPXF (Huen, Sy et al. 2010). BRCA1 regula varios procesos celulares, gracias a su interacción a través de sus dominios BCRT con varios factores involucrados en el DDR y la reparación del ADN (Caestecker and Van de Walle 2013). Entre las proteínas que interactúan por medio de estos, destacan Abraxas, BACH1 y CtIP, que se asocian con BRCT en una manera fosfodependiente; cada uno produce un complejo distinto que parece desempeñan un papel único en la reparación del ADN (Rodriguez, Yu et al. 2003; Yu, Chini et al. 2003), aunque el papel exacto de estos tres complejos se desconoce.

La función como supresor de tumor de BRCA1 esta dictada por el hecho que es una proteína que promueve la estabilidad de genoma. Inicialmente fue descubierta en líneas celulares tumorales y fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), ambas deficientes en BRCA1 que exhibían una elevada inestabilidad genómica, incluyendo patrones de aneuploidias, amplificación de centrosomas y aberraciones cromosómicas (Tirkkonen, Johannsson et al. 1997; Dohrn, Salles et al. 2012). De igual modo, las primeras evidencias de la participación de BRCA1 en la reparación de los DSBs vino de estudios con IR, que mostraron la hiperfosforilación de está formando IRIF y colocalizando con proteínas como RAD51 y BRCA2 (Moynahan, Chiu et al. 1999). En general, BRCA1 funciona principalmente como un mediador en la respuesta celular al daño en el ADN; ya que sirve como un andamio, reclutando y formando complejos con varias proteínas involucradas en la reparación (Figura I9) (Pollard and Gatti 2009). Estos complejos tienen participación en

procesos específicos en la respuesta al daño, especialmente los involucrados en la reparación de cortes de doble cadena.

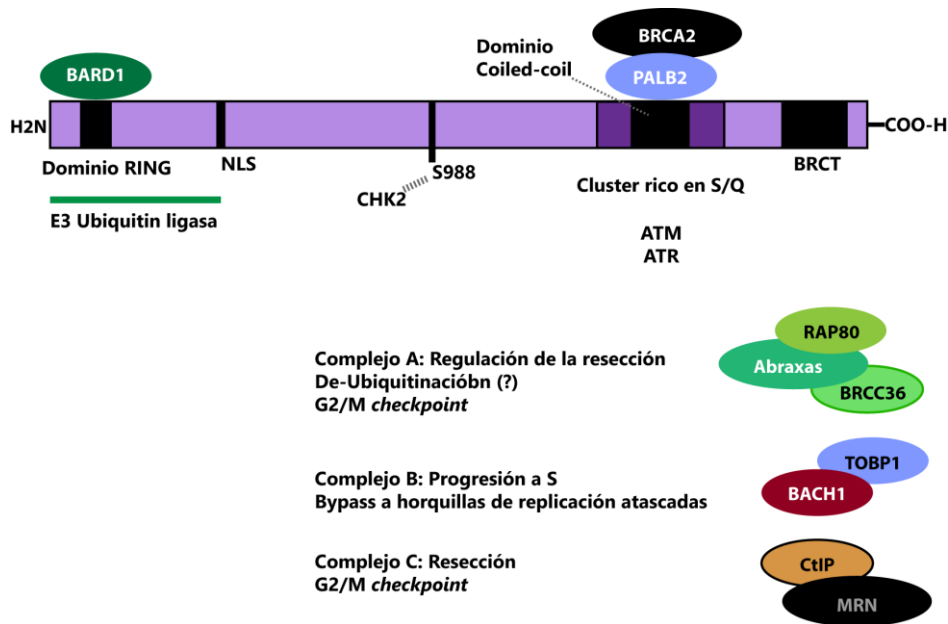


Figura 19. Proteína BRCA1 y sus funciones. Representación esquemática de los dominios de proteína BRCA1, el dominio RING en el amino terminal, dos dominios BRCT y dominio *Coiled-coil* en el carboxilo terminal. En respuesta al daño en el ADN, BRCA1 es fosforilada por varias quinasas, (ATM, CHK2 y/o ATR), formando diversos complejos que son reclutados a los sitios de daños mediante diferentes mecanismos. Las funciones de los complejos que forma BRCA1 después del daño en ADN no son completamente entendidos. La formación de estos complejos de BRCA1 es dependiente de las interacciones mutuamente excluyentes de sus dominios BRCT con motivos fosforilados dentro de Abraxas, BACH1, o CtIP. BRCA1 recluta a BRCA2 a los sitios de daño mediante la interacción con PALB2. La interacción de BRCA1 con BARD1 es importante para la estabilidad de BRCA1, así como para su función como supresor de tumor, ya que la pérdida de esta interacción está muy ligada al desarrollo de cáncer. Imagen modificada de Rosen E, 2013.

b. Diversos complejos de BRCA1.

BRCA1 es un componente clave de al menos 4 complejos, con RAP80 (BRCA1-A), con BACH1 (BRCA1-B), con CtIP (BRCA1-C) y BRCA1/PALB2 (FANCN)/BRCA2 (Figura 19). En todos ellos participa también BARD1, ya que BRCA1 existe como un heterodímero estable

con BARD1 (Huen, Sy et al. 2010). Se ha sugerido que el heterodímero BRCA1-BARD1 controla la replicación de centrosomas por la ubiquitinación de γ -tubulina (Parvin 2009). Adicionalmente, hay evidencia que este complejo modula el control del ciclo celular parcialmente por la inhibición del procesamiento del ARN en respuesta al daño de ADN (Kim, Li et al. 2006). Además, la importancia clínica de la función ubiquitín ligasa de BRCA1-BARD1 se ve evidenciada por la presencia de mutaciones en el dominio RING de BRCA1, que inactivan esta actividad enzimática en muestras tumorales (Prakash, Zhang et al. 2015). De igual manera, estudios bioquímicos han revelado que BARD1 potencia la actividad ubiquitín ligasa de BRCA1, y que además, puede ser revertida al suprimir la interacción BRCA1-BARD1 por medio de la proteína BAP1 (*BRCA-1 associated protein 1*, por sus siglas en inglés) (Huen, Sy et al. 2010). Por último, la formación del heterodímero BRCA1-BARD1, es importante para la estabilidad de BRCA1 (Nelson and Holt 2010).

A continuación, se describen de manera breve la conformación y las funciones de los complejos en los que BRCA1 participa.

i. Complejo BRCA1-A.

El complejo BRCA1-A está compuesto por, un motivo de interacción a ubiquitina (UIM) que contiene la proteína RAP80, una proteína adaptadora, Abraxas, MERIT40 (un mediador de las interacciones de RAP80, también conocido como NBA1), BRCC45 y la enzima deubiquitinasa BRCC36 (Figura I9) (Huen, Sy et al. 2010; Her, Soo Lee et al. 2016). Abraxas actúa como un adaptador entre BRCA1 y los otros componentes del complejo (Wang, Matsuoka et al. 2007). La serina 406 fosforilada (p-S406) del extremo carboxilo terminal de Abraxas es la responsable de la interacción con el dominio BRCT de BRCA1 (Huen, Sy et al. 2010; Her, Soo Lee et al. 2016). Se cree que BRCA1-A en respuesta a la acción de ATM, se dirige a los DSBs a través de la interacción entre el UIM de RAP80 y la lisina 63 poli ubiquitinada de la histona H2AX. MDC1, es reclutada hacia γ H2AX a través de su dominio BRCT (Ciccia and Elledge 2010), y es entonces fosforilada en su dominio TQxF, promoviendo el ensamblaje de RNF8 a través del dominio FHA (Luijsterburg and van

Attikum 2011). El reclutamiento de RNF8 promueve poli ubiquitinación en la lisina 63 de la histona (H1 K63) (Thorslund, Ripplinger et al. 2015); produciendo así cambios en la cromatina que son reconocidos por otra ubiquitin ligasa, RNF168, lo que expande la señal de ubiquitinación cerca de los DSBs y permite el reclutamiento de BRCA1 (Luijsterburg and van Attikum 2011; Luijsterburg and van Attikum 2012). Adicionalmente, se ha mostrado que el complejo BRCA1-A es necesario para una adecuada transición G2/M y la correcta activación del *checkpoint* en respuesta al daño (Huen, Sy et al. 2010; Her, Soo Lee et al. 2016).

ii. Complejo BRCA1-B.

El complejo BRCA1-B se comprende de BRCA1, TOPBP1 y BACH1, y está principalmente relacionado con *checkpoint* por estrés replicativo y en la reparación de entrecruzamientos intercatenarios (*Interstrand Crosslink Repair*, ICL, por sus siglas en inglés)(Figura I9)(Wang 2012). BACH1 interacciona con el dominio BRCT de BRCA1 cuando su serina 990 está fosforilada (p-S990), siendo esta fosforilación dependiente del ciclo celular, es decir, ocurre durante la fase S (Cantor, Bell et al. 2001; Yu, Chini et al. 2003). Defectos en la proteína BACH1 muestran una reducción en la HR y un retraso en la reparación del ADN (Cantor, Bell et al. 2001), además al ser un miembro de la familia de proteínas de la anemia de Fanconi, desempeña un papel en la reparación de ICL. TOPBP1 se asocia a BACH1 durante la fase S, y se sabe que es requerido para el progreso de la replicación así como el *checkpoint* replicativo (Kim, McAvoy et al. 2005).

iii. Complejo BRCA1-C.

El complejo BRCA1-C, está compuesto por BRCA1, CtIP y MRN (Figura I9). BRCA1-C tiene un papel en resección del ADN. La función exacta de BRCA1 en la reparación del daño en el ADN aun no es bien definida. En una búsqueda de interactores con el dominio carboxilo terminar BRCT de BRCA1 se identificó la interacción con CtIP (Wong, Ormonde et al. 1998; Yu, Wu et al. 1998). Tal como se describe anteriormente, el dominio BRCT de BRCA1 le

permite interactuar con un gran número de proteínas a través de residuos de serina que se encuentran fosforiladas, lo que sugiere que el principal papel de BRCA1 sería como una proteína reguladora (Savage and Harkin 2015).

Como se ha mencionado, la fosforilación en la S327 permite la asociación de CtIP con BRCA1 (Yu and Chen 2004). Esta interacción promueve la ubiquitinación de CtIP por la actividad ubiquitin-ligasa de BRCA1 (Yu, Fu et al. 2006). Defectos de recombinación homóloga debido a mutaciones heredadas en factores como BRCA1 y BRCA2 conducen a una predisposición elevada a cáncer (Prakash, Zhang et al. 2015). Mientras que el mecanismo molecular por el que mutaciones en BRCA2 resultan en una HR reducida está bien establecido (Hartlerode and Scully 2009; Ciccia and Elledge 2010), no está claro por qué ocurre así en mutantes BRCA1. Se ha postulado que la fosforilación en la S327 y la ubiquitinación de CtIP son requeridas para el reclutamiento de CtIP a los sitios donde el ADN está dañado y, por lo tanto, para la resección y la HR (Yu, Fu et al. 2006). Sin embargo, recientemente se ha descartado que la interacción entre CtIP y BRCA1 influya en la predisposición a tumores (Reczek, Szabolcs et al. 2013).

Por otro lado, reportes en células de pollo (DT40) expresando un alelo S332A mutante de CtIP, un equivalente al mutante S327A en humanos, sugieren que la interacción con BRCA1 tiene un papel importante en la elección en las vías de reparación (Yun and Hiom 2009). Dichas células muestran un defecto en reparación por recombinación homóloga, pero con una aún reparación por NHEJ y MMEJ funcional (Yun and Hiom 2009). Sin embargo, otro estudio también en células DT40 con la misma mutación S332A, mostraron que el bloqueo de dicha interacción exhibe un fenotipo silvestre en HR y no impide la proliferación celular como ocurre en células carentes de CtIP (Nakamura, Kogame et al. 2010). Las diferencias entre estos estudios aún no han sido resueltas. Interesantemente, resultados en ratones proveen otro punto de vista a esta controversia. Los datos de un estudio realizado en un ratón *Knock-in* para CtIP-S327A indican que la interacción CtIP-BRCA1 solo afecta levemente la resección del ADN, más aún, los ratones con los alelos mutados no exhiben una elevada susceptibilidad al cáncer (Reczek, Szabolcs et al. 2013).

De hecho, con esta mutación no se detectaron defectos en el mantenimiento de la estabilidad genómica o la viabilidad en células de ratón (Polato, Callen et al. 2014).

Por tanto, la importancia de la interacción entre CtIP y BRCA1 tanto en el proceso de resección como en la regulación de los *checkpoints*, sigue sin estar establecida. Existen aún discrepancias en su participación en la resección del ADN, ya que diversos estudios con mutantes que abolen la interacción CtIP-BRCA1 involucran o no a este complejo en la resección (Yun and Hiom 2009; Huen, Sy et al. 2010; Nakamura, Kogame et al. 2010; Polato, Callen et al. 2014). Uno de los principales objetivos de esta tesis ha sido desentrañar esta función (ver capítulo I de resultados).

iv. Otros complejos de BRCA1.

Por último, se ha identificado a BRCA1 en otro complejo, el cual contiene las proteínas PALB2 y BRCA2 (Zhang, Ma et al. 2009). El dominio *Coiled-coil* de BRCA1 es el responsable de la interacción con PALB2, que está asociado con BRCA2 y RAD51 (Zhang, Ma et al. 2009). Por formar el complejo BRCA1/PALB2/BRCA1, se propone a BRCA1 como orquestador del reclutamiento de BRCA2 a los DSBs. Así, BRCA2 atrae a RAD51 promoviendo la carga de este al filamento de ADNcs-RPA, para mediar la reparación por medio de HR (Huen, Sy et al. 2010).

V. Topoisomerasas de ADN y la reparación de cortes de doble cadena.

Con el modelo propuesto por Watson y Crick en 1953, se resolvió de manera elegante la estructura de la molécula que guarda la información genética, así como el mecanismo para la transmisión de dicha información de una generación a otra. Sin embargo, rápidamente Watson y Crick se dieron cuenta que, aunque el modelo de la doble hélice era espléndido también planteaba un problema crítico para la función biológica del ADN. Escribieron en su artículo original de 1953 en *Cold Spring Harbor*, “Como en nuestro modelo las dos cadenas están unidas una a la otra, es esencial que deban ser separadas...aunque es difícil a este momento ver como ocurre este proceso sin que todo se vuelva un enredo, nosotros pensamos que este obstáculo no es insuperable”. Así, se abrió un nuevo campo de investigación para elucidar como se separan estas cadenas y permitir procesos tan vitales como la replicación del ADN (Pommier 2011; Chen, Chan et al. 2013; Bush, Evans-Roberts et al. 2015).

El modelo de la doble hélice de Watson y Crick, está formado por dos cadenas anti paralelas de nucleótidos que giran en sentido dextrógiro alrededor del mismo eje (Pommier 2011). También se han descrito que las moléculas de ADN pueden ser lineales o circulares (Dulbeco and Vogt, 1963), al descubrirse que las moléculas de ADN circulares pueden estar retorcidas, es decir, súper enrolladas sobre sí mismas, se inició el campo de investigación conocido como topología del ADN (Chen, Chan et al. 2013). La topología del ADN, se definiría *grosso modo* como el estudio del súper enrollamiento de la molécula de ADN. Aunque la topología en sí es una rama de las matemáticas, la topología del ADN se encarga de estudiar las relaciones topológicas y tridimensionales de esta molécula (Higgins and Vologodskii 2015). El ADN puede asumir un gran número de estados topológicos distintos. En un estado de relajación en condiciones fisiológicas, hay aproximadamente 10 pares de bases por vuelta de la doble hélice en el ADN lineal, pero *in vivo* pueden ocurrir tanto el relajamiento como súper enrollamiento, resultando en un mayor o menor número de pares de bases por vuelta de la hélice del ADN (Clarke 2009). Para esta tesis basta con comprender que el ADN puede estar a su vez súper enrollado

(súper enrollamiento positivo, en el mismo sentido de la doble hélice) o relajado (súper enrollamiento negativo, en sentido contrario al ADN) (Bush, Evans-Roberts et al. 2015).

El estado topológico del ADN es regulado por una familia especial de enzimas denominadas topoisomerasas muy conservadas evolutivamente, presentes tanto en procariontes como eucariontes (Bush, Evans-Roberts et al. 2015). En humanos, tomando en cuenta que una célula contiene aproximadamente 2 metros de ADN que se encuentra compactado hasta alcanzar una estructura de 10 μm de diámetro (Deweese and Osheroff 2009), plantea varios obstáculos a procesos celulares como la replicación, la transcripción, la reparación y la recombinación, estos problemas solo pueden ser resueltos por cortes transitorios en las cadenas de la doble hebra, procesos llevados a cabo por las topoisomerasas, asegurando así la viabilidad celular (Champoux 2001). Estas enzimas se clasifican en dos clases altamente conservadas según si rompe una sola hebra del ADN (tipo I) o ambas hebras (tipo II) (Figura I10) (Pommier 2011). A pesar de estas diferencias, todas las topoisomerasas comparten dos propiedades: por un lado, cortan y sellan las hebras de ADN mediante reacciones de transesterificación, formando transitoriamente un intermediario covalente entre un hidroxilo de tirosina en la topoisomerasa y un fosfato del ADN (Pommier 2011; Chang, Wang et al. 2013; Bush, Evans-Roberts et al. 2015). La otra propiedad común es que permite el paso del otro segmento del ADN entre los extremos de las hebras transitoriamente cortadas (Chen, Chan et al. 2013). Las del tipo I catalizan el pasaje de una de las cadenas del ADN a través de un corte de cadena sencilla en la cadena complementaria y no requiere el uso de un cofactor energético para la catálisis (Figura I10- izquierda)(Pommier 2011). Las topoisomerasas del tipo II catalizan el pasaje de una cadena intacta del ADN a través de un corte transitorio de doble cadena que requiere la hidrólisis de ATP (Figura I10 derecha) (Bush, Evans-Roberts et al. 2015). Dadas estas diferencias en los mecanismos de acción, las topoisomerasas de tipo I están relacionadas principalmente con el relajamiento del ADN súper enrollado mientras que las del tipo II pueden resolver nudos, enredos y encadenamientos (Chen, Chan et al. 2013).

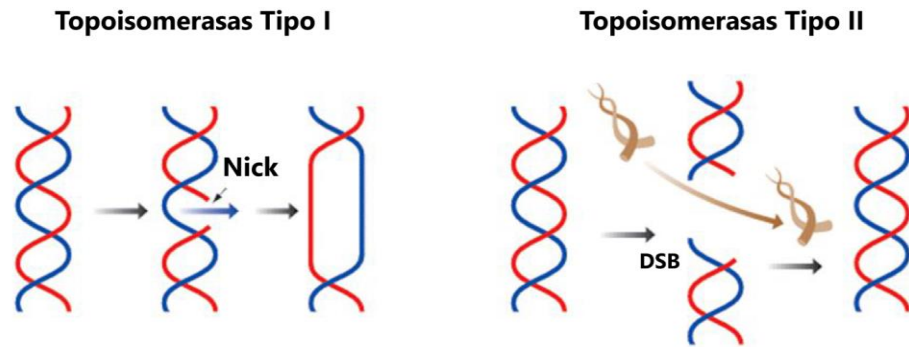


Figura I10. Tipos de topoisomerasas de ADN. Representación esquemática de las topoisomerasas tipo I y II. Las topoisomerasas tipo I son proteínas de 100 kDa, distribuidas tanto en procariotas como eucariotas. Pueden eliminar súper enrollamientos negativos pasando una cadena ADN por un corte en una de las cadenas. Las topoisomerasas tipo II también distribuidas desde procariotas hasta eucariotas, catalizan el paso de una doble cadena de ADN a través de un corte de doble cadena.

Para usos prácticos en esta tesis se desarrollará con más detalle lo descrito hasta ahora sobre las topoisomerasas tipo II, abordando su estructura, funciones y tratando de dar un enfoque en su implicación previa en reparación del ADN.

a. Estructura de las topoisomerasas tipo II.

Las topoisomerasas del tipo II se componen de tres dominios, en la región amino terminal, se encuentra el dominio catalítico de hidrólisis de ATP conocido como *N-gate*, la parte central donde reside el dominio de corte del ADN (*DNA-gate*) y por último la porción carboxilo terminal (*C-gate*) importante para interacciones con otras proteínas, y en la que además reside la secuencia de importe al núcleo (Figura I11)(Bush, Evans-Roberts et al. 2015). En humanos existen dos isoformas altamente relacionadas designadas como alfa, de 170kDa (TOP2A o TOP2 α), y beta, de 180kDa (TOP2B o TOP2 β), codificadas por diferentes genes en los cromosomas 17 y 3, respectivamente (Chen, Chan et al. 2013).

La dimerización de estas enzimas es pre requisito para su función, y aunque puede llegar a darse el caso de formación de heterodímeros sólo los homodímeros son funcionales

(Burden and Osheroff 1998; Pommier 2011). En cuanto a los patrones de expresión y funciones fisiológicas se encuentran algunas diferencias entre los dos tipos. La TOP2 α se expresa durante la proliferación celular, con un pico de expresión durante las fases S y G2 del ciclo celular (McClendon and Osheroff 2007). Además, está asociada con horquillas de replicación y se encuentra unida a los cromosomas durante la mitosis, por lo que se cree se encuentra asociada con procesos relacionados con el crecimiento celular como la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas (Deweese and Osheroff 2009). En contraste, TOP2 β tiene un patrón de expresión que no depende del estatus de proliferación celular, y se separa de los cromosomas durante la mitosis (McClendon and Osheroff 2007). Parece ser requerida para un adecuado desarrollo neuronal y aunque las funciones fisiológicas de esta aún no son esclarecidas por completo, existe evidencia que la asocia en la transcripción de genes regulados en el desarrollo y regulados hormonalmente (Deweese and Osheroff 2009).

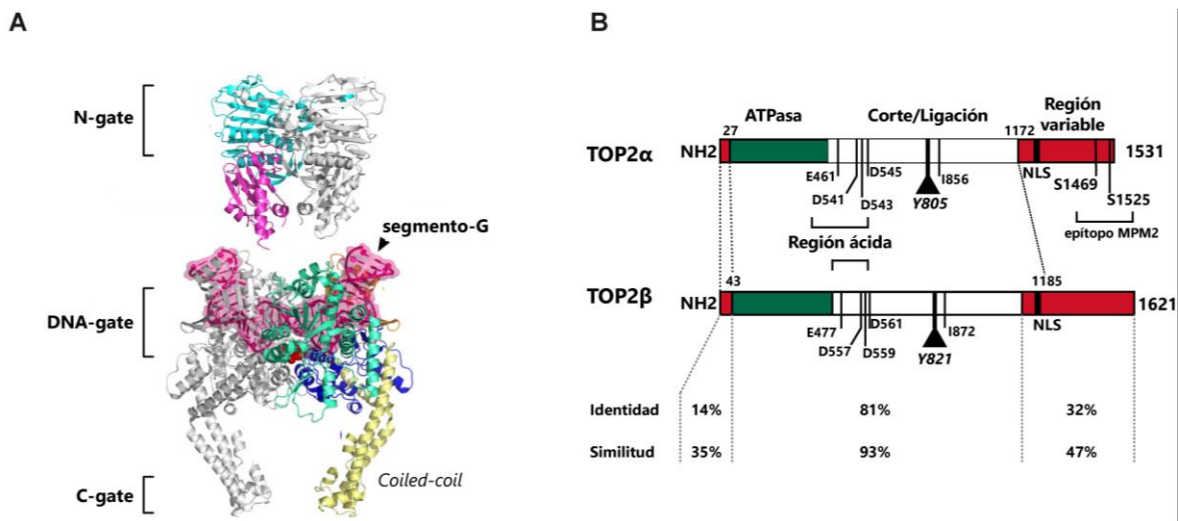


Figura 111. Estructura de las topoisomerasas tipo II. **A)** Estructura de la topoisomerasa tipo II. Un modelo estructural de TOP2 α humana. Este modelo hipotético se construyó sobre la base de las imágenes de EM de enzimas de longitud completa, con el dominio ATPasa y el transductor AMPPNP (la N-Gate, PDBid: 1ZXM,) en la parte superior y el núcleo de rotura de ADN (DNA-gate, PDBid: 4FM9) en la parte inferior. No hay información estructural actualmente disponible, para el dominio C-terminal de la eucariota TOP2 β . A destacar la dimerización de la TOP2 α y la formación bipartita de la N-, ADN y C-gate, una subunidad se muestra en gris y el otro es de color por los dominios individuales tal como se indica. **B)** Representación esquemática de las topoisomerasas humanas, isoformas TOP2 α y β . Tienen un alto grado de similitud en los

dominios ATPasa y el dominio de corte y ligación del ADN. Mientras que los dominios amino y carboxilo terminal son más divergentes. Los sitios catalíticos están señalados incluyendo las tirosinas Y805 y Y821 en la isoforma α y β respectivamente. (Imagen modificada de Chen,2013 y Pommier, 2010)

Adicionalmente, se ha descrito que las células pueden sobrevivir sin TOP2 β , pero no sin la TOP2 α , debido a su participación en eliminar los encadenamientos del ADN ocasionados por la replicación (Bush, Evans-Roberts et al. 2015). Otra notable diferencia entre ambas isoformas es que TOP2 α relaja (elimina) súper enrollamientos positivos 10 veces más rápido que los negativos en condiciones *in vitro*, mientras que TOP2 β parece no tener preferencias en el relajamiento del ADN (Deweese and Osheroff 2009).

b. Ciclo catalítico de las topoisomerasas tipo II.

Como se ha mencionado anteriormente, las topoisomerasas tipo II son homodímeros funcionales que dependen del cofactor energético ATP así como iones metálicos divalentes (Deweese and Osheroff 2009). Para resolver los problemas topológicos, estas enzimas utilizan una simple pero elegante reacción química reversible, la trans esterificación (Pommier 2011) (Figura I12). Brevemente, se cortan simultáneamente las dos hebras del ADN, de tal manera que dos tirosinas del centro activo sirven como nucleófilo atacando el fosfato 5' del ácido nucleico, quedando covalentemente unidas las tirosinas a los extremos fosfatos 5' del ADN (Bush, Evans-Roberts et al. 2015). Posteriormente, otra cadena intacta es transportada a través del corte (Hsieh, 1990). Este mecanismo les permite invertir entrecruzamientos de dos dobles hélices de ADN, pudiendo producirse reacciones de encadenamiento o desencadenamiento, anudamiento o desanudamiento, o la inversión de bucles de súper enrollamiento positivo o negativo (Wang 1998).

Diferentes estudios han permitido esclarecer su sofisticado mecanismo de transporte (Figura I12). El ciclo catalítico de estas enzimas puede separarse en seis pasos concretos:

1) Unión al ADN, 2) creación del corte de doble cadena en una hebra de ADN, conocida como segmento G (del inglés *Gate segment*), 3) transporte de otra hebra de doble cadena de ADN, denominado segmento T (del inglés, *Transported segment*), a través del corte generado anteriormente, 4) ligación del segmento G, 5) liberación del ADN transportado y por último, 6) cerrar la compuerta de la proteína confiriéndole la habilidad de volver a comenzar el ciclo (Deweese and Osheroff 2009).

La capacidad de las topoisomerasas para cortar y religar el ADN es primordial para sus funciones catalíticas. Como se ha mencionado, todas las topoisomerasas utilizan una tirosina en el sitio activo para mediar el corte y ligación del ADN (Chang, Wang et al. 2013). Dado que las topoisomerasas del tipo II cortan ambas cadenas de ADN cada monómero de la enzima contiene una tirosina en el sitio activo, la Tyr805 y Tyr821 en las isoformas α y β , respectivamente (Deweese and Osheroff 2009). El resultado del corte de la doble cadena es un enlace covalente fosfo-tirosina que une a la topoisomerasa al extremo 5' del ADN, pero generando también un extremo 3'-OH en el otro extremo de la cadena cortada (Clarke 2009). Los extremos cortados en las dos cadenas del ADN se encuentran en fase y se ubican en el surco mayor. De esta manera, se genera una cadena sencilla de ADN con extremos cohesivos en 5' de 4 bases de longitud. Y cada uno de los extremos se encuentra unido a un monómero diferente de la enzima (Ju, Lunyak et al. 2006).

El enlace covalente entre la enzima y el ADN tiene dos papeles importantes en el mecanismo de reacción de la topoisomerasa. Por un lado, se conserva la energía del enlace en el esqueleto del azúcar-fosfato y por el otro, elimina el riesgo que se separe la enzima de los extremos cortados, así manteniendo la integridad del material genético durante el proceso catalítico de estas enzimas (Chen, Chan et al. 2013). Este complejo covalente entre el ADN y la topoisomerasa es conocido como "complejo de rotura" (del inglés, *cleavage complex*), siendo de importancia como objetivo en estrategias farmacéuticas.

Introducción

enzimas TOP2 β producen extremos protuberantes de 2-bases (centro); y el ADN y *C-gate* se fusionan estructuralmente tal que la liberación coincide con el paso del segmento T. Después de la religación del segmento G, la segunda hidrólisis de ATP se lleva a cabo para restablecer la enzima. (Imagen modificada de Chen, 2013)

Aunque las topoisomerasas actúan de manera global se cree que tiene preferencias a sitios del ADN. Sin embargo el sitio consenso es débil, y muchos sitios de acción no se ajustan al mismo (Qi, Hou et al. 2011). En última instancia, el mecanismo por el cual la TOP2 elige el sitio de corte no es tan evidente y es casi imposible predecir los sitios *de novo* dado que cualquier secuencia puede ser cortada. Más probablemente, se deba a reconocimiento de estructuras más que a la secuencia específica en el ADN (Li, Wang et al. 2008).

Wang y colaboradores (Roca, Berger et al. 1996) establecieron que las enzimas operan vía a un mecanismo de dos pasos o dos compuertas, de modo que el proceso es unidireccional, de esta manera el segmento T entra por un extremo de la enzima y sale por el extremo contrario pasando por en medio del dímero en todo momento (Figura I12). La compuerta de entrada también conocida como *N-gate*, que corresponde a los dos dominios amino terminal, los cuales dimerizan por la unión de ATP y funcionan como una pinza sobre los nucleótidos. Por lo tanto, una *N-gate* abierta permite la entrada y/o salida del segmento G a la enzima, mientras que al cerrar el segmento T puede ser capturado y empujado a través del segmento G cortado. Seguido al pasaje de la cadena de ADN, el segmento T puede ser liberado por el otro extremo de la enzima, mejor conocido como *C-gate* (Chen, Chan et al. 2013).

Estudios cinéticos han dejado al descubierto que este proceso de múltiples pasos esta propulsado por la unión y subsecuente hidrólisis de dos moléculas de ATP. Mientras que el primer ATP consumido promueve el pasaje del segmento T a través del segmento G cortado, la segundo hidrólisis de ATP, resetea la enzima (Harkins, Lewis et al. 1998).

c. Inhibición de la actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II con agentes anticancerígenos.

Los compuestos que se usan contra las TOP2 se dividen en dos grandes grupos (Figura I13). El primero de ellos, el cual incluye la mayoría de compuestos de uso clínico en nuestros días, como etopósido, doxorubicina y mitoxantrona, lo forman químicos que conducen al incremento del complejo de rotura (Nitiss 2009). Debido a que estos complejos generan lesiones en el ADN que incluyen los DSBs, son comúnmente conocidos como venenos de las topoisomerasas. El segundo grupo, incluye compuestos que inhiben la actividad catalítica de la TOP2 pero no generan un incremento en el complejo de rotura, como merbarona y bisdioxopiperazinas (ICRF 159, 187 (dexrazoxano), y 193) (Chen, Chan et al. 2013). Los agentes dentro de este grupo son capaces de matar las células a través de la inhibición de la actividad catalítica de las TOP2, por lo tanto son llamados inhibidores catalíticos (McClendon and Osheroff 2007; Nitiss 2009).

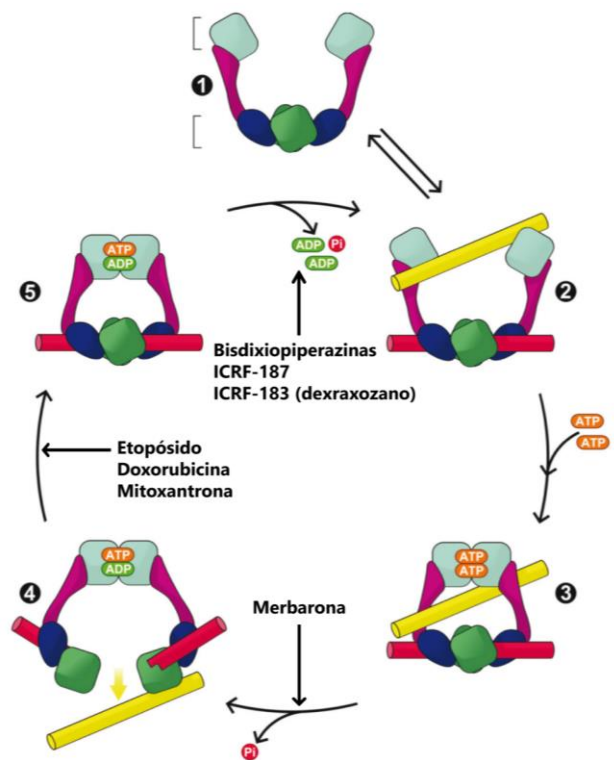
Existen muchas líneas de investigación que indican la importancia en distinguir ambos grupos. La generación de altos niveles de complejos de rotura conlleva efectos profundos en la fisiología celular (Chen, Sun et al. 2015). Los venenos de TOP2 bloquean efectivamente la transcripción y la replicación (Pommier 2013). Además, los DSBs son rápidamente detectados después de un tratamiento con estos venenos (Nitiss 2009). En consecuencia se puede conducir las células a apoptosis, de hecho el etopósido es un agente muy común para el estudio de procesos apoptóticos (Kaufmann 1998).

Por otro lado, el patrón de respuesta observado con los inhibidores catalíticos es muy diferente al observado con los venenos de TOP2, con algunas complicaciones ya que la mayoría de los inhibidores catalíticos no son específicos, a excepción de las bisdioxopiperazinas. Aunque las bisdioxopiperazinas activan el DDR a tratamientos largos (Wang and Eastmond 2002), estos no lo hacen a tratamientos cortos (Skoufias, Lacroix et al. 2004; Luo, Yuan et al. 2009). Interesantemente, en cultivos celulares se ha demostrado que los inhibidores catalíticos de TOP2 tienen la capacidad de antagonizar la toxicidad de

los venos (Jensen, Dejligbjerg et al. 2004), sugiriendo así que estos actúan por mecanismos que pueden ser separados.

Figura 113. Inhibidores de las topoisomerasas

tipo II. Las topoisomerasas tipo II pueden inhibirse en varios puntos diferentes del ciclo de reacción de la enzima, que pueden generar diferentes consecuencias bioquímicas y celulares. Un modo sencillo de inhibición es, bloquear una etapa temprana en el ciclo de la enzima. Por ejemplo, los inhibidores competitivos de unión de ATP que previenen el pasaje de cadena de ADN, y por tanto no generaran daño en el ADN mediante la enzima. Efectos similares se producirían con inhibidores que previenen la unión de TOP2 al ADN tales como aclarrubicina. Agentes que previenen el corte del ADN por TOP2, tales como merbarona se esperaría que actuaran como



inhibidores catalíticos simples. Un segundo modo de inhibición es bloqueando el ciclo catalítico después de romper el ADN, pero antes de la religación de este. Este modo de inhibición es el más utilizado actualmente por agentes como antraciclinas y epipodofilotoxinas. Estos agentes previenen la rotación de la enzima, y por lo tanto inhiben en gran medida la actividad catalítica de la enzima, sin embargo, el efecto más claro es la generación de altos niveles de complejos de rotura. Por lo tanto, estos inhibidores generan daños en el ADN, e interfieren con muchos eventos metabólicos de ADN como la transcripción y la replicación. Dado que los agentes de esta clase convierten TOP2 en un agente que induce el daño celular, que se han denominado venenos de la topoisomerasa. TOP2 puede ser inhibida después de que se complete el pasaje del segmento-T, pero antes de la hidrólisis de ATP y la disociación de la dimerización de N-terminal. Bisdioxipiperazines tales como dexrazoxano (ICRF-187) inhiben la hidrólisis de ATP y mantienen TOP2 como una pinza cerrada. Imagen modificada de Nitiss, 2009 y Larsen et al, 2003.

d. Uso clínico de la inhibición de las topoisomerasas tipo II.

La relevancia de las topoisomerasas de ADN va mucho más allá de sus funciones celulares; de hecho, son los objetivos de una serie de medicamentos contra el cáncer actualmente en uso clínico (Froelich-Ammon and Osheroff 1995; McClendon, Rodriguez et al. 2005). Como por ejemplo el etopósido (ETOP, VP-16) y doxorubicina que se dirigen principalmente contra la TOP2 α (Burden and Osheroff 1998), sino también camptotecina y irinotecán que se dirigen contra la topoisomerasa I (TOP1) (Larsen, Escargueil et al. 2003). Todos estos compuestos promueven la estabilización del intermediario reversible denominado complejo de rotura (Watt and Hickson 1994). Esta estabilización cambia la cinética de la reacción y produce que la enzima permanezca covalentemente unida al ADN, lo que provoca la conversión del complejo de rotura a un corte de cadena sencilla o corte de doble cadena, después de la replicación o con la maquinaria de transcripción, por la acción de los inhibidores de TOP1 o venenos de TOP2 respectivamente (Froelich-Ammon and Osheroff 1995).

La manera en que se ve afectada la progresión del ciclo celular por estos fármacos depende de que cuál se utiliza así como el tiempo de la exposición, por lo tanto los venenos de TOP2 influye sobre todo en la progresión a través de G2/M con casi ningún efecto sobre la progresión de la fase S, mientras que la exposición a los inhibidores de TOP1 afectará principalmente a la fase S (Larsen, Escargueil et al. 2003). La exposición a venenos de TOP2 tiene múltiples efectos celulares como alterar la expresión génica y la detención del ciclo celular, pero probablemente la más importante de todas ellas es la activación de la respuesta al daño del ADN (Larsen, Escargueil et al. 2003).

e. Regulación de las topoisomerasas tipo II.

Más allá de actuar como un ente independiente, las TOP2 actúan en eventos celulares que producen enredos en el ADN. La integración y la regulación de las actividades funcionales

se pueden lograr mediante la modificación postraducciona l y por la interacción con proteínas reguladoras, posiblemente resultando en cambios en la actividad catalítica, la localización subcelular, o la vida media de la proteína (Chen, Sun et al. 2015). Un dominio particular involucrado en esto, es el dominio carboxilo terminal (CTD). Aunque la eliminación del CTD no conlleva a una pérdida en la función catalítica, las funciones celulares de estas proteínas truncadas se deterioran en gran medida (Chen, Chan et al. 2013). Además, ya que el CTD sirve como una plataforma para interactuar con otras proteínas, el CTD es objeto de varias modificaciones post traduccionales, entre las que la fosforilación y la sumoilación se encuentran más estudiadas (Chang, Wang et al. 2013).

Las fosforilaciones y sumoilaciones en el CTD median la interacción con otras proteínas. Por ejemplo, la fosforilación en la serina 1524 (p-S1524) del CTD, es requisito para la interacción con MDC1, esta interacción es importante para el *checkpoint* (Luo, Yuan et al. 2009). Interesantemente la TOP2 α puede ser fosforilada por la quinasa activada por el mitógeno P38 γ y la quinasa *Polo-like 1* (Li, Wang et al. 2008), quinasas conocidas por sus funciones en regulación de los *checkpoint* del ciclo celular y la segregación de cromosomas (Chen, Chan et al. 2013). Adicionalmente, algunos estudios reportan que las fosforilaciones en el CTD de la TOP2 son cruciales para la localización nuclear de la enzima, debido a que mutantes o deleciones en las serinas 1376 o 1524 no conllevan a una inactivación de la actividad catalítica (Chen, Sun et al. 2015). Sin embargo, Chikamori et al, demostraron que la S1106 es el principal sitio de fosforilación en el dominio catalítico de TOP2 α y una mutación a alanina, S1106A, causa una disminución en la actividad catalítica de la enzima (Chen, Sun et al. 2015). De acuerdo con esto, se ha visto que una hipo fosforilación de la S1106 puede relacionar con resistencia a etopósido (Ganapathi and Ganapathi 2013). En conjunto esto hallazgos establecen a la fosforilación de S1106 como un regulador crítico en la función de decatenación de TOP2 α (Chen, Sun et al. 2015). Por otro lado, la sumoilación regula la cohesión o segregación de TOP2 a los centrómeros (Ganapathi and Ganapathi 2013).

Durante la replicación del ADN, TOP2 lleva a cabo funciones que son altamente reguladas: Las cromátidas hermanas unidas deben ser resultas después de la replicación, pero la unión de los centrómeros hermanos aún debe ser mantenida antes del inicio de la anafase para permitir la cohesión de las hermanas y el equilibrio de tensión entre los cinetocoros yuxtapuestos (Chen, Chan et al. 2013). La sumoilación de TOP2, está envuelta en la regulación de su función durante la segregación de los cromosomas. Sumo ligasas E3 como la familia PIAS y RANBP2 median la función de Top2 en los centrómeros (Azuma, Arnaoutov et al. 2003).

Al igual que la sumoilación, la ubiquitinación puede ejercer efectos regulatorios en TOP2, un ejemplo la ubiquitinación de TOP2 α a través de BRCA1 estimula la actividad de decatenación sin afectar la estabilidad de la proteína, sugiriendo un efecto que es independiente del proteosoma (Lou, Minter-Dykhouse et al. 2005).

f. CtIP y topoisomerasas.

Como las polimerasas de ADN y ARN son procesivas, es decir, se van trasladando a lo largo del ADN, crean superenrollamiento positivo y negativo en la doble hélice, el cuál se elimina por acción de las topoisomerasas (Liu and Wang 1987; Champoux 2001). Los inhibidores y los venenos de la topoisomerasa interrumpen el ciclo completo de estas enzimas, estos últimos creando roturas en el ADN con aductos terminales con topoisomerasa (Pommier and Cherfils 2005; Pommier, Kiselev et al. 2015). Las ADN-tirosil-fosfodiesterasas (Tdp1 y -2) eliminan las topoisomerasas atrapadas que se han sido procesadas en parte por el proteosoma, generando DSBs limpias (Pommier, Huang et al. 2014). CtIP también juega un papel importante en la resolución de los aductos de la topoisomerasa ya que células deficientes de CtIP exhiben una marcada sensibilidad a los venenos de estas enzimas (Sartori, Lukas et al. 2007). Por otra parte, mutantes de CtIP sin actividad nucleasa, es capaz de llevar a cabo la reparación de los DSBs limpios, pero no rescata la sensibilidad frente a estos venenos, lo que sugiere que hay un subconjunto de

Introducción

aductos de la topoisomerasa que requieren la actividad nucleasa de CtIP (Makharashvili, Tubbs et al. 2014; Wang, Li et al. 2014). En base a experimentos en las células DT40, la vía dependiente de CtIP va en paralelo con la vía mediada por Tdp1 en el procesamiento del aducto de la topoisomerasa I (Pommier, Huang et al. 2014).

OBJETIVOS

En esta tesis nos propusimos investigar las funciones de diversas proteínas humanas en la procesividad de la resección del ADN. Para ello, planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar y validar el papel de la interacción entre CtIP y BRCA1 en la respuesta al daño en el ADN.
2. Analizar el efecto del complejo CtIP-BRCA1 sobre la resección del ADN.
3. Estandarizar una técnica de mayor resolución para medir la resección de ADN.
4. Explorar la implicación de las topoisomerasas del tipo II en la resección del ADN.

RESULTADOS

CAPITULO I:

**REGULACIÓN DE LA VELOCIDAD DE
RESECCIÓN POR EL COMPLEJO CtIP-BRCA1.**

I. Caracterización de clones estables que expresan variantes de CtIP en el sitio de interacción con BRCA1.

Con el propósito de elucidar el papel del complejo CtIP-BRCA1 en la respuesta al daño por los cortes de doble cadena, y teniendo en cuenta que la interacción entre CtIP y BRCA1 es fosfodependiente, es decir, solo ocurre cuando CtIP es fosforilado en la serina 327 (S327), gracias a la acción de CDK (Yu and Chen 2004). Para llevar a cabo este proyecto, se utilizaron líneas celulares humanas que expresan de forma estable y constitutiva fusiones traduccionales de la proteína verde fluorescente (GFP) con diversos mutantes de CtIP. En concreto, se utilizaron versiones mutadas de la serina 327 a alanina (S327A) o a ácido aspártico (S327D). Mientras que el primero evita la fosforilación de CtIP por CDK en la S327 y, por tanto, debe bloquear la interacción con BRCA1, como se ha demostrado en estudios anteriores (Yu and Chen 2004; Chen, Nievera et al. 2008; Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Reczek, Szabolcs et al. 2013), el segundo podría actuar como un mimético de la forma fosforilada (fosfomimético), por lo que presuponíamos iba a promover una interacción constitutiva con dicho factor. Como controles se usaron células que expresan la fusión GFP-CtIP silvestre o que expresan exclusivamente GFP. Previamente al inicio de este trabajo, en el laboratorio se habían seleccionado clones que portaban fusiones traduccionales que se expresaran a niveles similares entre ellos, figura R1A. Además, dichas fusiones fueron manipuladas para hacerlas resistentes a silenciamiento por ARNi. Como se observa en la figura R1A la expresión del shRNA contra CtIP endógeno funcionó de manera notable, eliminando casi en su totalidad la versión endógena de la proteína y, además, no afectaba la expresión de las proteínas de fusión, lo que nos permitiría comparar de forma fiable los resultados entre ellos. CtIP cuenta con numerosas funciones dentro del contexto celular, una de ellas es ayudar en la transición de las fases G1 a S en el ciclo celular (Chen, Liu et al. 2005). Por tal motivo se evaluó el impacto en el ciclo celular de la sobre expresión de las variantes de GFP-CtIP y los mutantes en células U2OS para comprobar que esta no afectara la correcta progresión del mismo. En la figura R1B se refleja que no existía diferencia significativa entre los dos

mutantes de CtIP así como con CtIP silvestre, indicando que la sobre expresión de los mutantes o del CtIP silvestre no comprometía el transcurso normal del ciclo celular. Para el resto de los experimentos realizados en este capítulo, al menos que se indique lo contrario, se optó por silenciar la proteína endógena CtIP por medio de shRNA contra su transcrito, asegurando, así como única fuente de CtIP en las células utilizadas fuese la proteína de fusión GFP-CtIP y sus variantes.

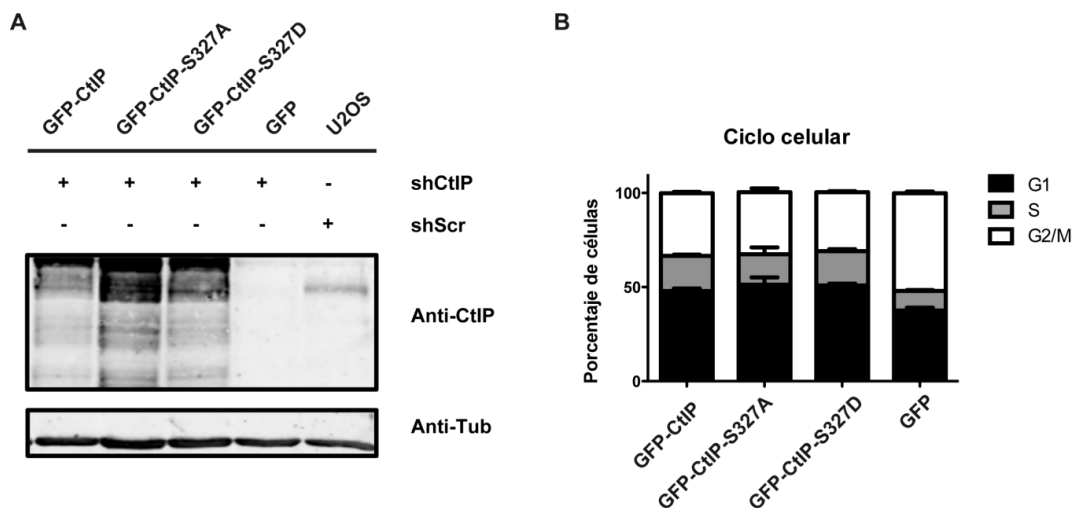


Figura R1. Niveles de expresión de los derivados de GFP-CtIP **A)** Niveles de expresión de las variantes de GFP-CtIP así como los respectivos mutantes de CtIP después de la depleción de CtIP endógeno usando un shRNA contra su transcrito (shCtIP). Como control se usaron U2OS infectadas con shRNA sin blanco en el genoma humano (shScr). **B)** Análisis de ciclo celular de las variantes de GFP-CtIP en células U2OS, tras el silenciamiento del CtIP endógeno. La media y la desviación estándar de tres experimentos independientes se encuentran indicados.

II. Los mutantes de CtIP en la serina 327 modifican la interacción con BRCA1

En primer lugar, se procedió a comprobar la interacción entre las proteínas CtIP y sus variantes con la proteína BRCA1. Para ello se realizó una inmunoprecipitación usando resina magnética con anticuerpos anti-GFP unida a ella, que serviría como anzuelo para la fracción GFP de la proteína de fusión GFP-CtIP. Para facilitar la inmunoprecipitación, el experimento se llevó a cabo con extractos de células HEK293 expresando de forma estable las fusiones traduccionales GFP-CtIP y sus variantes, así como GFP sólo, como control.

Dichas células fueron cotransfectadas a su vez con los plásmidos para la expresión de SFB-BRCA1 (SFB por sus siglas en inglés, *S-tag*, *Flag epitope tag*, and *streptavidin-Binding peptide tag*) y HALO-BARD1 (etiqueta, *Haloalcano* deshalogenasa). Asegurábamos así incrementar la cantidad de la proteína BRCA1 en las células, facilitando la interacción entre CtIP-BRCA1 y su detección mediante inmunoblot. En la figura R2A, se muestra una representación esquemática de cómo las variantes de CtIP se preveía afectarían la interacción a nivel proteico con BRCA1. En el panel de la figura R2B, se observa el inmunoblot resultado de la inmunoprecipitación (izquierda) y la cantidad inicial de proteína de la cual se partió para el experimento, "Input" (derecha). Como se puede observar en dicha figura, en el carril correspondiente al CtIP silvestre, había una clara interacción con BRCA1, al igual que se había reportado en diferentes estudios anteriores (Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010). También de acuerdo con lo descrito (Yu, Fu et al. 2006; Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Reczek, Szabolcs et al. 2013), el cambio de la S327 a alanina, impidió la interacción de CtIP con BRCA1. Por primera vez demostramos que el mutante fosfomimético era capaz de recuperar la interacción entre CtIP y BRCA1. Mientras, la ausencia de CtIP provocó una pérdida de señal en la banda correspondiente a SFB-BRCA1 en el *western blot*, representado por las células que expresan GFP. En el panel correspondiente al input (Fig. R2B, derecha) se puede observar que se parte prácticamente de la misma cantidad de proteína SFB-BRCA1 en cada uno de los mutantes, pero es notable que la expresión de la variedad fosfomutante S327A era mayor en comparación con las otras variedades de GFP-CtIP. Esto indicaba que aun cuando existía mayor cantidad disponible de CtIP-S327A en la célula, esta no era capaz de unirse a BRCA1. En el panel de D de la figura R2, se indican los inmunoblots para las fracciones que no se unieron a la resina anti-GFP (fracción no unida), así como también el *western blot* correspondiente al primer lavado después de la incubación para promover la interacción entre la resina magnética con anticuerpos anti-GFP y las proteínas de fusión GFP y sus variantes.

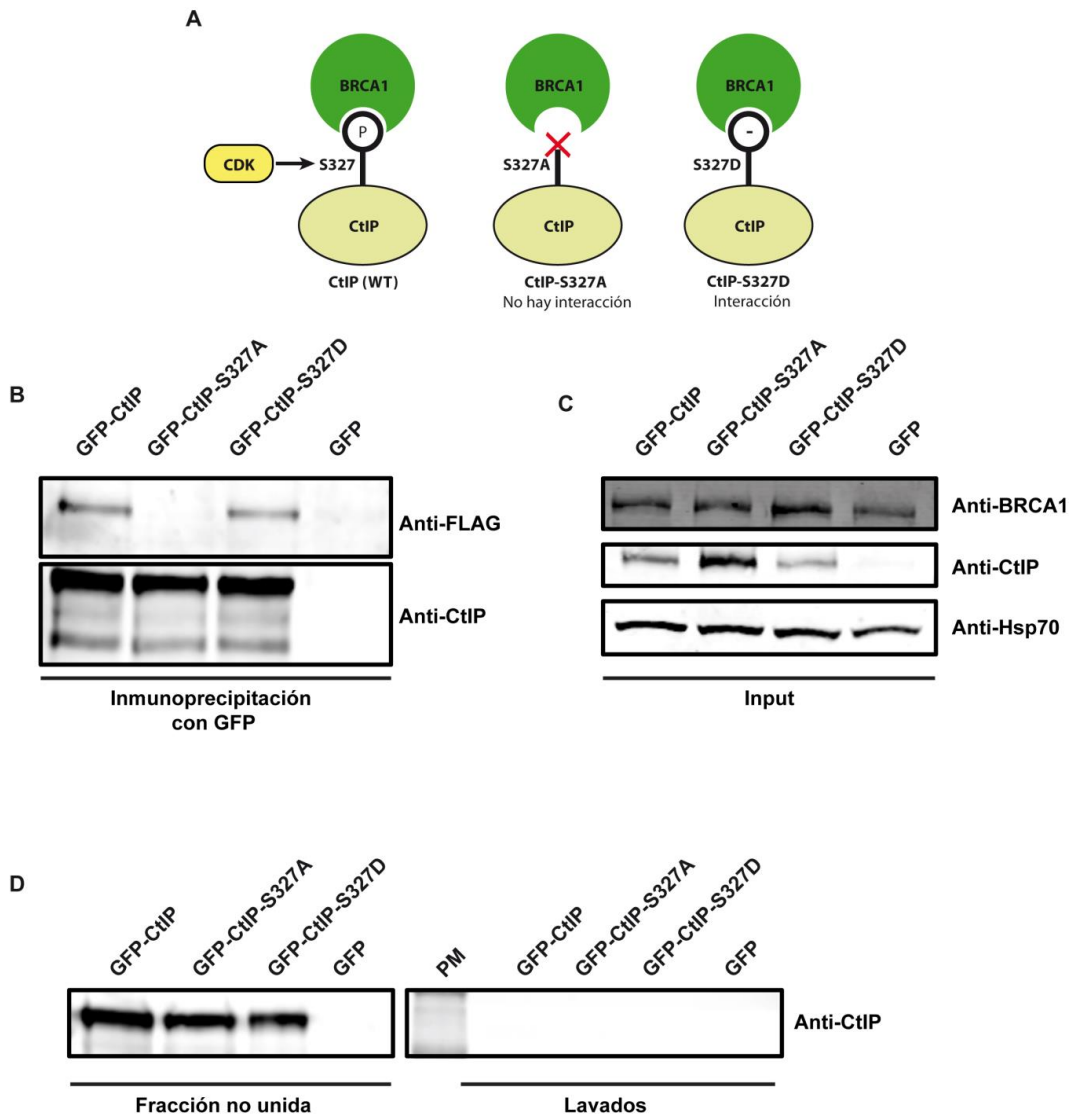


Figura R2. Mutantes de CtIP que modifican la interacción con BRCA1. **A)** Representación esquemática donde se aprecia la modificación de la interacción de CtIP y BRCA1 con los diferentes mutantes de CtIP. **B)** Interacción de GFP-CtIP y sus variantes con SFB-BRCA1. **C)** Extractos proteicos de células HEK293 de cada una de las variantes de GFP-CtIP y cotransfectadas con SFB-BRCA1, HALO-BARD1. **D)** Fracción no unida y primer lavado en la inmunoprecipitación. En todos los casos, las muestras se extrajeron con tampón nativo, como se explica en materiales y métodos, y fueron resueltas en SDS-PAGE e incubadas con los anticuerpos indicados. *Peso Molecular (PM).

III. Respuesta del complejo CtIP-BRCA1 frente a roturas de doble cadena.

Con el fin de entender el papel que desempeña el complejo CtIP-BRCA1 en la respuesta al daño de los cortes de doble cadena, se indujeron lesiones en el ADN y se probó la sensibilidad de las células frente a agentes genotóxicos en ensayos de supervivencia celular, denominados ensayos clonogénicos. Para inducir cortes de doble cadena se usaron diversas estrategias: tratamiento con camptotecina (CPT), un veneno de la topoisomerasa I que por su mecanismo de acción conlleva a cortes de doble cadena después de la replicación del ADN, es decir, ocasiona los cortes en fase S del ciclo celular; se usó también etopósido (ETOP), veneno de la topoisomerasa II que produce cortes de doble cadena sin importar el estadio en el ciclo celular al estabilizar los denominados complejos de rotura, una fase intermedia del ciclo activo de esta enzima, en la que el ADN permanece roto y unido covalentemente con la topoisomerasa II; y finalmente la irradiación con rayos gamma (IR), que crea roturas en el ADN en todas las fases del ciclo celular. Para llevar a cabo los ensayos clonogénicos, se usaron cultivos asincrónicos de U2OS, que expresan de forma estable la GFP, las proteínas de fusión GFP-CtIP y los 2 mutantes anteriormente mencionados (fosfomutante (S327A) y fosfomimético (S327D)). Las células se expusieron a los agentes durante una hora en el caso de camptotecina, etopósido o DMSO como control. En el caso de IR, los cultivos se trataron con una dosis de 10 Gy, descrito en la sección de materiales y métodos. Como se muestra en la figura R3 el mutante S327A, que pierde la capacidad de interactuar con BRCA1, reflejó una sensibilidad muy similar a las células que no tienen CtIP (células GFP) y dramáticamente inferior al compararlas con las células silvestres (GFP-CtIP), frente a todos los tratamientos, IR, CPT y ETOP (Fig. R3A, B y C). Por otro lado, las células que expresaban el fosfomutante S327D, que mantiene la capacidad de interactuar con BRCA1, presentaron una sensibilidad similar a las células silvestres ante la radiación ionizante y el ETOP (Fig. R3A y C), y ligeramente superior en comparación a las células silvestres, frente a la acción de la CPT (Fig. R3B).

Resultados

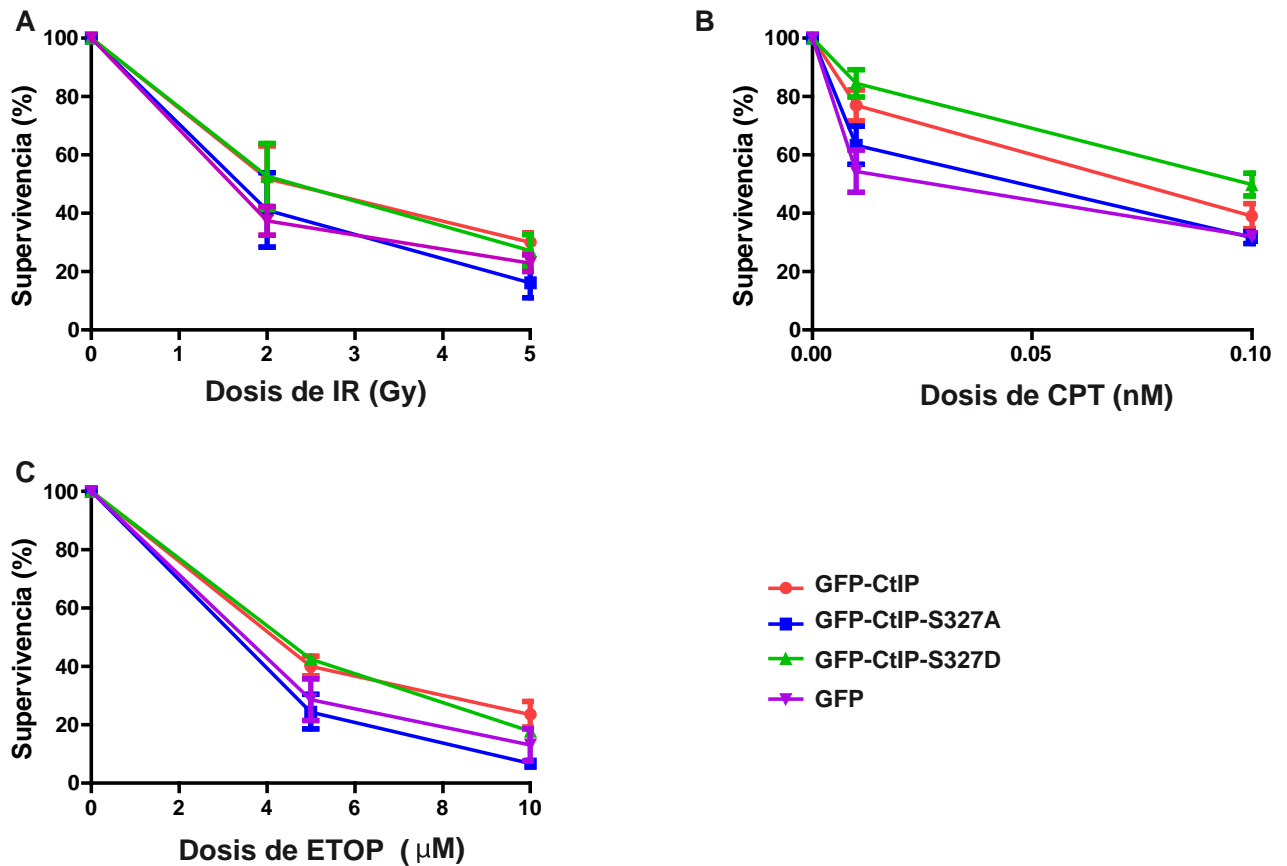


Figura R3. Ensayo de viabilidad de células mutantes de CtIP expuestas a agentes genotóxicos. Ensayo clonogénico de cultivos asincrónicos expuestos a radiación ionizante (IR) (A), camptotecina (CPT) (B) y etopósido (ETOP) (C). Tres experimentos independientes fueron realizados, se indican la media y la desviación estándar.

Para corroborar que los resultados obtenidos en los ensayos clonogénicos de los mutantes de CtIP se debían a la pérdida de interacción con BRCA1, se decidió realizar ensayos clonogénicos produciendo un silenciamiento con ARNi contra la proteína BRCA1. De igual manera que los ensayos anteriores, se utilizaron células U2OS, que fueron infectadas con lentivirus con shRNA contra el gen BRCA1 y sometidas a selección con antibiótico previamente a la realización del experimento. Se probaron los mismos agentes genotóxicos, CPT y ETOP. Como se aprecia en la Fig. R4, la pérdida de BRCA1 debida al silenciamiento con ARNi, provocó que las células fuesen más sensibles frente a la CPT y el

ETOP cuando se comparó con células que fueron infectadas con un shRNA control (Fig. R4A y B).

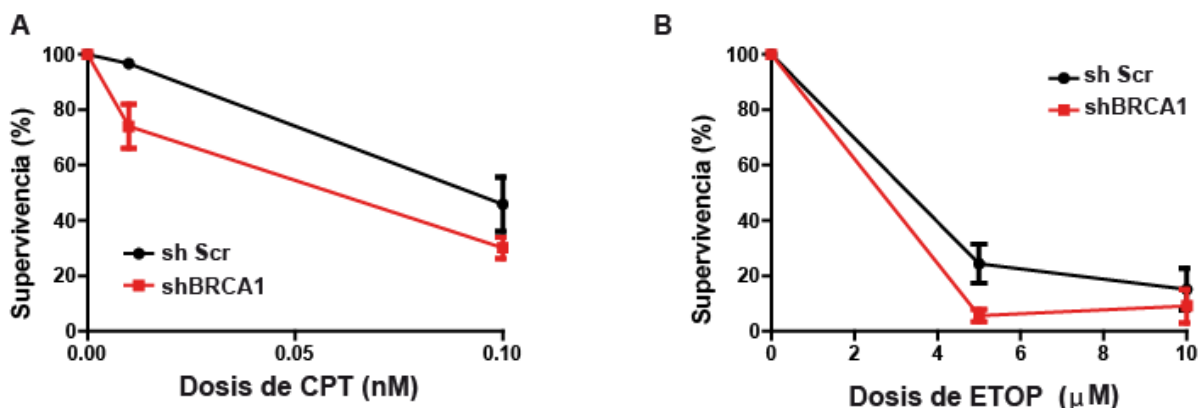


Figura R4. Ensayo clonogénico de células silenciadas de BRCA1 frente a agentes genotóxicos. Ensayo clonogénico de cultivos asincrónicos expuestos a camptotecina (CPT) (A) y etopósido (B). Tres experimentos independientes fueron realizados, se indican la media y la desviación estándar.

IV. El complejo CtIP-BRCA1 y el procesamiento del ADN.

Los resultados obtenidos de los ensayos clonogénicos demuestran una implicación del complejo CtIP-BRCA1 en la respuesta al daño de cortes de doble cadena. Debido a que un paso importante en la reparación de este tipo de cortes es el procesamiento del ADN, denominado resección de ADN y que la proteína CtIP es la principal promotora de este evento dentro de la célula, se investigó si el complejo CtIP-BRCA1 tiene un papel en dicho proceso. Por lo tanto, se evaluaron la formación de focos de RPA en las distintas líneas celulares como un indicativo del proceso de resección, ya que la formación de ADN de cadena sencilla siempre va acompañada por la localización del complejo protector RPA. De igual manera que los ensayos anteriores, para la generación de cortes de doble cadena en las células se utilizaron los tratamientos con IR, CPT y ETOP.

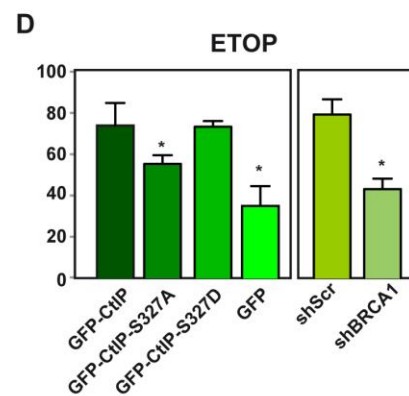
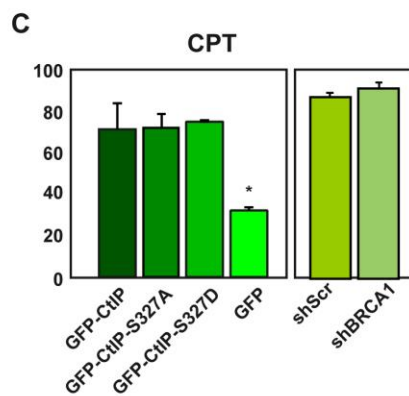
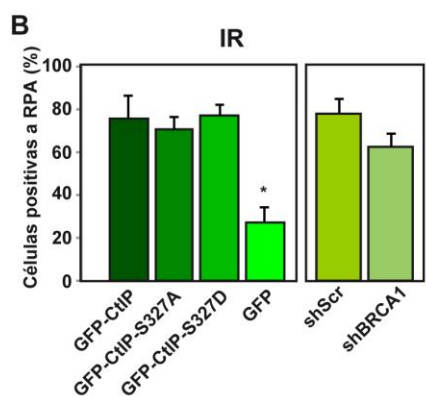
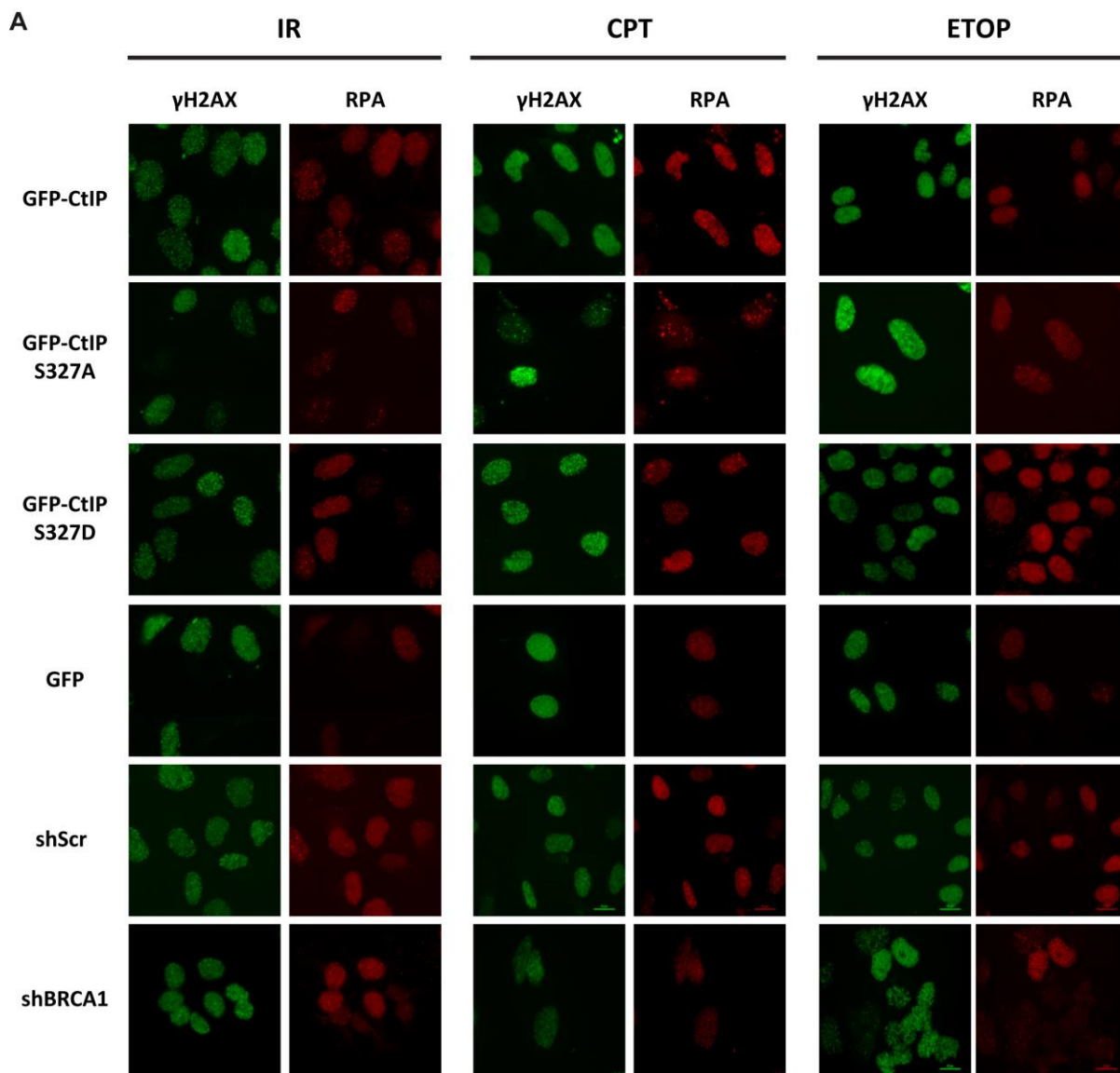


Figura R5. Papel del complejo CtIP-BRCA1 en el procesamiento de los cortes en el ADN. A) Inmunofluorescencia de células U2OS expresando variantes de GFP-CtIP, GFP o silenciadas con shBRCA1 y shScr, inmunoteñidas para RPA (rojo), γ H2AX (verde) una hora después de ser tratadas con 10Gy de radiación ionizante (IR), 1 μ M de camptotecina (CPT) o 10 μ M de etóposido (ETOP). B-D) Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA siendo positivas para γ H2AX, una hora después de haber sido tratadas con IR, CTP y ETOP respectivamente. Se indican la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

En la figura R5 se exhiben imágenes representativas de inmunofluorescencias de los diferentes tipos celulares frente a los diversos agentes, así como los histogramas resultado de las cuantificaciones de la aparición de células positivas para focos de RPA en cada una de ellas. Para la cuantificación, se contaron como células positivas para RPA aquellos núcleos entre los que eran positivos para la tinción de la histona γ H2AX, que es un marcador de presencia de daño en el ADN. Esto cobra importancia especialmente en los casos con el tratamiento con camptotecina que sólo causa daño en una subpoblación de células, las que están replicando durante el tiempo del experimento. Al llevar a cabo las cuantificaciones, expuesto en la figura R5, las células que expresan GFP-CtIP fueron capaces de formar focos de RPA para los tres tipos de tratamientos realizados (IR, Fig. R5B; CPT, Fig. R5C; y ETOP, Fig. R5D), mientras que en las células que solo expresan GFP se observó una clara reducción en el número de células positivas para focos de RPA en todos los tratamientos, de acuerdo con lo previamente publicado (Sartori, Lukas et al. 2007; Huertas and Jackson 2009). Estos datos confirman que la presencia de CtIP es necesaria para la formación de focos de RPA, además que la fusión traduccional GFP-CtIP es totalmente funcional y complementa la falta de la proteína endógena. El mutante GFP-CtIP-S327D se comportó como una proteína silvestre y fue capaz de formar focos de RPA para los tres tratamientos (Fig. R5B-D). Interesantemente, el mutante GFP-CtIP-S327A, que es incapaz de interactuar con BRCA1, se comportó también como el CtIP silvestre ante radiación ionizante y camptotecina (Fig. R5B y R5C), sugiriendo que el proceso de resección se llevaba a cabo aún sin la formación del complejo CtIP-BRCA1. Estos datos confirman algunas observaciones previas en otros organismos modelos y contradicen los datos de otros autores (Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Reczek,

Szabolcs et al. 2013). En el caso del tratamiento con el etopósido, se obtuvo una ligera pero significativa reducción en el número de células con focos de RPA, sugiriendo que la presencia del complejo CtIP-BRCA1 es especialmente requerida para el procesamiento de los extremos de los cortes generados por el veneno de la topoisomerasa II, pero no de los que aparecen como consecuencia de la radiación ionizante o camptotecina.

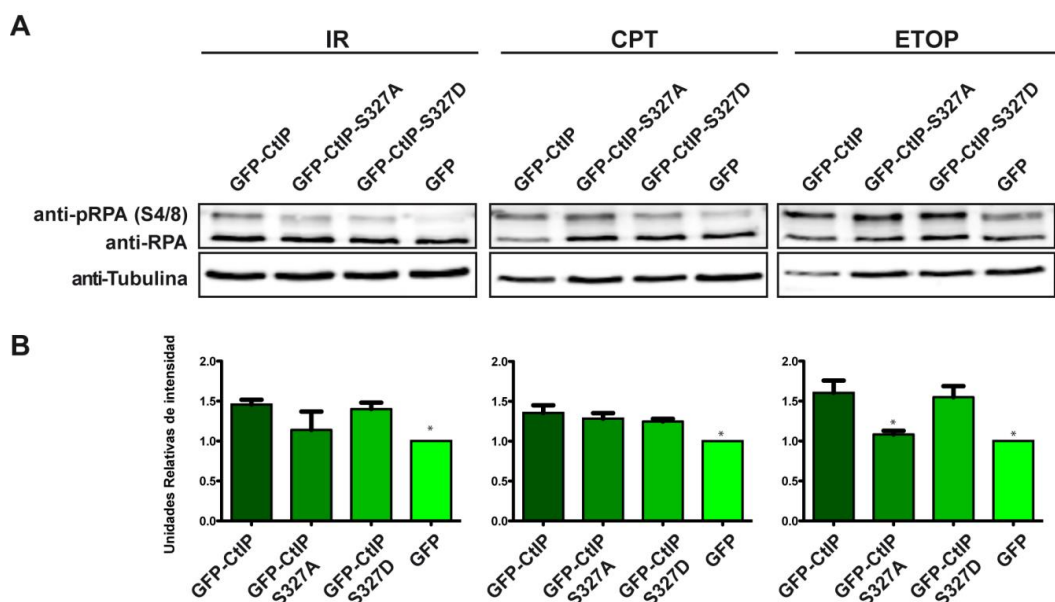


Figura R6. Detección de la forma fosforilada de RPA32. Inmunoblot para pRPA (S4/8) y RPA en extractos de proteínas de células U2OS expresando GFP-CtIP y sus variantes. Los extractos fueron recogidos 1 hora tras el tratamiento indicado (IR, CPT o ETOP), se representa la cuantificación de la señal del ratio pRPA/RPA para cada caso. La media y la desviación estándar de tres experimentos independientes están indicados.

Así mismo, se realizaron inmunofluorescencias en células silenciadas de la proteína BRCA1. Como se muestra en la figura R5A-D, en las células que carecen de BRCA1 no existió una diferencia significativa en el número de células que presentan focos de RPA, estos resultados están conforme a los mismos obtenidos con el mutante S327A, donde indican que el complejo CtIP-BRCA1 no es esencial para el procesamiento del ADN. Notablemente, las células carentes de BRCA1 reflejaron una clara disminución en el número de focos de RPA cuando fueron tratadas con etopósido (Fig. 5D, derecha), dando más fuerza a la

hipótesis que el complejo CtIP-BRCA1 es especialmente necesario para el procesamiento del ADN causado por roturas provocadas con el veneno de la topoisomerasa II.

Resultados coherentes se obtuvieron cuando se observó la fosforilación de la serina 4 y 8 de RPA32 (pRPA) por medio de *western blot* (Fig. R6A). Esta modificación post-traducciona l de la subunidad pequeña del complejo RPA ocurre exclusivamente cuando está unida al ADN de cadena sencilla, es decir, en respuesta a la resección (Shao, Cao et al. 1999; Sakasai, Shinohe et al. 2006). Al medir la intensidad de la señal producida por el inmunoblot contra RPA y pRPA respectivamente, se vio claramente que no existe una diferencia significativa entre el nivel de fosforilación de RPA después de dañar las células con radiación ionizante o camptotecina, sin embargo, se advirtió una clara reducción en los niveles de RPA fosforolizada en las serinas 4 y 8 después de tratar las células con etopósido (Fig.6B), lo cual fue un indicativo más que la interacción entre CtIP y BRCA1 es necesaria para el procesamiento de los cortes de doble cadena ocasionados por el etopósido.

V. El complejo CtIP-BRCA1 y la activación del checkpoint de ATR.

Ya que el ADN de cadena sencilla recubierto de RPA es uno de los principales desencadenantes de activación de ATRIP-ATR; como medida alternativa para evaluar el procesamiento del ADN se analizó el grado de activación de dicho *checkpoint* mediante la detección de la fosforilación de Chk1 en la S345 (pChk1) por *western blot*. Como se expone en la figura R7A, las células GFP-CtIP fueron capaces de activar de manera adecuada el *checkpoint* de ATR ante los tres tratamientos realizados, ya que se observó la presencia de Chk1 fosforilada en la S345. Como era esperable, en aquellas células que sólo expresan GFP, se observó una señal menor para pChk1 S345 ante los tres tratamientos (Fig. R7A). Estos datos corroboran que la resección mediada por CtIP es necesaria para la correcta activación de ATR. En el caso del mutante S327A, se produjo una reducción de la fosforilación de Chk1 en S345 ante los tres tratamientos, lo cual se hizo evidente al

realizar una cuantificación a la intensidad de la señal de las bandas obtenidas en el *western blot* (Fig. R7B). Aunque la cuantía de esta reducción era variable entre tratamientos y podía responder a una especificidad con el tipo de lesión, claramente mostraba que la expresión de la mutación S327A afectaba a la activación del *checkpoint* de ATR, medida por la fosforilación de Chk1. El mutante S327D se comportó igual que el CtIP silvestre, ante los tres tratamientos, obteniendo niveles muy similares en la cuantificación del inmunoblot (Fig. R8B).

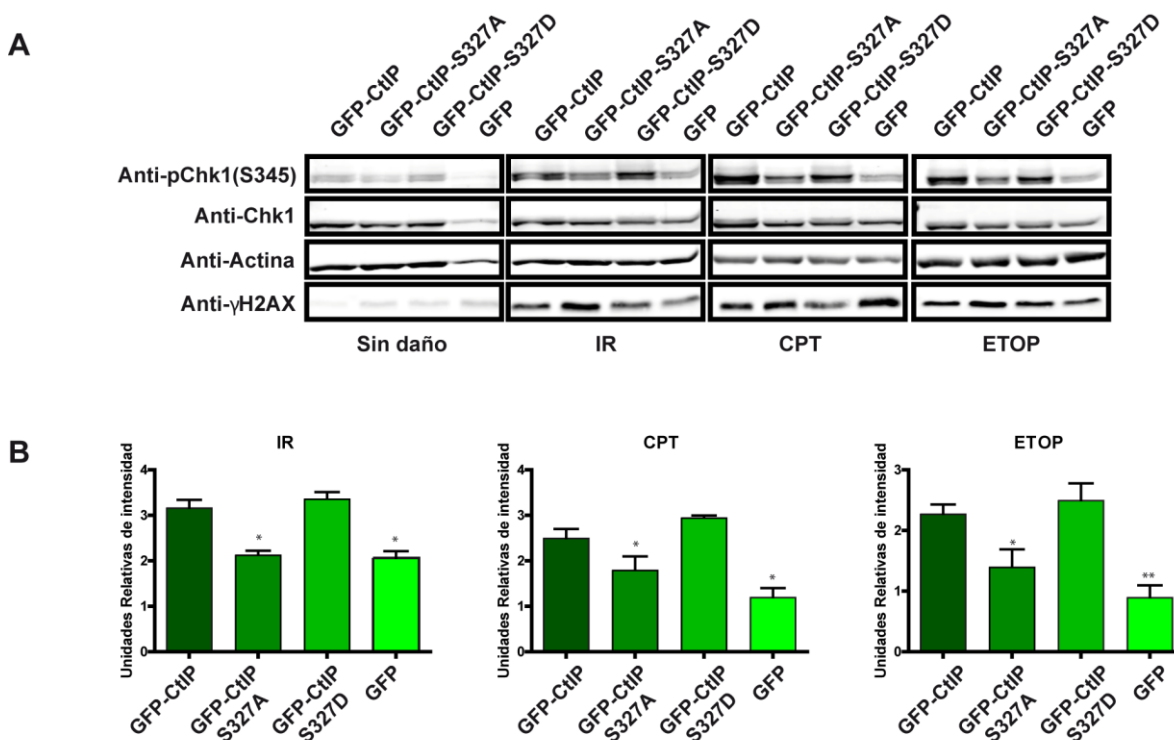


Figura R7. Análisis de la activación del *checkpoint* de ATR en mutantes de CtIP. A) Inmunoblot de extractos de proteínas de células U2OS expresando GFP-CtIP y sus variantes. Los extractos fueron recogidos 1 hora tras el tratamiento indicado (IR, CPT, ETOP ó sin daño) y revelados con los anticuerpos que se indican. **B)** Cuantificación de la señal del ratio pChk1/Chk1 para cada caso. La media y la desviación estándar de tres experimentos independientes están indicados.

De igual modo, en la figura R8A se indica que en células silenciadas para la proteína BRCA1, provocó un menor grado en la fosforilación de Chk1 en la S345 para ambos tratamientos. Así mismo, la intensidad de las bandas obtenidas en *western blot* era mucho

menor en comparación con las células control (shScr), reflejado en la cuantificación (Fig. R8B).

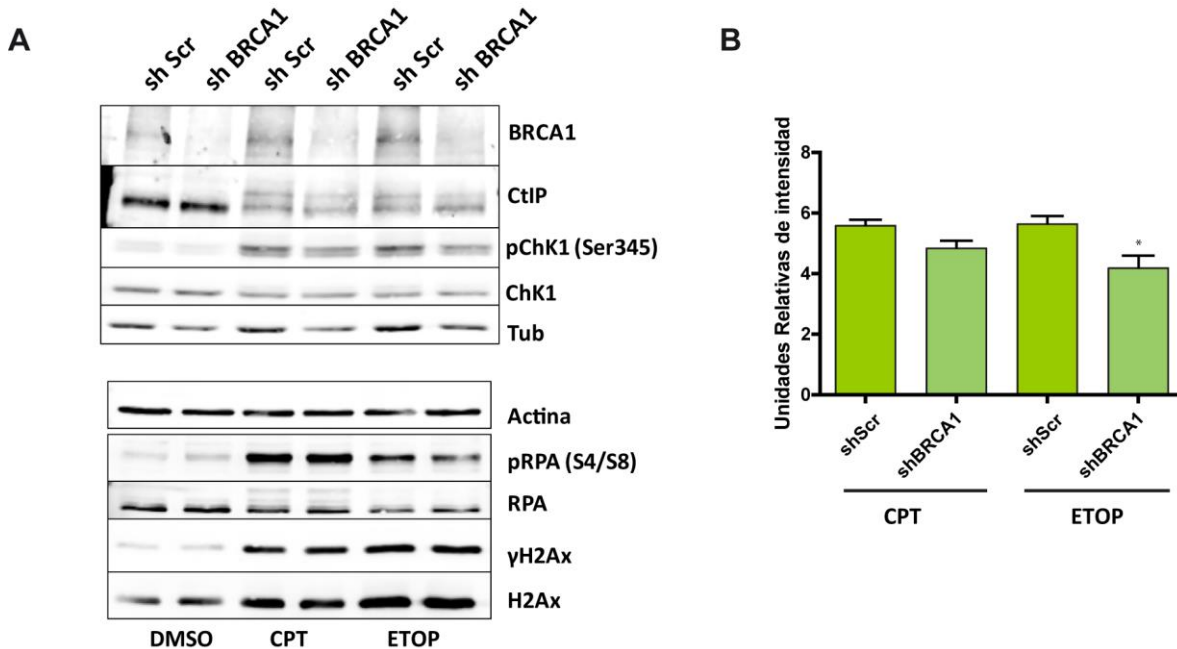


Figura R8. Análisis de la activación del *checkpoint* de ATR en ausencia de BRCA1. A) Inmunoblot de extractos de proteínas de células U2OS silenciadas para BRCA1 por efecto de un shRNA específico. Los extractos fueron recogidos 1 hora tras el tratamiento indicado (DMSO, CPT y ETOP) y revelados con los anticuerpos indicados. **B)** Cuantificación de la señal del ratio pChk1/Chk1 para cada caso. La media y la desviación estándar de tres experimentos independientes están indicados.

En resumen, el estudio de la fosforilación de Chk1 señalaba que la activación de ATR estaba comprometida en ausencia de la interacción CtIP-BRCA1, lo que paradójicamente sugería que la formación de ADNcs estaba afectada.

VI. Las discrepancias en los resultados no se deben por la competencia de 53BP1-RIF1 con el complejo CtIP-BRCA1.

Con el fin de explorar la causa de las discrepancias en nuestros resultados sobre la implicación del complejo CtIP-BRCA1 en la resección, quisimos evaluar si el complejo 53BP1-RIF1 estaría ejerciendo un efecto sobre el mutante de CtIP que no interacciona con BRCA1, ya que se ha descrito que el complejo CtIP-BRCA1 es antagonista al complejo 53BP1-RIF1 (Cao, Xu et al. 2009; Chapman, Barral et al. 2013; Di Virgilio, Callen et al. 2013; Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013; Zimmermann, Lottersberger et al. 2013), clave para la vía de NHEJ. Por tal motivo, decidimos evaluar la formación de focos de RIF1 y 53BP1 en las células de las diferentes variedades de GFP-CtIP. Utilizando cultivos asincrónicos silenciados de la proteína CtIP endógena, dañados con 10 Gy de IR para la inmunodetección de las proteínas RIF1 y 53BP1, como se describe en la sección de materiales y métodos. La cuantificación de los focos se hizo por método de un software, utilizando el programa *Metamorph*[®]. En concreto, se cuantificaron el número de focos por núcleo. En las figuras R9A y D se enmarcan las inmunofluorescencias representativas para la formación de focos de RIF1 y 53BP1 respectivamente. Como se logra percibir en la figura R9B y C, en el fosfomutante S327A y GFP había un mayor número de células con focos de RIF1 respecto al control expresando GFP-CtIP, de acuerdo con observaciones anteriores (Cao, Xu et al. 2009; Chapman, Barral et al. 2013; Di Virgilio, Callen et al. 2013; Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013; Zimmermann, Lottersberger et al. 2013). Sorprendentemente, y contrario a lo que esperábamos, las células con el fosfomimético S327D contaron con un número de células positivas para RIF1 muy similar a las que carecen de CtIP (Fig. 9B). En la figura R9C se muestra la intensidad media que presentó cada uno de los focos de RIF1 en los núcleos de las células. Cabe resaltar que la intensidad que presentaban las células con el mutante fosfomimético era mucho menor comparado con el resto de las variedades. Por otro lado, las células sin CtIP presentaban una intensidad notoriamente mayor en los focos de RIF1 cuando se compararon con el resto de ellas. Interesantemente, la intensidad entre el fosfomutante S327A y CtIP silvestre resultaron prácticamente iguales.

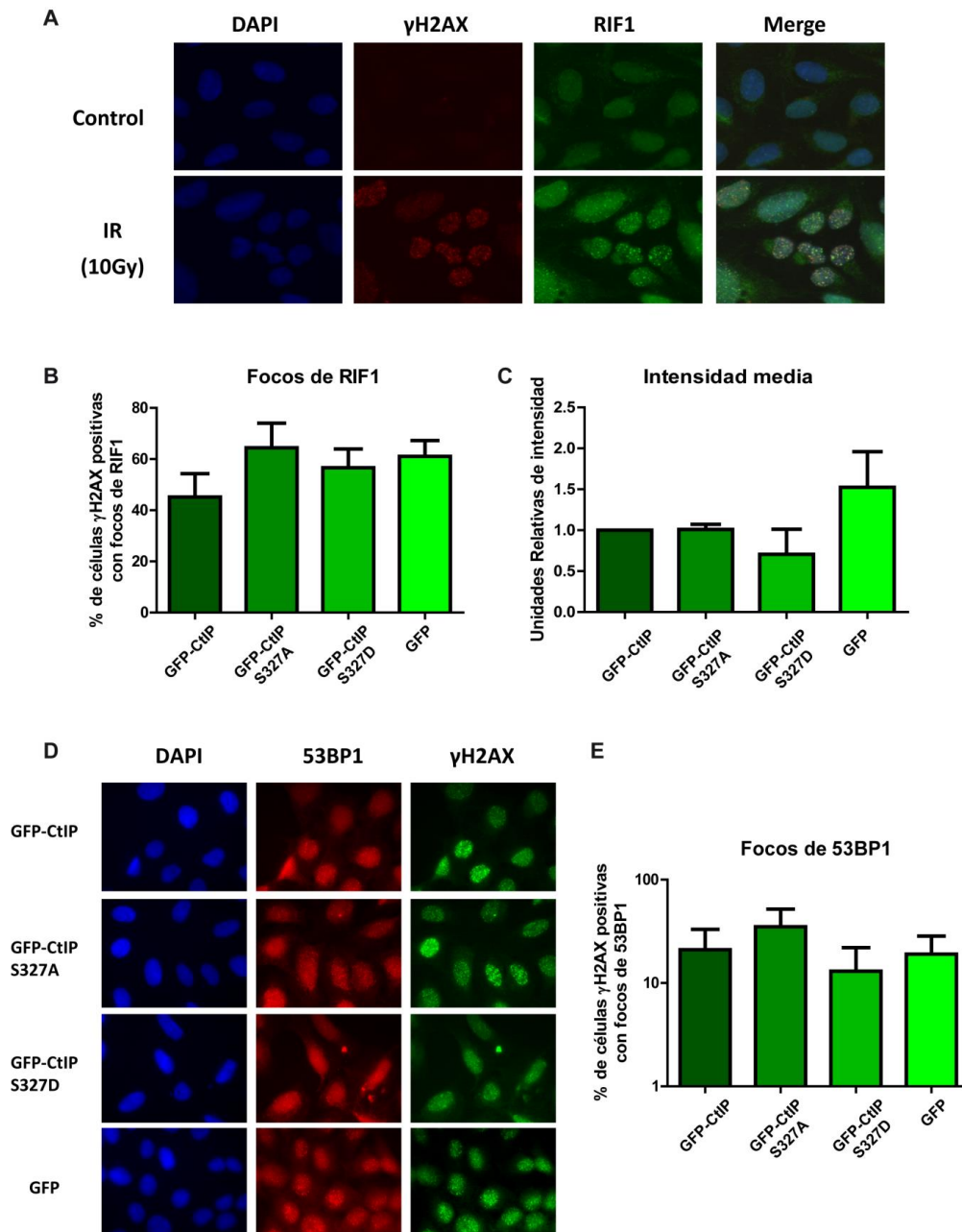


Figura R9. Análisis del antagonismo de los complejos CtIP-BRCA1 y 53BP1-RIF1. **A)** Inmunofluorescencia representativa de células U2OS recogidas una hora después del tratamiento (10 Gy de IR o sin daño), teñidas para RIF1 (verde), γ H2Ax (rojo) y DAPI (azul) **B)** Cuantificación usando el software *Metamorph*[®] del número de focos de RIF1 en cada núcleo de las células que expresan las variantes de GFP-CtIP **C)** Intensidad media de cada uno de los focos de RIF1 en cada núcleo, calculada con el mismo software. **D)** Igual que el apartado **(A)**, pero teñidas para 53BP1 (rojo), γ H2Ax (verde) y DAPI (azul) **E-F)** Cuantificación en *Metamorph*[®] del número **(E)** o la intensidad **(F)** de focos de 53BP1 en cada núcleo en células expresando las variantes de GFP-CtIP 1 hora después de exponerlas a IR. En todos los casos, la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada.

En el caso de los focos de 53BP1, los resultados obtenidos con los mutantes eran los esperados, ya que como se exhibe en la figura R9E, había un aumento en el fosfomimético y una disminución en el fosfomutante, en el número de células con focos de 53BP1. Cabe señalar que no se obtuvo un aumento notorio en las células que carecen de CtIP endógeno (las que expresan sólo GFP).

VII. *Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART).*

Hasta ahora, las técnicas tradicionales han implicado o descartado la contribución de BRCA1 a la resección del ADN a través de su interacción con CtIP (Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Reczek, Szabolcs et al. 2013). Nuestros propios datos apoyaban y contradecían dicho papel. Basado en estas observaciones un tanto contradictorias para el papel que desempeña el complejo CtIP-BRCA1 en la resección de ADN, contemplamos dos escenarios alternativos:

A) El complejo CtIP-BRCA1 tiene un segundo papel en la reparación del ADN y el *checkpoint* (activación de ATR y/o control de los focos de 53BP1 y RIF1) que no está relacionada con la resección del ADN

B) La falta de interacción entre CtIP y BRCA1 tiene un papel tan sutil en la resección del ADN que no puede ser observado por la acumulación de focos de RPA, pero promueve defectos detectables por otros métodos (fosforilación de Chk1, etc).

Como hipótesis de trabajo, nos decantamos por la segunda opción. Razonamos por lo tanto que tal vez esas aparentes contradicciones pudieran deberse a las limitaciones en las técnicas empleadas en los análisis. Brevemente, la resección del ADN ha sido estudiada en los eucariontes superiores por la acumulación de focos de RPA. Sin embargo, tal método no refleja diferencias en la longitud del ADN reseccionado, solamente indican si la cadena sencilla de ADN es lo suficientemente larga para albergar un número suficiente de

complejos proteicos de RPA haciéndolos detectables por métodos de microscopía, como la formación de focos (Fig. R10). Esto ha provocado un punto de vista muy simplista, en el campo de la clasificación de proteínas en dos grupos distintos: esenciales o irrelevantes para la resección, ya que no puede discriminar entre diferencias sutiles en la resección de ADN (Fig. R10).

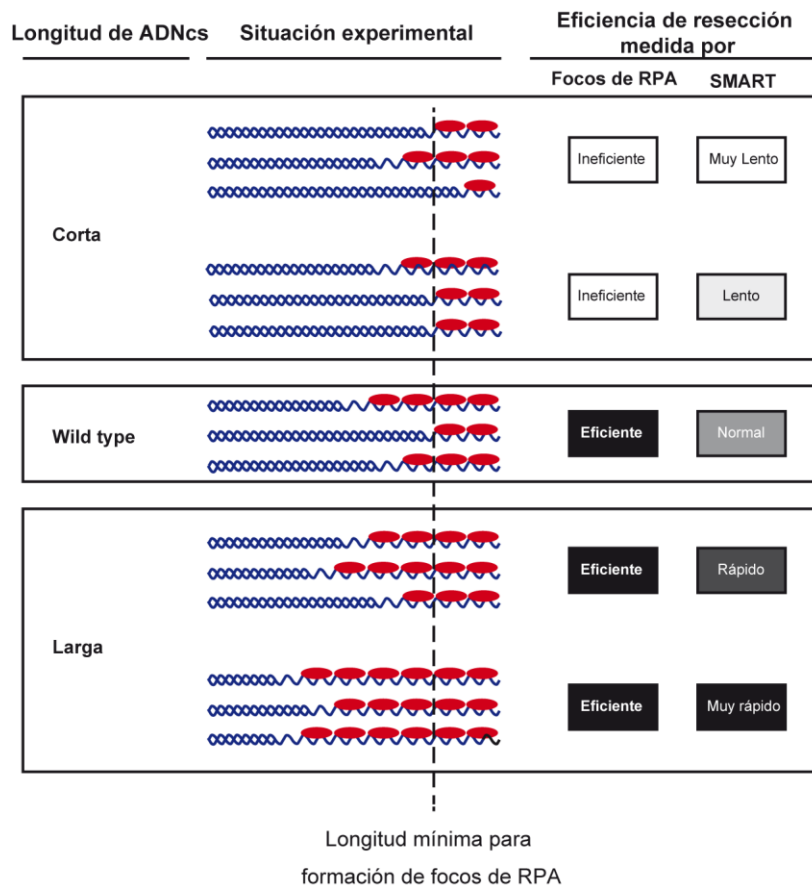


Figura R10. Representación esquemática de la limitación del uso de focos de RPA como indicativo de la resección de ADN. El uso de focos de RPA posibilita la separación de dos posibles categorías, células positivas o no para RPA, que no discriminan entre ADN reseccionado de diferentes longitudes. Sin embargo, el uso de *SMART* (ver más abajo), permite un análisis a mayor resolución de la resección del ADN.

Para explicar la discrepancia de los datos obtenidos por Yun y Hiom frente a los obtenidos por Nakamura y colegas (Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Reczek, Szabolcs et al. 2013) junto nuestros propios datos postulamos que la interacción entre CtIP y BRCA1, sin ser esencial para la resección, podría modular su velocidad. En este caso,

es posible que en determinadas condiciones experimentales un mutante que enlentece la resección no sobrepase el umbral mínimo necesario para formar un foco, y por tanto se observe una caída en el número de células con focos de RPA. Sin embargo, ese mismo mutante en otras condiciones experimentales puede alcanzar dicho mínimo y formar un foco (Fig. R10). Por ello, para analizar en más detalle y tratar de entender el papel del complejo CtIP-BRCA1 en la resección del ADN, nos planteamos que era necesario utilizar un método con mayor resolución. De esta manera, nos decidimos a realizar una serie de modificaciones en el protocolo de análisis de fibras de ADN para el estudio de la replicación, el llamado *DNA Combing*, al que denominamos *Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART*, por sus siglas del inglés) con objeto de poder usarlo como método para el estudio de la resección de ADN a alta resolución. Un esquema de las diferencias entre ambas técnicas se muestra en la figura R11.

Con el propósito de evaluar ese posible uso del *SMART* como una herramienta para cuantificar la resección, razonamos que la técnica debería cumplir con estas tres características:

- 1)** Tendría que responder a daño en ADN, es decir, mostrar una diferencia de señal en células dañadas con respecto a las no tratadas.
- 2)** La señal debería responder a un proceso activo, inferimos que la resección incrementaría la longitud registrada con el paso del tiempo.
- 3)** Debería ser capaz de detectar cambios ocasionados por la ausencia de proteínas claves para el proceso de resección de ADN, por ejemplo, la ausencia de CtIP resultaría en una menor señal al compararlo con el control.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS ENTRE LAS TÉCNICAS DNA COMBING Y SMART

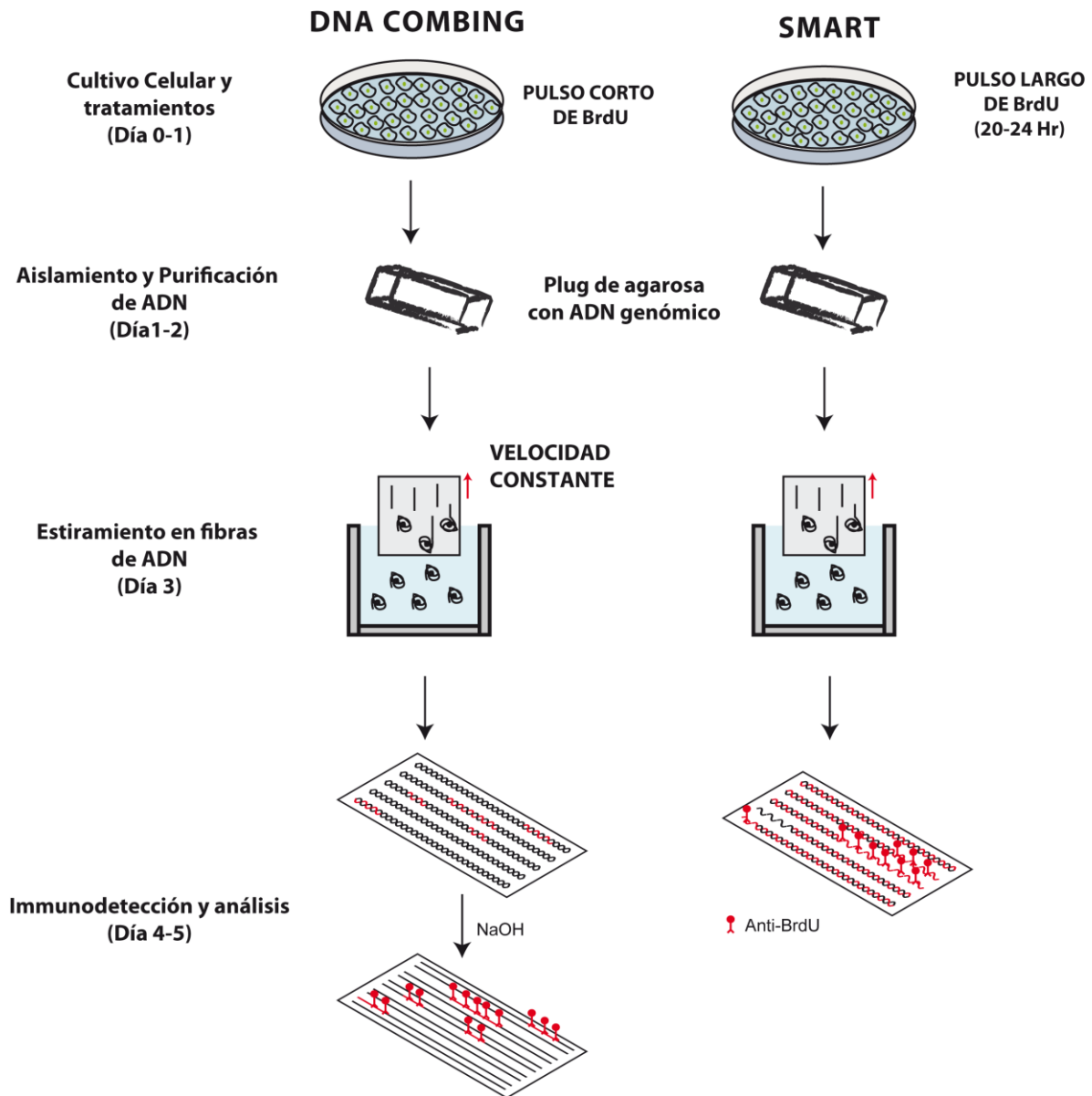


Figura R11. Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART). Representación esquemática de las similitudes y diferencias entre los protocolos de *DNA combing* (izquierda) y *SMART* (derecha), técnica para el estudio de la replicación y la resección de ADN respectivamente. A diferencia del *combing* clásico donde se da un pulso corto de BrdU, en el *SMART* se marca el ADN con BrdU por un periodo de 20-24 horas. A continuación, la extracción del ADN genómico se realiza en agarosa de bajo punto de fusión, evitando así cualquier daño mecánico sobre el ADN. A continuación de tratamientos para la purificación, se estiran las fibras a una velocidad constante sobre cubreobjetos silanizados, (200 $\mu\text{m}/\text{seg}$) que da como resultado fibras paralelas de ADN. Contrario al *combing* clásico, en el *SMART* se evita la desnaturalización con álcali, paso indispensable en el *combing* para exponer los epítomos de BrdU que se encuentra entre la doble cadena de

Resultados

ADN. En el *SMART*, la exposición del BrdU es hecha por la resección del ADN. Finalmente, los epítomos de BrdU son detectados con anticuerpos y visualizados bajo microscopio de fluorescencia.

Con el fin de probar la primera característica, señal dependiente de daño, se cultivaron 2 placas con células U2OS a las que se les agregó BrdU por un periodo de 24 horas asegurando el marcaje de una de las cadenas de ADN; y con el fin de generar cortes de doble cadena, por ende, provocar un proceso de reparación, una de estas placas se trató con 10 Gy de radiación ionizante mientras que la otra placa no recibió tratamiento, presentándose como un control. La placa irradiada se incubó a 37° C durante una hora después del daño, posteriormente se cosecharon ambos cultivos celulares, se contaron las células y se sometieron al protocolo de *SMART* (Ver materiales y métodos para más detalles). Básicamente, y a diferencia de un *combing* clásico, en nuestro procedimiento eliminamos el paso de desnaturalización de las fibras de ADN con hidróxido de sodio para exponer los epítomos de BrdU, necesaria porque estos se encuentran escondidos dentro de la doble hélice de ADN. Asumimos que la señal obtenida por la inmunodetección sería dada por la exposición de los epítomos de BrdU gracias al proceso de resección (Fig. R11).

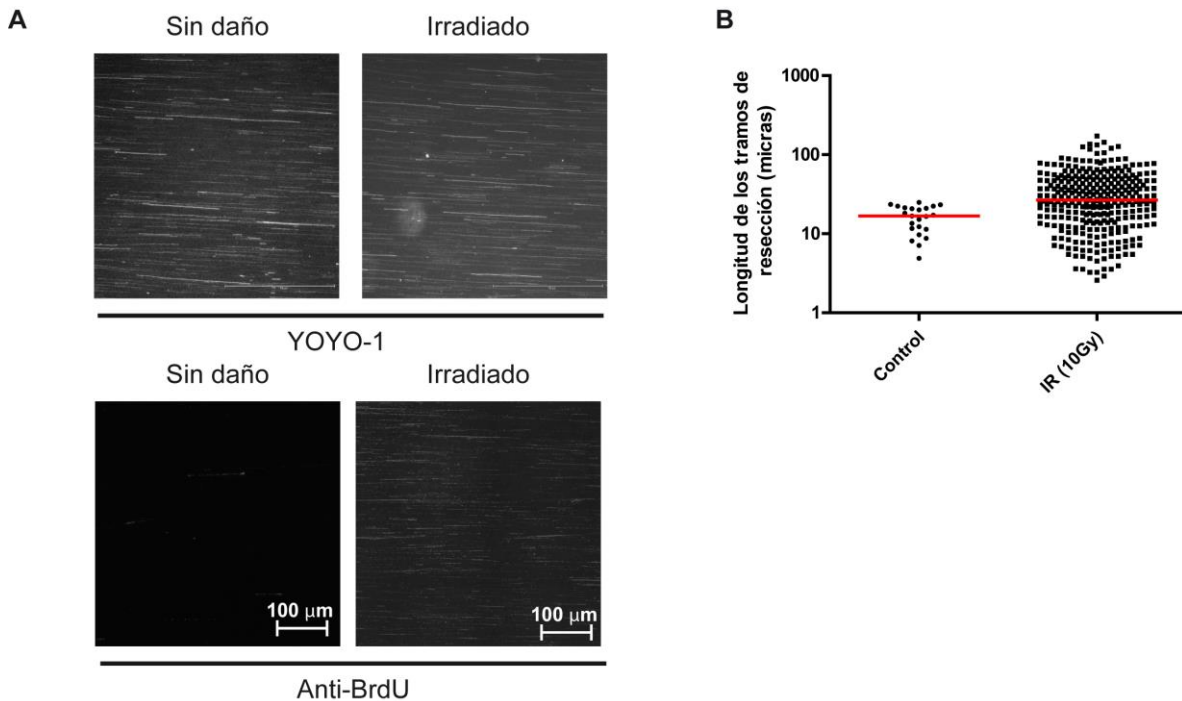


Figura R12. SMART como técnica para medir resección de ADN. A) Tinción de fibras de ADN producto de SMART 1 hora después de que las células fueron irradiadas o no. Se muestra tinción con YOYO1 para detectar ADN total (izquierda) y anti BrdU para detectar ADN de cadena sencilla (derecha). **B)** Representación de las poblaciones de las fibras medidas en células con y sin daño, cada punto representa una fibra individual de ADN. Se muestra un experimento significativo, en el que se han medido todas las fibras visibles.

Como se puede ver en la figura R12A, las fibras obtenidas de las células no irradiadas mostraban pocas fibras en la inmunodetección de BrdU, aun cuando reflejaron una señal muy fuerte con la tinción con YOYO-1, un intercalante del ADN que permite observar el ADN de cadena doble. Sin embargo, las fibras procedentes de aquellas células tratadas con radiación ionizante presentaron una señal abundante gracias a la presencia de ADN de cadena sencilla. Dicha señal se localizó en tramos discretos de las fibras de ADN que exponen el epítipo de BrdU, indicando los trozos de ADN que estaban reseccionados. (Fig. R12A, derecha). De igual modo al cuantificar el número de fibras, así como su longitud se registró una menor cantidad de fibras en las células que no fueron dañadas, además de que estas fibras fueron más cortas con respecto a las muestras expuestas a radiación ionizante (Fig. 12B). Esto apoyaba la idea de que la señal obtenida representaba ADN reseccionado, demostrando así que la técnica era capaz de diferenciar entre células con y sin daño en el ADN.

Con la finalidad de demostrar el segundo objetivo, que dichos tramos de señal en el ADN eran la respuesta a un proceso activo como la resección y no a una desnaturalización parcial debida, simplemente, al tratamiento con radiación o el procesamiento de las muestras durante el protocolo, se realizó una curva en respuesta a diferentes tiempos. Tras tratar las células con 10 Gy de IR los tiempos probados fueron 0 min, 15 min, 30 min y 60 min. Razonamos que, si los tramos observados con anti-BrdU eran producto de la resección, su longitud debería incrementarse de modo lineal con respecto al tiempo, mientras que si eran producto de una desnaturalización parcial debida a la radiación se mantendría constante durante todo el experimento o incluso disminuiría a medida que se renaturalizaba el ADN.

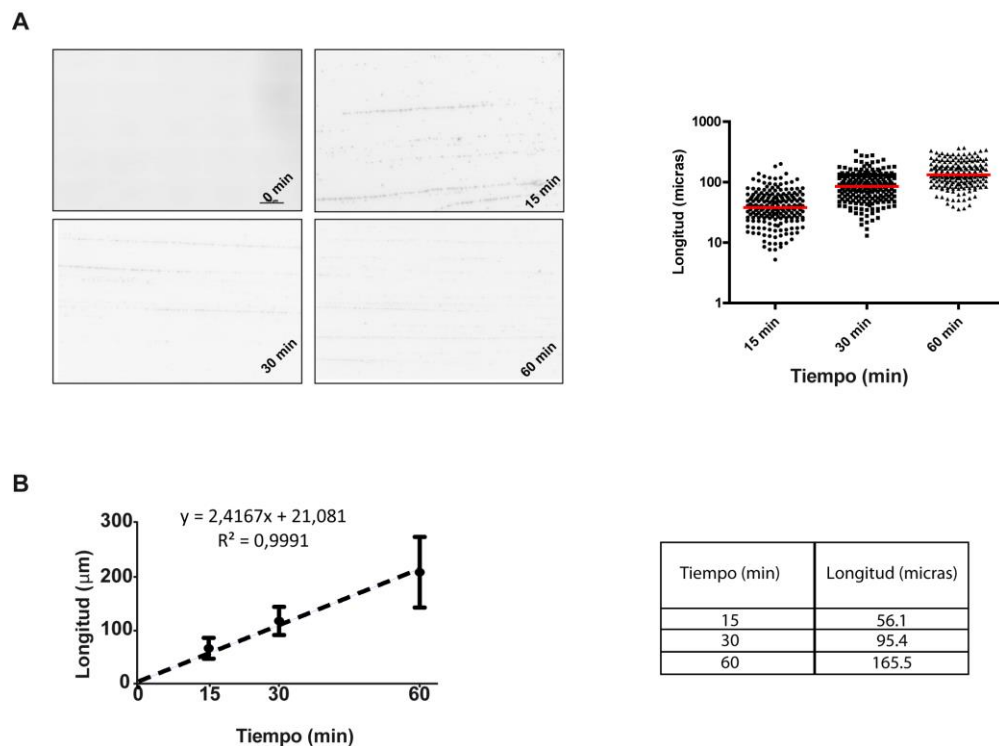


Figura R13. Respuesta del SMART a diferentes tiempos después de daño en el ADN. A) Imágenes representativas de fibras obtenidas a diferentes tiempos después de ser irradiadas (10 Gy) (izquierda). Derecha: Representación de las poblaciones de las fibras medidas a diferentes tiempos, cada punto representa una fibra de ADN individual. Se muestra un experimento significativo en el que se han cuantificado al menos 250 fibras. La mediana se muestra en rojo. **B)** Efecto del tiempo en la longitud del ADN reseccionado. ADN procedente de células irradiadas y recogidas a diferentes tiempos fue analizado usando la técnica de SMART. La regresión lineal de la media de las medianas y la desviación estándar de tres experimentos independientes está representada. Los valores medios de las medianas se muestran en la tabla a la derecha.

Como se expone en la figura R13A, encontramos que la longitud de las fibras positivas al marcaje con BrdU aumentaba en proporción con el tiempo transcurrido desde la radiación. Por tanto, concluimos que realmente dichos tramos decorados con anti-BrdU corresponden a los tramos de ADN reseccionado. Una ventaja de la técnica del SMART es que es posible determinar el tamaño real en pares de bases de un tramo positivo a partir de su longitud en micras, con una equivalencia de 1 μm igual a 2-3kb de ADN (Bensimon, Simon et al. 1994). Así mismo, calculamos la longitud de los tramos positivos midiendo los píxeles en la imagen, y por una conversión con la barra de escala en cada imagen se logró

convertir los pixeles a micrómetros. En la gráfica de la figura R13B (derecha) se representan las diferentes poblaciones de fibras para cada uno de los tiempos. Se notó que, aunque la longitud individual de cada tramo reseccionado es variable, la nube que representa la población se desplaza hacia un tamaño mayor en función del tiempo. Es conveniente distinguir que, cada tramo determinado proviene de una molécula de ADN diferente que ha sido dañada en una población de células, lo que explicaría la variabilidad individual de cada punto. Así mismo, la mediana de cada una de las poblaciones, representada en rojo en la figura, también aumentó con el paso del tiempo. En la figura R13B (izquierda) se exhibe la representación de las medianas para cada tiempo junto con una regresión lineal que nos permitió calcular la velocidad media de la resección en nuestro experimento, dada por la pendiente de la recta, la cual resultó ser de 0.2 kb/h.

Finalmente, para validar la tercera característica que debía cumplir nuestra técnica de *SMART* evaluamos el efecto que tienen en la formación y longitud de fibras de ADN algunos factores relacionados con la resección. Inferimos que las fibras de ADN deberían ser afectadas con el silenciamiento de proteínas envueltas en resección, como CtIP. Encontramos que la pérdida de CtIP (Fig. 14A y B) no sólo redujo el número de fibras observadas, sino que disminuyó la velocidad de resección de ADN en casi un 23% en comparación con las células control. Así, con la técnica del *SMART* podemos distinguir entre dos tipos de efectos durante la resección: la iniciación y la velocidad. Ya que el número de fibras de ADN podría ser un indicativo del inicio de la resección, la pendiente en la curva calculada nos proporciona la velocidad a la que este fenómeno toma lugar en un determinado evento. Por lo tanto, observamos que la pérdida de CtIP (Fig. 14A y B) tiene un fuerte efecto en el inicio de la resección, pero también afecta la velocidad de la misma.

Resultados

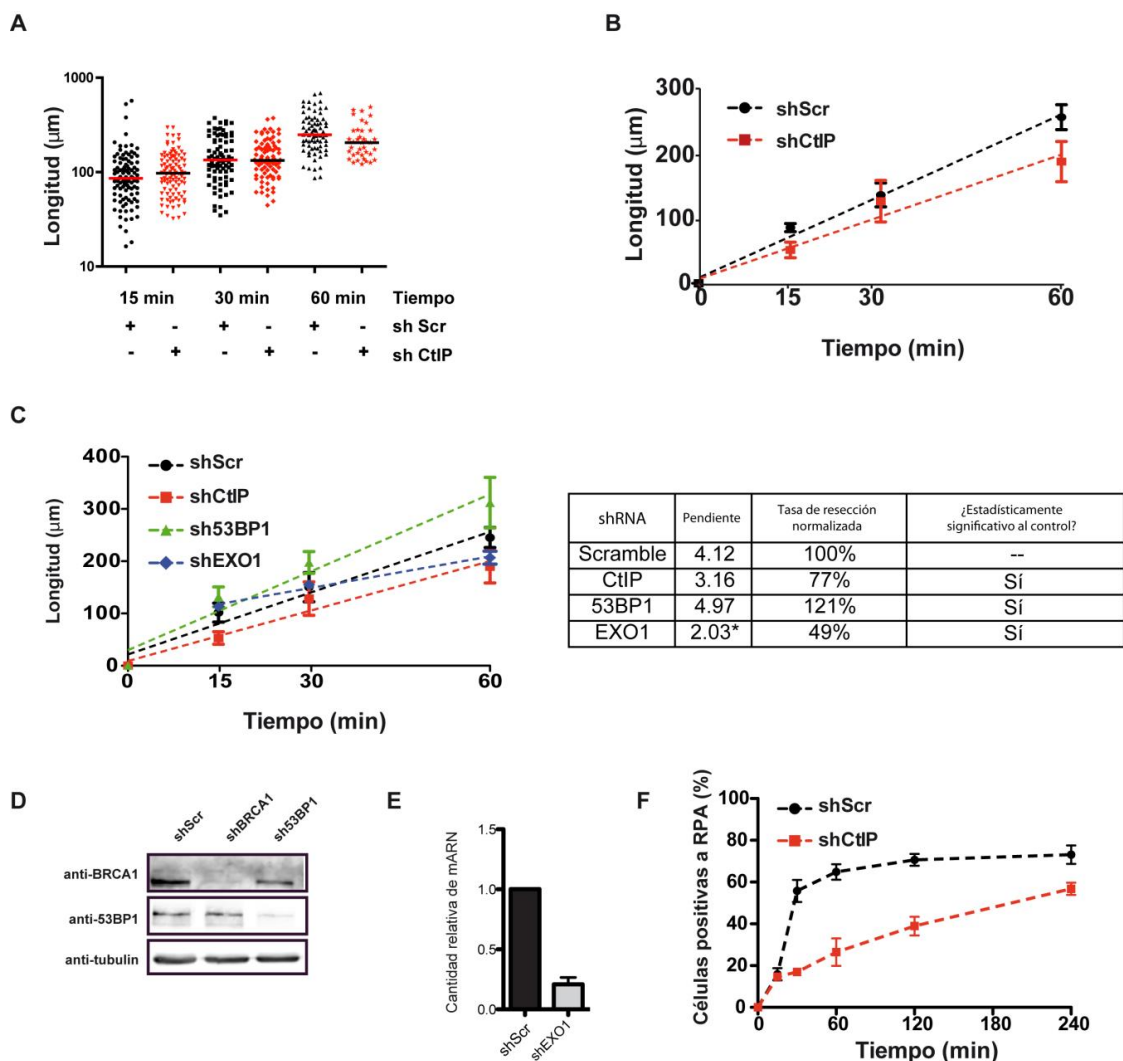


Figura R14. Validación de la técnica de SMART. **A)** Representación de las poblaciones de las fibras medidas en células silenciadas para CtIP y su control, a diferentes tiempos después de 10 Gy de IR. Cada punto representa una fibra de ADN y se cuantificaron al menos 250 fibras por muestra. Se presenta un experimento significativo. La mediana de la distribución se representa con una barra horizontal. **B)** Representación gráfica de la media y la desviación típica de las medianas de tres experimentos como el presentado en el apartado A. **C)** Lo mismo que en B) pero en células silenciadas para Exo1, 53BP1, CtIP y células control **D)** *Western blot* para evaluar el nivel de silenciamiento para BRCA1 y 53BP1 **E)** qRT-PCR para evaluar el nivel de silenciamiento de EXO1. En todos los casos la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes se indican. **F)** Cinética de formación de focos de RPA en células silenciadas para CtIP y su control a diferentes tiempos después de IR (10 Gy)

Interesantemente, la pérdida de 53BP1, aceleró la resección del ADN en un 20%, en acuerdo con su papel inhibitorio de la resección (Fig. R14C). Sorpresivamente, aunque los resultados en los silenciamientos de CtIP y 53BP1 encajaron perfectamente en una correlación lineal, cuando silenciamos EXO1 observamos un comportamiento totalmente

diferente. Si consideramos los resultados completos de la cinética, la correlación lineal de EXO1 fue realmente pobre con una R^2 menor de 0,7. De hecho, los niveles de resección sin EXO1 fueron iguales a las células control durante los primeros 15 minutos, después de eso cayeron dramáticamente casi un 50% al compararlo con el control. Así, considerando los datos entre 15 y 60 minutos los datos coincidieron casi a la perfección con una regresión lineal con una R^2 de 0,94. Estas observaciones están en el mismo contexto en las que se involucra a EXO1 en una fase tardía en la resección del ADN, siendo no requerido para las fases iniciales (Fig. R14C).

Sorprendentemente el efecto en la velocidad de resección fue tenue cuando lo comparamos con el gran efecto en la formación de focos de RPA ocasionado por la ausencia de CtIP, después de daño. Una interpretación de esta aparente contradicción es que en células silenciadas de CtIP ese efecto tenue en la velocidad de resección es suficiente para alterar el tamaño de las fibras de ADN para evitar la visualización de focos de RPA por medio de microscopía. Razonamos que, en tal caso, a tiempos más largos el número de células positivas a focos de RPA en células que carecen de CtIP equipararía a niveles en células control. De hecho, cuando analizamos la formación de focos de RPA en células control y silenciadas de CtIP a diferentes tiempos (Fig. R14F), descubrimos que la gran diferencia observada en los primeros tiempos analizados, disminuían en razón del tiempo; así, la cuantía del número de células con focos de RPA asemejaba una meseta en las células control, pero se mantenía incrementando en las células sin CtIP.

De esta manera, con todos los datos proponemos el uso del *SMART* como una técnica para medir la resección a niveles de moléculas individuales, proporcionándonos la longitud de la resección en un escenario determinado y permitiéndonos calcular la velocidad a la que el proceso tiene lugar.

VIII. La resección de ADN es más lenta en el mutante GFP-CtIP-S327A.

Para analizar si nuestra técnica era capaz de resolver nuestros datos contradictorios sobre la implicación del complejo CtIP-BRCA1 en el procesamiento del ADN, usamos la técnica de *SMART* para medir la velocidad de resección en las diferentes variedades de CtIP tras dañar las células con IR o ETOP. Primero, medimos la longitud de las fibras de ADN reseccionado en las mismas condiciones en las que llevamos a cabo los análisis con focos de RPA, es decir, tras una hora después de irradiación o de la exposición a la droga. Observamos que en el mutante fosfomimético, S327D, la longitud de las fibras fue similar al CtIP silvestre para ambos tratamientos (Fig. R15A y B). Por el contrario, la pérdida del complejo de CtIP-BRCA1, dado por la condición del fosfomutante S327A, resultó en una clara disminución en la longitud de las fibras de ADN, al igual que las células que solo expresan GFP (Fig. R15A y B). Algo notable en estos experimentos fue que las fibras obtenidas tras el tratamiento con etopósido fueron en sí mucho más cortas en comparación a las obtenidas tras irradiar las células, incluso en las células expresando la variedad silvestre de CtIP (Fig. R15A y B).

De igual forma, evaluamos el efecto de la ausencia de BRCA1 en la longitud de las fibras reseccionadas, que ocasionó una reducción en la longitud de las fibras de ADN en comparación con las células control ante ambos tratamientos (Fig. R15A y B).

Así concluimos que, aunque la interacción entre CtIP y BRCA1 no es esencial para la resección del ADN, sí afectan la longitud de las fibras reseccionadas. Esto podría explicarse por una reducción en la velocidad de resección, un retraso en la iniciación o un paro temprano del proceso de resección. Esto cobra relevancia sobre todo en las células tratadas con etopósido en las que es necesario un tiempo determinado para eliminar la topoisomerasa II unida al ADN y que podría influir en la longitud de las fibras de ADN reseccionado que observamos.

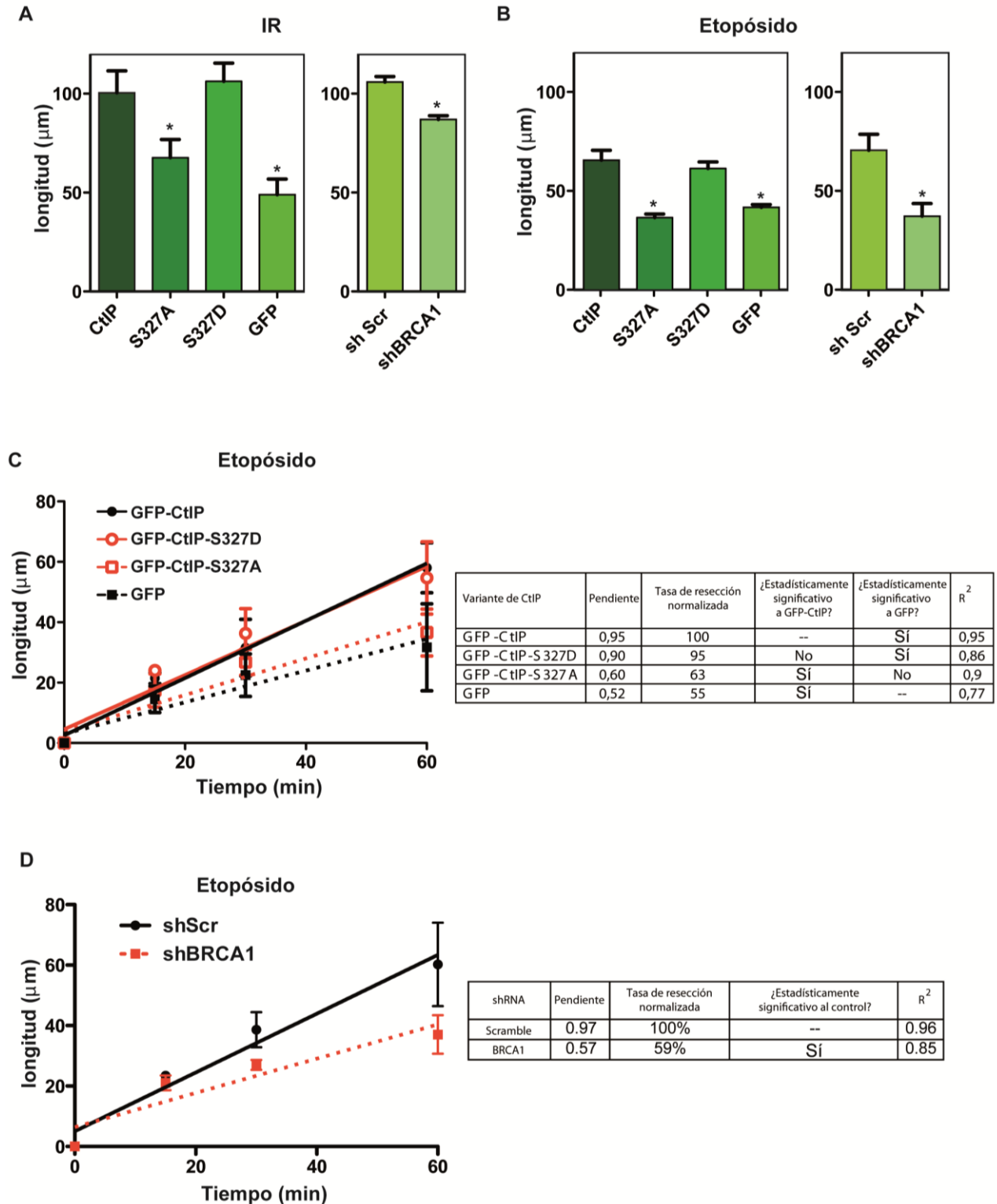


Figura R15. La resección de ADN es más lenta en el mutante GFP-CtIP-S327A. A) Representación de la media y la desviación típica de las medianas de la longitud de fibras de ADN reseccionadas en células expresando las variantes de GFP-CtIP en ausencia de CtIP endógeno o silenciadas para BRCA1. Las muestras fueron recogidas 1 hora después de ser tratadas con 10 Gy de IR **B)** Lo mismo que en A) pero después de

Resultados

tratamiento de 1 hora con 10 μM de etópósito **C)** Cinética de *SMART* con células expresando las variantes de GFP-CtIP después de ser tratadas con 10 μM de etópósito y recogidas a diferentes tiempos. Se muestra también la regresión lineal usando la media de las medianas. A la derecha se tabulan los datos de la pendiente de cada regresión lineal, incluyendo la pendiente, la tasa relativa (tomando los valores de GFP-CtIP como 100%), el coeficiente de correlación y la significación estadística de cada valor al compararlo con GFP-CtIP o GFP. **D)** Lo mismo que en C) pero usando células silenciadas de BRCA1 y su control. Se representa en todos los casos la media de las medianas de al menos tres experimentos independientes.

Por ello, decidimos analizar el comportamiento de los mutantes a través del tiempo, realizando una cinética para ambos tratamientos. La velocidad de la resección se vio drásticamente mermada por la ausencia del complejo CtIP-BRCA1 mediada por el fosfomutante S327A, así como también por la ausencia de BRCA1, en ambos tratamientos (Fig. R15C y D). El mutante S327A presentó el mismo nivel de velocidad que las células que carecen de CtIP, mientras que el mutante S327D se comportó de igual manera que las células silvestres. (Fig. R15C).

En resumen, nuestros datos indicaban que BRCA1, a través de su interacción con CtIP, juega un papel sutil en el control de la resección mediando, especialmente, la velocidad del proceso.

CAPITULO II:

IMPLICACIÓN DE LAS TOPOISOMERASAS TIPO II EN LA RESECCIÓN DEL ADN.

I. Topoisomerasas tipo II y el procesamiento del ADN.

Con los resultados del capítulo anterior pudimos dar respuesta a las discrepancias previamente observadas sobre el papel de complejo CtIP-BRCA1 en el procesamiento del ADN. Sin embargo, lejos de dar punto final al trabajo, éste nos arrojó varias interrogantes, dentro de las cuales una en particular nos causó gran interés. Cuando comparamos las cinéticas entre tratamientos tales como irradiación y etopósido en el *SMART*, podemos observar dos cinéticas completamente diferentes tanto en velocidad como en longitud de las fibras para cada uno de los tratamientos en células expresando el CtIP silvestre (Fig. R16A). Estas diferencias podrían estar dadas por el tiempo que le toma a las células poder limpiar los extremos de ADN que tienen unida covalentemente la topoisomerasa II (TOP2), producto de la acción del etopósido. Sin embargo, debido al mecanismo del mismo, esperaríamos otro tipo de comportamiento en dicha cinética, uno en el que observáramos el tiempo determinado que se tarda en quitar la topoisomerasa II unida al ADN, para así después permitir la resección del mismo a la velocidad normal, exhibido en la representación esquemática de la figura R16B. Así pues, inferimos que, para obtener este tipo de resultados, el modelo no podía ser tan simple y tendría que haber más factores implicados. Ya que el etopósido bloquea la acción de la TOP2, quisimos explorar la posibilidad de que la actividad de esta enzima estuviera directamente involucrada en la resección del ADN.

Con el fin de examinar este supuesto, razonamos que no deberíamos usar agentes que inhibieran la actividad de estas enzimas y, simultáneamente, causaran daño en el ADN como es el caso del etopósido. Con ese propósito, usamos el dexrazoxano (DEX) y la merbarona (MER), dos inhibidores catalíticos específicos para las topoisomerasas tipo II que no provocan daño en el ADN, al menos en tratamientos cortos (Haggarty, Koeller et al. 2003; Skoufias, Lacroix et al. 2004; Germe and Hyrien 2005; Luo, Yuan et al. 2009), ya que se ha demostrado que su uso en tratamientos crónicos en cultivos celulares pueden llegar a producir daño en el ADN (Wang and Eastmond 2002). Adicionalmente, como

Resultados

fuerza de daño en el ADN, independiente de la actividad topoisomerasa usamos la radiación ionizante.

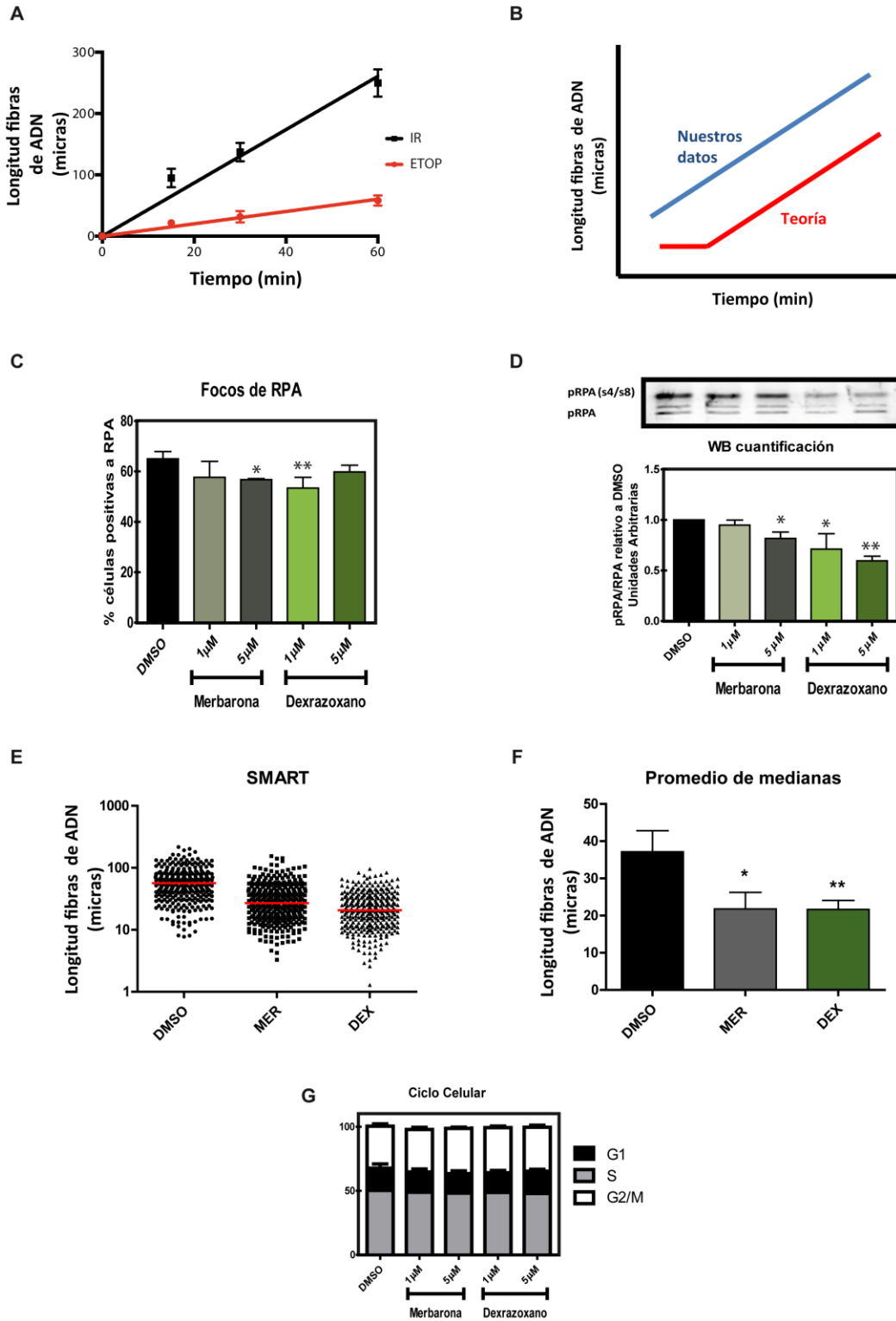


Figura R16. La actividad de la topoisomerasa tipo II y el procesamiento del ADN. **A)** Comparación entre cinéticas con tratamiento con irradiación y etopósido usando la técnica de *SMART*. Las células fueron tratadas con 10 Gy y 10 μ M respectivamente y recogidas en los tiempos indicados. **B)** Representación esquemática que muestra la cinética teórica que debe ser obtenida con un tratamiento con etopósido en el *SMART* si el retraso fuera exclusivamente debido a la eliminación de la TOP2 de los extremos y la velocidad de la resección no estuviese afectada. **C)** Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA siendo positivas para γ H2AX, una hora después de haber sido irradiadas, al ser tratadas con DEX, MER o DMSO como control. **D)** *Western blot* y cuantificación de la señal del ratio pRPA/RPA de células tratadas con DEX o MER sometidas al mismo tratamiento que en C). **E)** Representación de las poblaciones de la longitud de fibras de ADN de cadena sencilla medidas en células tratadas con DEX, MER y su control, después de 10 Gy de IR. Cada punto representa una fibra de ADN y se cuantificaron al menos 250 fibras por experimento. Se muestra un experimento significativo. La mediana de la distribución se muestra en rojo. **F)** Representación de la media y la desviación típica de las medianas de la longitud de fibras de ADN reseccionadas en células tratadas con DEX, MER y su control. Las muestras se recogieron 1 hora después de ser irradiadas con 10 Gy. La media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada.

Decidimos probar estos agentes en dos concentraciones, 1 y 5 μ M con el fin de evaluar la implicación de las TOP2 en la resección. Para esto, se utilizaron cultivos asincrónicos de células U2OS los cuales fueron pre-expuestos durante media hora a los inhibidores catalíticos. Y como mencionamos, para crear cortes de doble cadena se irradiaron los cultivos con 10 Gy de radiación gamma y los cultivos se incubaron a 37 °C una hora adicional en presencia de los inhibidores catalíticos de TOP2. De esta manera, las células estuvieron expuestas a los inhibidores por un periodo total de 90 minutos. Como se distingue en la figura R16C, ambas drogas tuvieron un impacto en el número de células positivas para focos de RPA en comparación con las células control (DMSO).

Como análisis complementario evaluamos la fosforilación de RPA en la S4 y S8 por medio de *western blot*, partiendo de los mismos cultivos utilizados en el ensayo de formación de focos de RPA con los inhibidores catalíticos de la topoisomerasa II. Se extrajo la proteína con buffer Laemmli (como se describe en la sección de materiales y métodos). En la figura R16D se puede apreciar que existió una menor señal en la banda correspondiente a RPA fosforilado en la S4 y S8, en las células tratadas con los inhibidores en comparación con las células control, tal y como esperábamos.

Queriendo profundizar un poco más sobre el efecto de estos inhibidores en el procesamiento del ADN, decidimos realizar la técnica del *SMART* en cultivos asincrónicos tratados de igual manera que en el experimento con focos de RPA, es decir, media hora con el agente inhibidor, creación del daño del ADN, y recogiendo las células una hora después de haber sido dañadas. Encontramos que con ambos compuestos se obtuvo una menor longitud de las fibras de ADN indicando, por lo tanto, una menor resección sin la actividad catalítica de la TOP2 (Figuras R16E y F).

Para descartar que el efecto observado con los inhibidores fuese porque arrestaban las células en un determinado punto del ciclo celular, realizamos análisis de FACS, y como se presenta en la figura R16G no encontramos diferencia en el patrón de ciclo celular entre los tratamientos y las células control. Así, para futuros experimentos dentro de este trabajo decidimos utilizar las concentraciones de 1 y 5 μM para el dexrazozano y la merbarona respectivamente, con pre-tratamientos de media hora, seguida de una hora de recuperación tras la inducción de los cortes de doble cadena con radiación ionizante.

II. Las topoisomerasas tipo II están involucradas en la resección de ADN.

Con el fin de comprobar que la disminución en el número de focos de RPA y la longitud de las fibras de ADN en el *SMART* es realmente debida a una participación de las topoisomerasas tipo II, decidimos silenciar las dos isoformas de esta enzima presentes en células de mamíferos, isoforma α (TOP2 α) y β (TOP2 β), por medio de la transfección de siRNA específicos contra cada una de ellas (siTOP2 α y siTOP2 β , respectivamente).

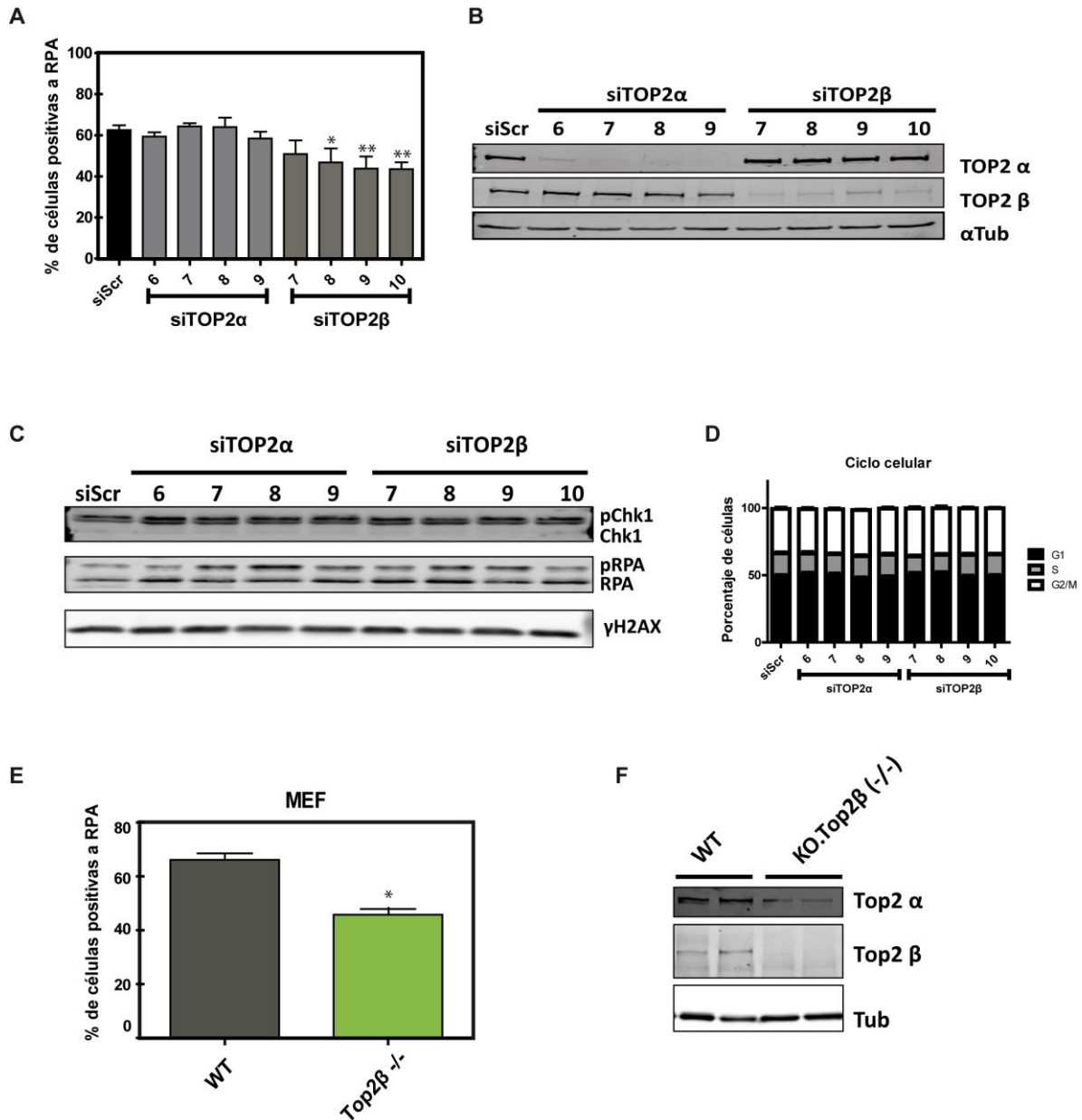


Figura R17. La topoisomerasa II está implicada en la resección de ADN. A) Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA siendo positivas para γ H2Ax después de ser transfectadas con los siRNA indicados y recogidas una hora después de haber sido expuestas a radiación ionizante. Se muestra la media y la desviación típica de tres experimentos independientes. **B)** *Western blot* representativo de la eficiencia del silenciamiento de los diferentes siRNA usados contra TOP2 α y TOP2 β **C)** Análisis de *western blot* representativo de la eficiencia en la fosforilación de RPA en la S4/S8 y pCHK1 en la S345 en células silenciadas para TOP2 α y TOP2 β respectivamente **D)** Análisis de ciclo celular en células U2OS después de ser silenciadas las isoformas TOP2 α y β respectivamente. **E)** Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA siendo positivas para γ H2Ax en Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF) *Knock-out* para la Top2 β (Top2 β ^{-/-}). Las muestras se recogieron una hora después de haber sido irradiadas. Se representan

Resultados

la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. E) *Western blot* representativo indicando la pérdida de la Top2 β en las MEF Top2 β -/-.

En primer lugar, realizamos el ensayo de focos de RPA partiendo de cultivos de células U2OS que se transfectaron independientemente con 4 siRNA diferentes contra una u otra de las isoformas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se llevó a cabo la inmunofluorescencia para RPA. La figura R17A indica que obtuvimos una pequeña pero clara disminución en las células positivas para focos de RPA en las células que pierden la isoforma TOP2 β comparado con las células control (transfectadas con un siRNA cuya secuencia no se dirige contra ningún gen humano; siScr). Inesperadamente, al perder la isoforma TOP2 α no encontramos una diferencia en el número de células con focos de RPA al compararlas con las siScr. La eficiencia del silenciamiento con los diferentes siRNA para cada isoforma se muestra en la figura R17B. Se observa que para los diferentes siTOP2 α hubo una clara desaparición en la banda correspondiente a esta isoforma, mientras que para TOP2 β los silenciamientos no llegaron a ser tan eficientes. Aun así, la depleción en TOP2 β fue lo suficientemente buena para obtener un defecto en resección. Los resultados obtenidos en el análisis de ciclo celular nos indicaron que el silenciamiento de ambas isoformas de topoisomerasa no tuvo un efecto en la correcta progresión del ciclo (Fig. R17D).

De igual manera que en experimentos anteriores, nos dimos a la tarea de estudiar el fenómeno de la resección mediante la aparición de la forma fosforilada de RPA y la activación del *checkpoint* de ATR mediante la fosforilación de la proteína Chk1. Como se logra ver en la figura R17C no hubo una diferencia en las especies fosforiladas de RPA y Chk1 en las células sin las topoisomerasas II cuando las comparamos con las células control.

Para estar completamente seguros que la isoforma β tiene un papel en la resección del ADN, realizamos focos de RPA en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) provenientes de un ratón *knock-out* para esta isoforma (MEF Top2 β -/-). De tal manera que, expusimos

a 10 Gy de IR cultivos asincrónicos de este tipo celular y su respectivo control (MEF Wt) y los dejamos una hora a 37° C para permitir que las vías de reparación tuvieran lugar, después realizamos inmunofluorescencia para focos de RPA. Al realizar la cuantificación observamos una caída en el número de células con focos de RPA en las células que carecen de Top2 β (Fig. R17E). Así mismo realizamos un *western blot* para corroborar la pérdida total de Top2 β en este fondo genético (Fig. R17F). No fue posible realizar este ensayo en células *knock out* para Top2 α , al tratarse de un gen esencial para la viabilidad celular (Bush, Evans-Roberts et al. 2015).

Queriendo profundizar un poco más, realizamos *SMART* con las MEF Top2 β *-/-* y tal como esperábamos encontramos una menor longitud en las fibras de ADN reseccionadas en ausencia de Top2 β en comparación a células silvestres (Fig. R18A). Entonces, decidimos realizar la técnica del *SMART*, de mayor sensibilidad que la formación de focos de RPA, en un contexto de silenciamiento de la isoforma TOP2 α para comprobar si realmente la pérdida de esta isoforma no tiene ningún papel en resección. Después de transfectar con siRNA contra TOP2 α , se irradiaron las células y se realizó el *SMART*, obtuvimos que la pérdida de la TOP2 α ocasionó una ligera pero significativa reducción en la longitud de las fibras de ADN reseccionadas (Fig. R18B). Por tanto, ambas isoformas de la topoisomerasa II, especialmente TOP2 β , juegan un papel en la resección de los DSBs.

III. La actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II facilita la resección del ADN.

Con lo visto hasta el momento sobre el efecto de la topoisomerasa tipo II en el procesamiento del ADN, nos preguntamos si se vería afectado el reclutamiento de RPA a sitios de corte de doble cadena con el uso de los inhibidores de la actividad catalítica de TOP2. Queriendo responder esto, llevamos a cabo inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en presencia de dextrazano. Utilizando el sistema DiVA publicado por el grupo de Gaëlle Legube (Iacovoni, Caron et al. 2010; Aymard, Bugler et al. 2014).

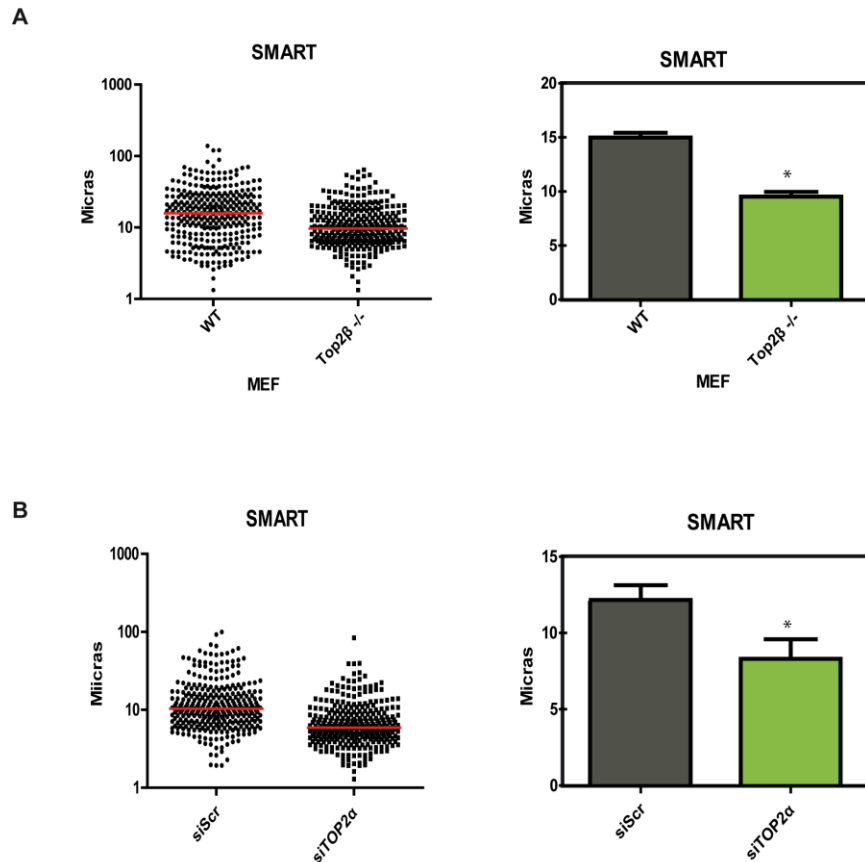


Figura R18. La pérdida de ambas isoformas de la topoisomerasa II, tiene un impacto en la resección de ADN. A) Representación de las poblaciones de las fibras medidas en MEF Top2β^{-/-}, después de 10 Gy de IR. Cada punto representa una fibra de ADN de cadena sencilla (izquierda). Se indica un experimento significativo en el que se representan al menos 250 fibras por muestra. La mediana se representa en rojo. A la derecha se muestra la representación de la media y la desviación típica de las medianas de la longitud de fibras de ADN reseccionadas en células MEF Top2β^{-/-} y silvestres de tres experimentos independientes. El ADN se recogió 1 hora después de ser irradiadas con 10 Gy. **B)** Lo mismo que en A) pero en células U2OS silenciadas de TOP2α con siRNA. La media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada a la derecha.

Brevemente, son células U2OS transfectadas de manera estable con un sistema de inducción de cortes de doble cadena por medio de la enzima de restricción *AsiI*, la cual está unida a elemento de respuesta a estrógeno. En otras palabras, al tratar las células con tamoxifeno (4OH-T), modulador selectivo de receptores de estrógeno, la enzima migra al interior del núcleo y realiza cortes de doble cadena en más de 150 sitios del genoma. Gracias a las secuenciaciones que ha realizado el grupo de la Dra. Legube se conocen los

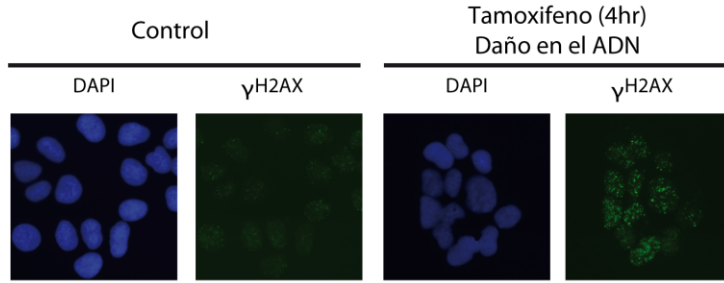
sitios en el genoma donde la enzima realiza el corte de doble cadena (Iacovoni, Caron et al. 2010; Aymard, Bugler et al. 2014).

De tal manera, para llevar a cabo el ChIP, se siguió el protocolo descrito por el grupo de la Dra. Legube (más detalles en materiales y métodos). En resumen, se trataron cultivos asincrónicos de células DiVA con 300 nM de tamoxifeno y se dejó actuar por 4 horas a 37° C con el propósito de generar los cortes de doble cadena. En esta ocasión con el propósito de inhibir la actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II, al momento de agregar el tamoxifeno para crear el DSB, también se agregó el dexrazoxano. Pasadas las 4 horas se llevó a cabo el protocolo de la técnica ChIP. Con el fin de mirar el reclutamiento de RPA al sitio de daño, analizamos 5 sitios de corte diferentes, analizado tres distancias en cada uno de ellos (80pb, 200pb y 800pb respecto al punto de rotura) usando 14 parejas de oligos diferentes. Además, también analizamos el reclutamiento al gen más próximo al sitio de corte mediante los oligos denominados Gen.

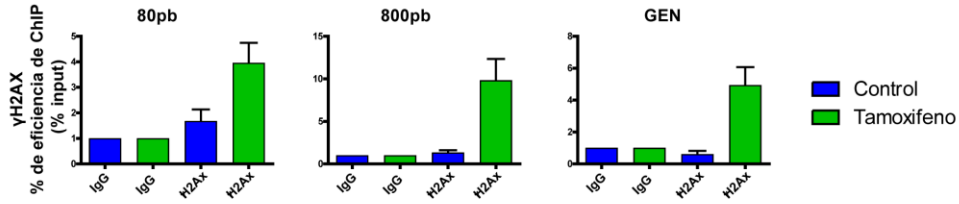
El tratamiento de 4 hrs con tamoxifeno resultó en la aparición de focos de la histona fosforilada γ H2AX, un indicativo de daño en ADN, mientras que en las células control no fueron visibles dichos focos (Fig. R19A). Resultados similares se obtienen al observar un mayor reclutamiento de γ H2AX después del tratamiento con tamoxifeno para la mayoría de los sitios de DSB analizados en ausencia de la actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II (Fig. R19B).

Resultados

A



B



C

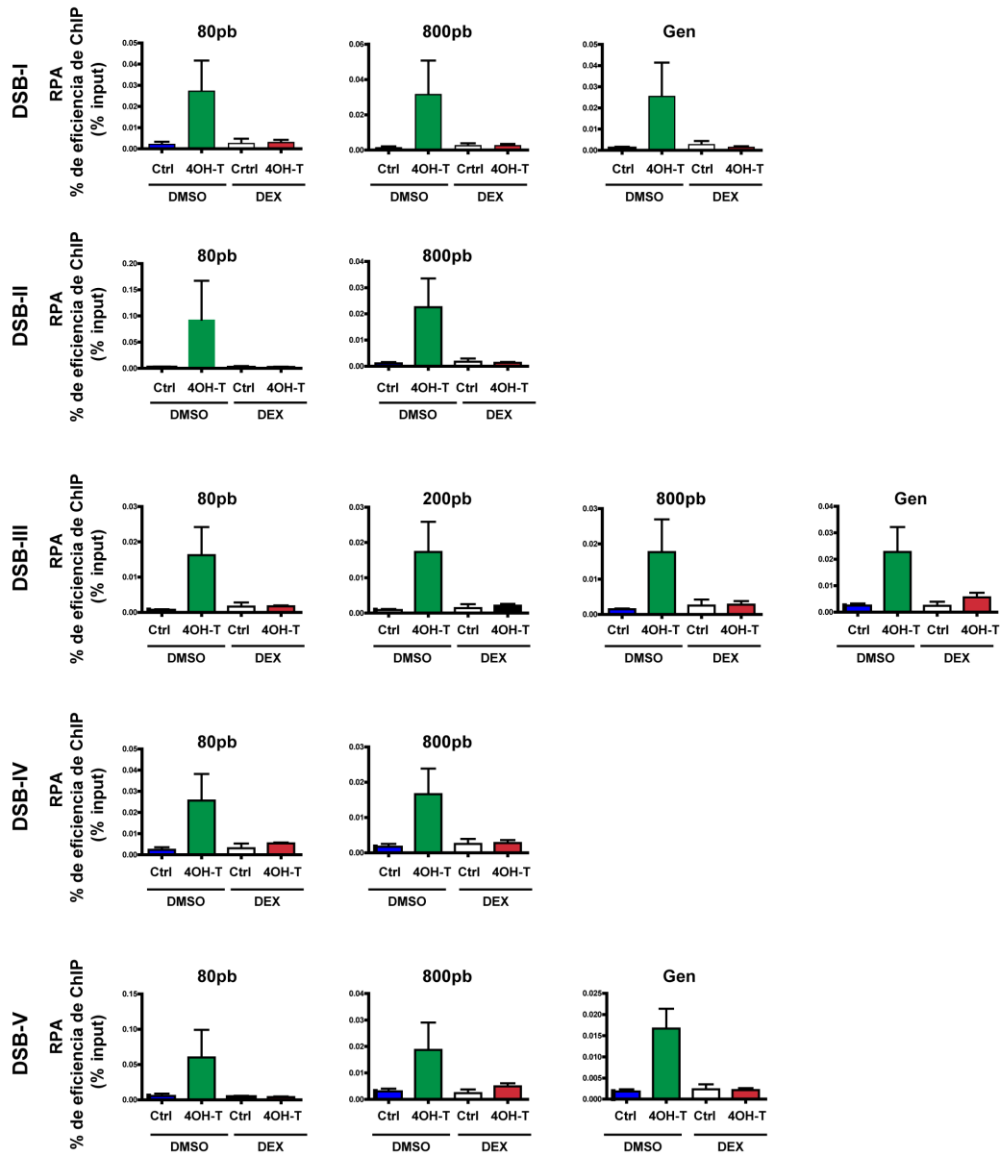


Figura R19. El reclutamiento de RPA se ve afectado por la pérdida de la actividad catalítica de la topoisomerasa tipo II. A) Inmunofluorescencia representativa de células U2OS-DiVA después de 4 hr de tratamiento con 300nM de tamoxifeno, teñidas para γ H2Ax (verde) y DAPI (azul) **B)** Eficiencia de ChIP en diferentes sitios de corte de la enzima *AsiSI* para la γ H2Ax relativo al control (IgG), con y sin daño en el ADN, tratamiento o no con 4 hr de tamoxifeno respectivamente. **C)** Eficiencia de ChIP de RPA en diferentes sitios de corte de la enzima *AsiSI* (DSB-I-IV), relativo al control (IgG), después de ser tratada con Dexrazozano, tanto en presencia o ausencia de daño en el ADN, tratamiento o no con 4 hr de tamoxifeno respectivamente. Se muestra la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

Además, la figura R19C describe que, existió un reclutamiento claro de RPA a cada uno de los sitios de corte de *AsiSI* analizados, y en todos apareció un incremento de señal después del tratamiento con tamoxifeno. Por otro lado, y resultando muy interesante, al añadir el dexrazozano a las células obtuvimos la misma señal como si las células no hubiesen sido dañadas, es decir, no logramos observar un reclutamiento de RPA como en las células con daño en el ADN, pero sin el inhibidor (Fig. R19C).

De esta forma, los datos obtenidos hasta ahora en los ensayos de los focos de RPA, el *SMART* y la inmunoprecipitación de la cromatina nos sugieren fuertemente una implicación de la actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II facilitando el proceso de resección del ADN.

IV. El complejo CtIP-BRCA1 y el papel de la topoisomerasa tipo II en la resección de ADN.

Con la finalidad de encontrar el mecanismo responsable de la colaboración de las topoisomerasas tipo II en la resección del ADN, exploramos la participación de otras proteínas implicadas en la resección y reparación homóloga tales como BRCA1 y CtIP. Se ha descrito una interacción directa entre BRCA1 y TOP2 α (Lou, Minter-Dykhouse et al. 2005) además en el mismo estudio se ha propuesto que BRCA1 controla la actividad de esta enzima mediante la ubiquitación de la misma. Ya que nuestros datos anteriores sugieren una participación del complejo CtIP-BRCA1 en la eliminación de aductos de

topoisomerasa II ocasionados por acción del etopósido, y que BRCA1 controla al menos en parte la actividad de una de las topoisomerasas tipo II, quisimos explorar la implicación de estos factores en la facilitación de la resección del ADN. Inferimos que el complejo CtIP-BRCA1 tendría un efecto sinérgico favoreciendo la velocidad de resección en conjunto con la presencia de la actividad catalítica de estas enzimas. Con tal motivo, decidimos usar los mutantes de CtIP que modifican la interacción con BRCA1 para evaluar la implicación de este complejo junto con la actividad catalítica en la velocidad de resección del ADN.

Persiguiendo aclarar esa premisa, expusimos a cultivos asincrónicos de células expresando de manera estable GFP y las variantes de GFP-CtIP a los inhibidores catalíticos de la TOP2, a las que silenciamos el CtIP endógeno por medio de shRNA. De igual manera que los ensayos realizados con las células U2OS, se trataron las células con los inhibidores por media hora, se crearon cortes de doble cadena por medio de radiación ionizante (10 Gy) y se realizó una inmunofluorescencia para medir focos de RPA una hora después, siempre manteniendo la presencia del inhibidor.

Al analizar las imágenes obtenidas y realizar las cuantificaciones, obtuvimos que, las células que expresan GFP-CtIP fueron capaces de formar focos de RPA para los tres tipos de tratamientos realizados (DMSO, Fig. R20A; DEX, Fig. R20B; y MER, Fig. R20C), mientras que en las células que carecen de CtIP (GFP) se observó una clara reducción en el número de células positivas para focos de RPA en presencia de los inhibidores catalíticos, de acuerdo con el papel relevante de CtIP en regular la resección (Sartori, Lukas et al. 2007; Huertas and Jackson 2009). El mutante GFP-CtIP-S327D se comportó como una proteína silvestre, incluso tuvo un mayor conteo en el número de células capaces de formar focos de RPA para los tratamientos con los inhibidores catalíticos (Fig. R20B-C). En el caso del mutante GFP-CtIP-S327A, se observó una reducción en los focos de RPA ante los tres tratamientos (Fig. R20A-C) aunque ésta no llegó a ser tan marcada como las células que carecen de CtIP. Un *western blot* representativo de la eficiencia del silenciamiento de la proteína CtIP endógena se muestra en la figura R20D.

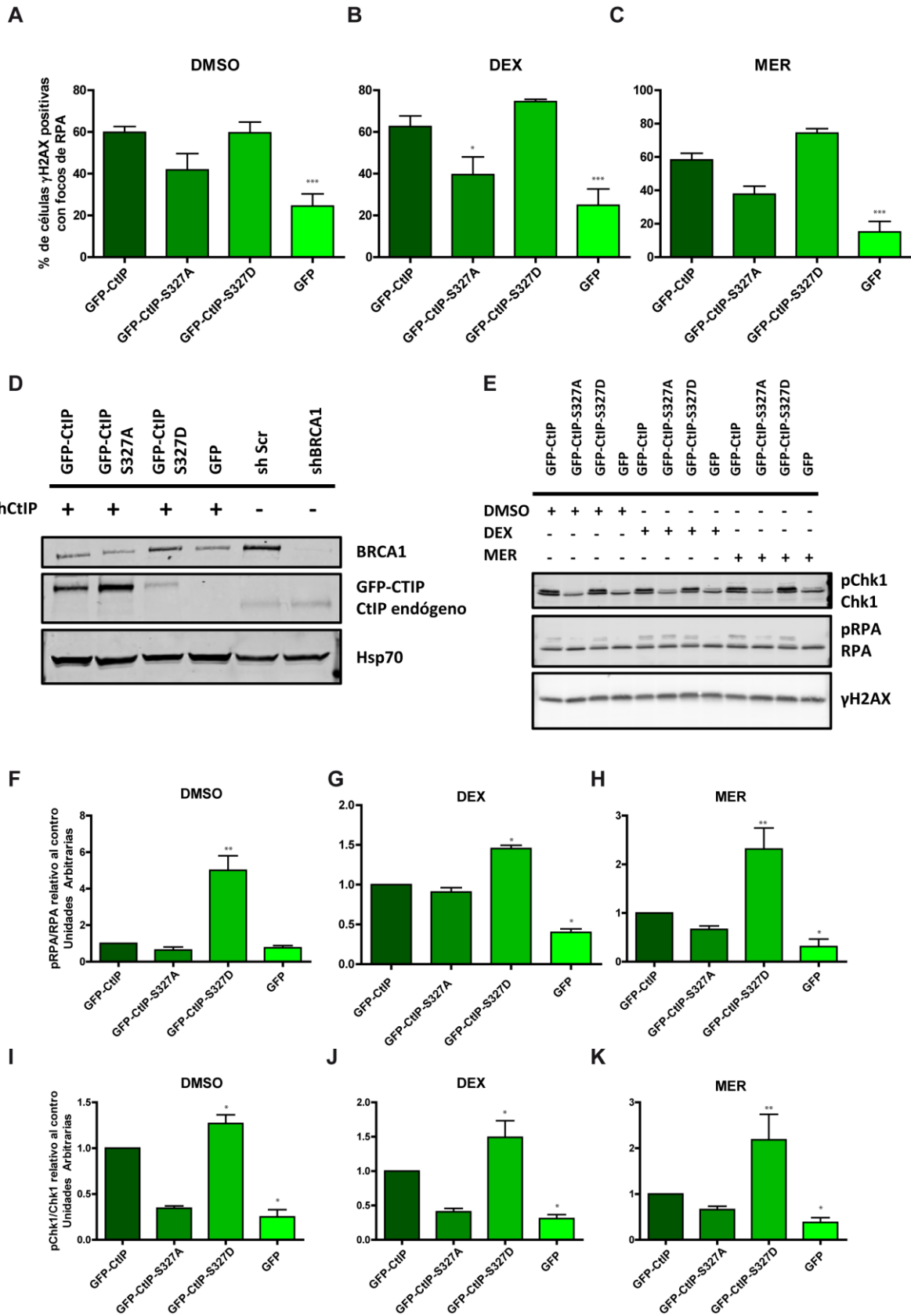


Figura R20. El complejo CtIP-BRCA1 y el papel de la topoisomerasa II en la resección de ADN. A-C) Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA siendo positivas para γ H2Ax una hora después de haber sido irradiadas, y tratadas con DMSO, DEX y MER según se indica. La media y desviación típica de tres experimentos se representa. **D)** *Western blot* representativo de la eficiencia del silenciamiento de CtIP endógeno por medio de shRNA. **E)** *Western blot* representativo de la eficiencia en la fosforilación de RPA en la S4/S8 y pChk1 en la S345 en células silenciadas tratadas con DMSO, DEX y MER una hora después de ser irradiadas con 10 Gy **F-H)** Cuantificación de la señal del ratio pRPA/RPA para cada caso. **I-J)** Cuantificación de la señal del ratio pChk1/Chk1 para cada caso. La media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada.

Para completar este estudio, comprobamos por medio de *western blot* la fosforilación de RPA en las serinas 4 y 8, así como la activación de Chk1 por medio de su fosforilación en la S345. Como se puede observar en la figura R20E, en el caso de la fosforilación de RPA existió una remarcable disminución en los niveles de pRPA (S4/S8) tanto en el fosfomutante S327A como en las células GFP cuando se usaron los inhibidores de la topoisomerasa II (Fig. R20E-H). Por otro lado, cuando observamos los niveles de pRPA (S4/S8) del CtIP silvestre no cambiaron ante los tres tratamientos. Interesantemente, los niveles de pRPA (S4/S8) fueron mucho mayor en el fosfomutante S327D cuando lo comparamos con el CtIP silvestre ante los tres tratamientos (Fig. R20E-H).

Al revisar los niveles de pChk1 (S345) obtenemos resultados en armonía con los obtenidos para pRPA, es decir, existió una disminución en la fosforilación de Chk1 en la S345 en el fosfomutante S327A y en las células que solamente expresan GFP. De igual modo, hubo una mayor señal en la fosforilación de Chk1 con el fosfomutante S327D en los tratamientos (Fig. R20E y I-J).

Como ensayo complementario, evaluamos el efecto de los inhibidores catalíticos de las topoisomerasas tipo II, en células carentes de BRCA1. De la misma manera que para ensayos anteriores se usaron cultivos asincrónicos de células que fueron infectadas con shRNA contra BRCA1. Después del ciclo de selección, los cultivos fueron tratados con los inhibidores por media hora, dañados con 10 Gy de IR y pasada una hora se llevó a cabo la inmunofluorescencia para detectar focos de RPA. Notablemente, la pérdida de BRCA1 de las células condujo a una dramática reducción de focos de RPA ante los tratamientos

utilizados teniendo una mayor reducción cuando se expuso las células a merbarona (Fig. R21A). En la figura R21B se muestra la eficiencia del silenciamiento de BRCA1. Resultados coherentes se obtuvieron al analizar la activación de Chk1 en la fosforilación de la S345 y la fosforilación de RPA en la S4/S8. Encontramos una menor cantidad de pRPA (S4/S8) en el tratamiento con MER. Interesantemente, al tratar las células con DEX, no vimos una diferencia entre el control y las células sin BRCA1 (Fig. R21C-D). Al realizar la cuantificación de pChk1 (S345) también observamos una menor cantidad de pChk1 (S345) al realizar el tratamiento con merbarona, al igual que con dexrazoxano, sin embargo, los resultados de este último presentaron una mayor variación (Fig. R21C y E).

V. Topoisomerasa II alfa es reclutada al sitio de corte de doble cadena.

Para tratar de entender sí el papel que desempeña las topoisomerasas tipo II en la respuesta temprana al daño en el ADN es directo o indirecto, probamos su reclutamiento a sitios de corte de doble cadena por medio CHIP, usando las células DIVA descritas anteriormente en el apartado III de este capítulo. En esta ocasión reflexionamos que, en primera instancia, un corte de doble cadena alivia la tensión dentro del ADN y no serían necesarias las TOP2 para el procesamiento del ADN. Sin embargo, nuestros datos contradicen esta premisa, por lo que inferimos que la presencia de estas enzimas podría estar en sitios más alejados del corte de doble cadena. Similar a lo que ocurre en el proceso de replicación, la tensión topológica en el ADN se acumularía a sitios distantes del corte de doble cadena.

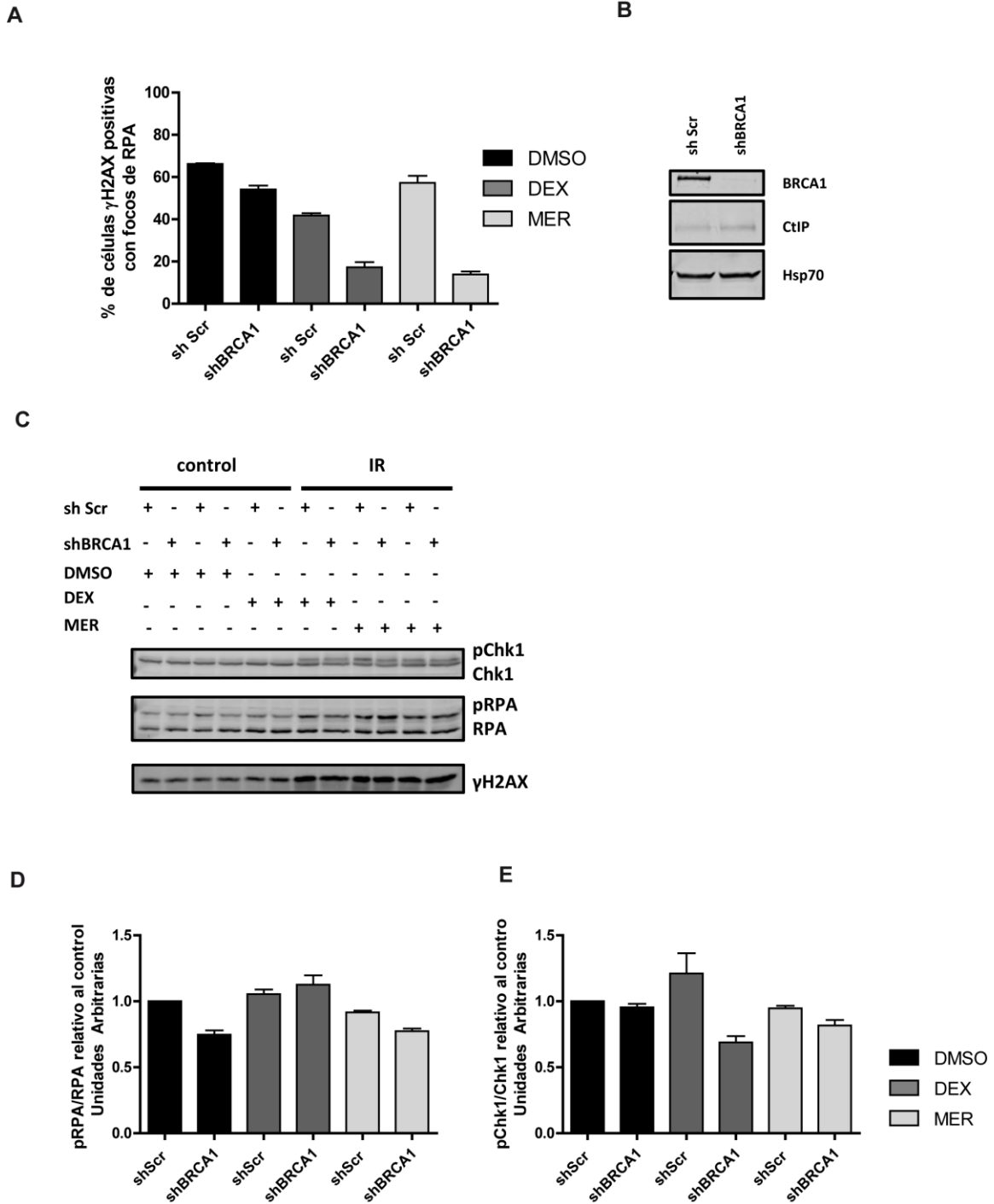


Figura R21. La ausencia de BRCA1 disminuye los focos de RPA en presencia de inhibidores de topoisomerasa II. A) Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA siendo positivas para γ H2Ax una hora después de haber sido irradiadas. Células deplecionadas o no para BRCA1 fueron tratadas con DMSO, DEX y MER tal y como se indica en la figura B) *Western blot* representativo de la eficiencia del silenciamiento de BRCA1 por medio de shRNA C) *Western blot* representativo de la eficiencia en la fosforilación de RPA en la S4/S8 y pChk1 en la S345 en células silenciadas tratadas con DMSO, DEX y MER una hora después de ser irradiadas con 10 Gy, en células silenciadas o no para BRCA1 D) Cuantificación

de la señal del ratio pRPA/RPA para cada caso. **E)** Cuantificación de la señal del ratio pChk1/Chk1 para cada caso. La media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada.

Con el fin de evaluar el reclutamiento de las TOP2 a diferentes distancias del sitio de daño, analizamos los 5 sitios de corte diferentes, descritos anteriormente, analizando tres distancias diferentes, 80pb, 200pb y 800pb respecto al punto de rotura, de igual manera, también analizamos el reclutamiento al gen más próximo al sitio de corte mediante los oligos denominados Gen. Para hacer una cuantificación del reclutamiento de las proteínas de nuestro interés, se realizaron qPCR y se relativizaron los resultados obtenidos usando un anticuerpo específico con respecto a un control de IgG, isotipo de los anticuerpos contra las proteínas de nuestro interés. En la figura R22A se indica que al analizar el reclutamiento de la isoforma TOP2 α , observamos que en la inmensa mayoría de sitios ésta es reclutada de manera dependiente de daño, ya que encontramos un incremento en su señal después del tratamiento con tamoxifeno. Por otro lado, en el caso de la isoforma TOP2 β , en algunos sitios se observó reclutamiento después de daño, pero en muchos otros sitios obtuvimos una pérdida de señal tras el tratamiento con tamoxifeno (Fig. R22B). Además, se observa que el reclutamiento de la isoforma α correlaciona con la lejanía al sitio de corte, es decir, se obtiene más señal de TOP2 α a mayor distancia con respecto al DSB.

Resultados

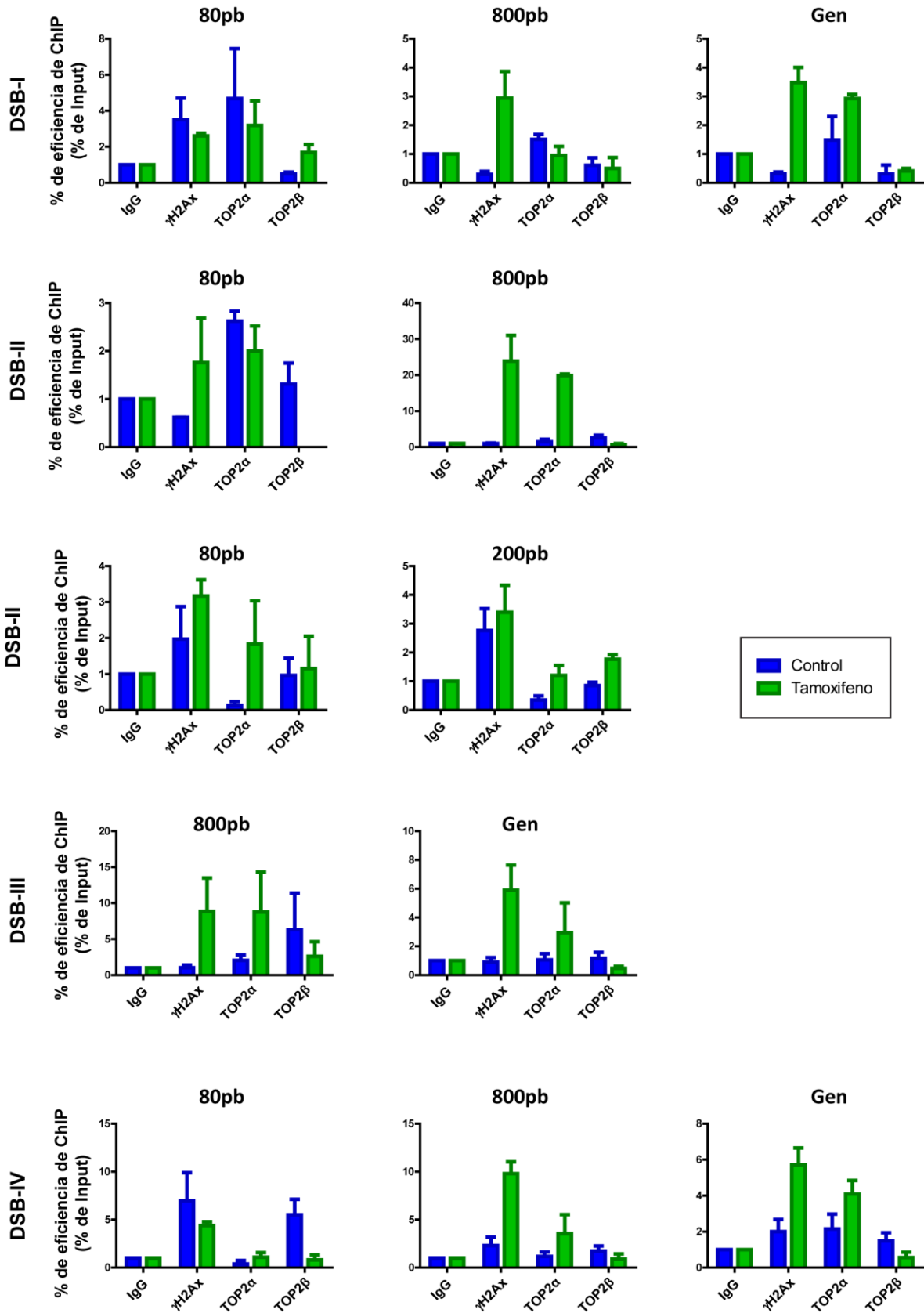


Figura R22. La topoisomerasa II alfa es reclutada a sitios de corte de doble cadena en una manera dependiente de daño. Eficiencia de CHIP en diferentes sitios de corte de la enzima *AsiSI* para las isoformas de la TOP2 y la γ H2Ax relativo al control (IgG), con y sin daño en el ADN, tratamiento o no con 4 hr de tamoxifeno respectivamente. La media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada. Se muestran los resultados de CHIP para tres sitios indicativos de corte de la enzima, analizando el reclutamiento a cuatro distancias diferentes respecto al punto de corte.

VI. La resección de ADN facilitada por las topoisomerasas tipo II no depende de la función estructural de RAD50.

Razonamos que un corte de doble cadena debería liberar la tensión topológica en el ADN y, por lo tanto, las topoisomerasas no serían necesarias para procesar los extremos, pero debido a los resultados obtenidos hasta el momento donde hemos visto que la TOP2 α es recluta a sitios distantes del DSB, inferimos que posiblemente habría un elemento que estuviera manteniendo las cadenas de ADN rotas juntas de algún modo, constriñendo la topología del ADN que rodea el DSB. Un candidato posible era RAD50 del complejo MRN, ya que es de los primeros elementos que acuden a las roturas de doble cadena y tiene un papel estructural manteniendo unido ambos extremos de ADN gracias a su estructura tipo proteína SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*, por sus siglas en inglés).

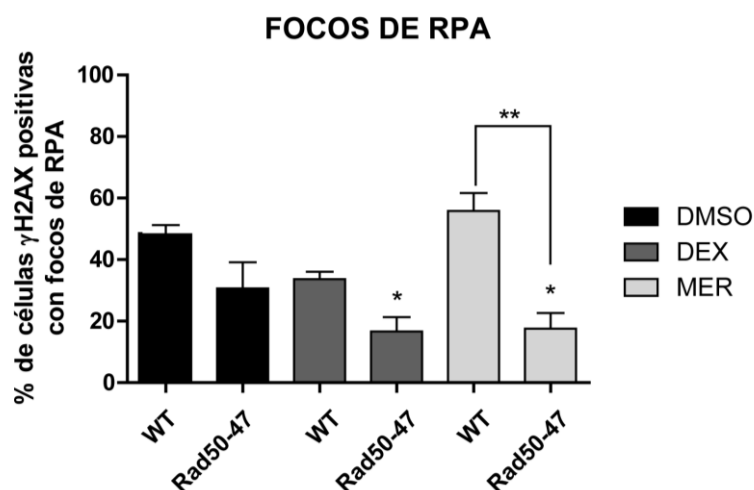


Figura R23. RAD50 no está implicado en el mecanismo por el cual las topoisomerasa II se involucran en resección de ADN.

Histograma del porcentaje del número de células positivas para RPA, siendo positivas para γ H2Ax en fibroblastos embrionarios de ratón expresando el mutante de dominio Hook, RAD50-47 una hora después de haber sido

irradiadas, y tratadas con DMSO, DEX y MER respectivamente. La media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes está indicada.

Así pues, con el fin de explorar la implicación de RAD50 en facilitar la resección en ausencia de la actividad catalítica de las topoisomerasas tipo II realizamos focos de RPA en MEF silvestres y en un mutante de Rad50, denominado mutante Rad50-47, que no permite una propia dimerización por cambios en el dominio encargado de la dimerización de la misma, conocido como dominio *Hook* (Roset, Inagaki et al. 2014). Si la hipótesis de partida fuese cierta, en este fondo mutante las topoisomerasas tipo II no serían necesarias para la resección al eliminar la constricción topológica. Por lo tanto, se usaron cultivos asincrónicos de MEF Rad50-47, que se expusieron media hora a los inhibidores catalíticos de TOP2, dañadas con 10 Gy de IR, incubadas por una hora y procesadas para la inmunofluorescencia para detección de focos de RPA. La pérdida del dominio *Hook* resultó en una disminución en el número de células positivas a focos de RPA *per se*. Sin embargo, esta disminución se exagera en presencia de inhibidores de la actividad catalítica de las topoisomerasas II, tal como se describe en la figura R23.

VII. Vías de reparación afectadas por la topoisomerasa tipo II.

Debido a que nuestros datos arrojan una clara implicación de las topoisomerasas II en facilitar la resección, y además que este evento es clave para la reparación de cortes de doble cadena, nos preguntamos si la ausencia de estas sería suficiente para alterar la eficiencia de reparación por la vía de extremos no homólogos o recombinación homóloga. Con la intención de obtener una visión de manera global del efecto de la pérdida de estas enzimas a las vías de reparación de cortes de doble cadena, analizamos el impacto de la pérdida de ambas isoformas de las topoisomerasas tipo II con diversos sistemas que analizan vías de reparación específicas como las eficiencias de HR (DR-GFP), SSA (SA-GFP) y la NHEJ (EJ5-GFP).

Para llevar a cabo los análisis, se partió de células U2OS estables para cada uno de los sistemas (DR-GFP, EJ5-GFP y SA-GFP), que fueron transfectadas con los siRNA contra las

isoformas TOP2 α y β , siScr como control negativo y siCtIP como control positivo para cada ensayo. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se infectaron con virus que expresan la enzima de restricción *I-SceI* con el fin de generar el corte de doble cadena en el sistema que analiza la vía de reparación correspondiente, las células se fijaron y se analizaron por citometría de flujo veinticuatro horas después de la infección.

Usamos el sistema EJ5-GFP para medir el efecto en vía de reparación por NHEJ. En este sistema, tras la inducción de los DSBs en las dianas de *I-SceI* y su reparación por NHEJ, el gen de resistencia a puromicina se pierde y el promotor unido al resto del sistema restaura la expresión del gen GFP. La ligación de los dos sitios de corte generados por *I-SceI* puede restaurar o no el sitio de corte de *I-SceI*, pero en ambos casos se obtiene la expresión del gen GFP y por tanto células verdes. (Fig. R24A). Al analizar la eficiencia en la reparación por NHEJ, encontramos un ligero y reproducible aumento en la eficiencia con la pérdida de ambas isoformas de la TOP2, sin embargo, dicho aumento no resultó ser estadísticamente significativo con ningún test estadístico aplicado a los datos (Fig. R24A).

Por otro lado, utilizamos el sistema DR-GFP para medir la eficiencia de HR, brevemente, este sistema tiene dos repeticiones directas truncadas del gen GFP y separadas por el gen de puromicina. Una de las secuencias de GFP tiene el sitio de reconocimiento de *I-SceI* (*SceGFP*) y aguas abajo de la *SceGFP* la construcción lleva un fragmento interno de la GFP (*iGFP*), después del corte dentro de *SceGFP*, se produce HR entre ambas secuencias dando como resultado dos posibles escenarios, una conversión génica de tramo corto sin entrecruzamiento dentro de la región homóloga (STGC; tanto usando la copia presente en la misma molécula como en la cromátida hermana) o una delección del producto. Por lo que se obtienen células verdes sólo si ocurre la STGC, ya que de no ser así solo produce una GFP truncada. Al analizar los datos obtuvimos una reducción significativa en la eficiencia de HR, medida como conversión génica, con la pérdida de la isoforma α , sin embargo, la pérdida de TOP2 β no tuvo un efecto sobre esta vía de reparación (Fig. R24B). Este efecto podría deberse a papeles de la TOP2 α en pasos posteriores de la HR, ya sea a nivel de invasión, formación del *D-loop*, etc. Para clarificar este extremo, decidimos probar el papel de las topoisomerasas II en la sub-vía de alineamiento de cadena sencilla (SSA, del

Resultados

inglés *Single Strand Annealing*), una versión simplificada que sólo requiere de resección y anillamiento de regiones homólogas. De esta manera, usamos el sistema SA-GFP, el cual consta en dos fragmentos del gen GFP, el 5'GFP y el SceGFP3. La inducción del corte de doble cadena por la *I-SceI* y su posterior reparación por SSA resulta en un gen GFP funcional, ya que al alinear las secuencias homólogas permiten un apropiado procesamiento y las células fluorecerán en verde. En este caso, obtuvimos un fuerte efecto en la eficiencia con la pérdida de TOP2 α y CtIP y una ligera pero no significativa disminución con la pérdida de TOP2 β (Fig. R24C). La eficiencia en el silenciamiento de TOP2 α , TOP2 β y CtIP se muestra en la figura R24D. Todos estos datos confirman el papel de las topoisomerasas tipo II en los pasos tempranos de la recombinación homóloga.

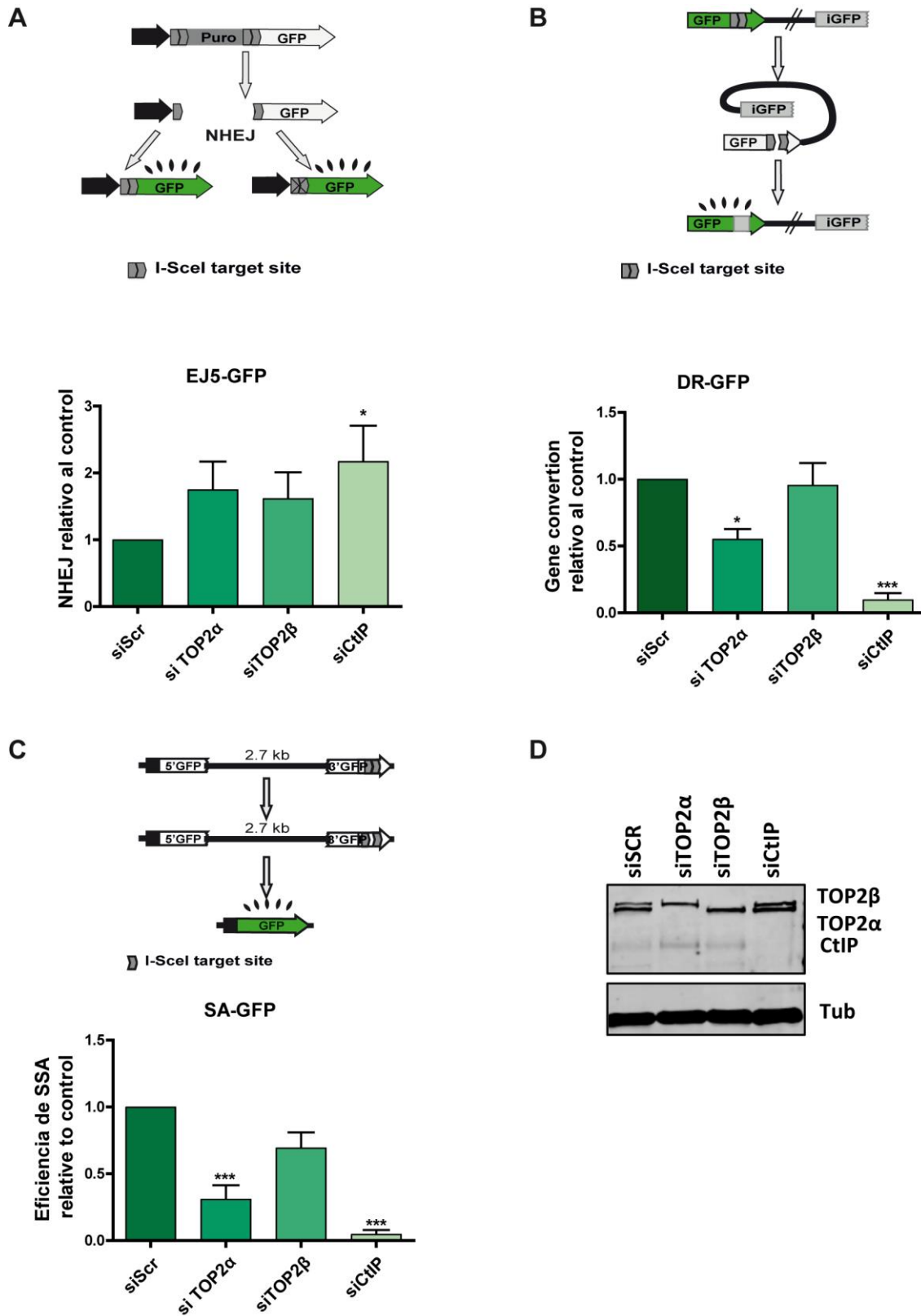


Figura R24. Vías de reparación afectadas por la topoisomerasa II. A) Efecto del silenciamiento de las topoisomerasas tipo II y CtIP en el sistema para medir la eficiencia de reparación por NHEJ, una

Resultados

representación esquemática del sistema se muestra en la parte superior. **B)** Efecto del silenciamiento de las topoisomerasas tipo II y CtIP en el sistema para medir conversión génica, DR-GFP. **C)** Efecto del silenciamiento de topoisomerasas II y CtIP en el sistema para medir *Single Strand Annealing*, SA-GFP. Una representación esquemática del sistema se muestra en la parte superior. La media y desviación típica de tres experimentos se muestran en la inferior. **E)** *Western blot* representativo indicando la eficiencia del silenciamiento de los siRNA utilizados

DISCUSIÓN

I. **SMART, nueva técnica para el análisis de la resección.**

Uno de los primeros eventos que tiene lugar en la reparación de una rotura de doble cadena por recombinación homóloga es la resección, originando un ADN de cadena sencilla. Este proceso es crítico para la reparación de los DSB, ya que el ADNcs generado por la resección es sustrato para esta vía de reparación libre de errores conocida como recombinación homóloga (Heyer, Ehmsen et al. 2010; Huertas 2010). Una reparación adecuada del ADN es esencial para evitar enfermedades tales como el cáncer, por lo que es normal que en muchos tumores existan mutaciones en genes relacionados con la recombinación homóloga (Lord and Ashworth 2012), incluidos genes que codifican proteínas implicadas en la resección como BRCA1 y/o CtIP (Soria-Bretones, Saez et al. 2013; Wang, Ding et al. 2016). En el desarrollo del cáncer, como en muchas otras patologías o procesos biológicos, defectos sutiles pueden acumularse para producir diferencias relevantes en el resultado final. Sin embargo, las técnicas disponibles limitaban las diferencias que podían ser medidas. Tradicionalmente, la resección en eucariotas superiores sólo se podía analizar por la formación de focos de RPA, una estrategia con muy baja resolución, ya que sólo mide si los cortes han superado o no el umbral de resección para permitir la formación de un foco (acumulación de proteínas) de RPA observable al microscopio (Fig R10). Existe también un método basado en la incorporación de BrdU detectado por medio de citometría, que aunque parece ser más sensible que los focos de RPA, comparte con esa técnica solo poder indicar la presencia o no de resección mas no la longitud del tramo reseccionado (Forment, Walker et al. 2012). Esto ha dado como resultado un punto de vista muy simplista, categorizando las proteínas en dos grupos: esenciales o irrelevantes para la resección.

En levaduras, la resección puede ser cuantificada con métodos de alta resolución (Clerici, Mantiero et al. 2006; Zierhut and Diffley 2008; Westmoreland, Ma et al. 2009), sin embargo, este tipo de tecnologías son difícilmente extrapolables a células de vertebrados. Recientemente se ha publicado un ensayo basado en PCR para cuantificar la resección en células humanas, pero este está limitado, ya que como fuente de daño en el

ADN se utiliza una endonucleasa que produce cortes en sitios específicos del genoma (Zhou, Caron et al. 2014). De igual manera, es posible estudiar la resección por ChIP en DSBs creados por nucleasas usando anticuerpos contra RPA (Lopez-Saavedra, Gomez-Cabello et al. 2016).

Por ello, como objetivo de esta tesis nos propusimos crear un método de análisis de la resección a alta resolución en vertebrados, que pudiera ser usado con cualquier tipo de fuente de daño en el ADN. Inferimos que, con la invención de una nueva técnica, de mayor resolución, lograríamos observar una escala de grises en lo que anteriormente era una idea en blanco y negro (Fig. R10). Con este fin, propusimos la modificación de la técnica de *DNA combing* desarrollada por Bensimon et al. como herramienta para medir con una alta resolución la longitud de las fibras de ADN reseccionado, creando un ensayo al que denominamos *Single-Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART)* para visualizar el ADN reseccionado como fibras individuales de ADN de cadena sencilla (Fig. R11). Como hemos demostrado, fuimos capaces de obtener una señal diferencial al comparar las fibras con y sin daño en el ADN. Esta diferencia nos permite concluir que la señal observada depende de la presencia de daño. Además, obtuvimos que en las células que no fueron dañadas casi no se manifiesta señal, indicando que la cantidad de ADNcs en estas es mínima. De hecho, observamos alrededor del 1% de la señal al compáralo con células dañadas. Más aún, aquellas fibras observadas en las muestras control son sustancialmente más cortas. Creemos que estas fibras cortas son producto de la replicación o un reflejo de la resección causada por daños endógenos en las células. En contraste, las células que recibieron tratamiento, crearon abundantes y largas fibras de ADNcs.

Para validar la técnica realizamos cinéticas después del daño y tal como esperábamos, la longitud de las fibras de ADNcs creció en las poblaciones conforme transcurría el tiempo, reflejándose en el desplazamiento de las nubes de dispersión hacia una mayor longitud en micras. Interesantemente, las poblaciones se hacían más dispersas a tiempos largos, lo que sugiere que existen varias poblaciones que están siendo reseccionadas a diferentes velocidades. El *SMART* representa un análisis poblacional, en la que se mide la

longitud del ADN reseccionado en cortes individuales. Dichos cortes pueden pertenecer a células distintas, o incluso estando en la misma célula, representar estructuras de ADN diferente. Estas distintas poblaciones pueden corresponder, por ejemplo, a cortes en heterocromatina frente a cortes en eucromatina, ya que se ha propuesto que la estructura de la cromatina afecta a la velocidad de la resección (Gospodinov, Vaissiere et al. 2011). O también, a células en fase S frente a células en fase G2, que de igual manera se ha observado en levaduras, reseccionan a diferente velocidad (Zierhut and Diffley 2008). O estas diferencias pueden deberse a los distintos tipos de estructuras en el extremo de los cortes causados por radiación ionizante, al hecho de tener proteínas asociadas o no en los extremos, etc. Esto explica la gran variabilidad individual en las medidas que hace que aparezca como una nube de puntos dispersa. A pesar de ello, al analizar las medianas, fuimos capaces de observar un buen ajuste con una correlación lineal entre las medianas de las poblaciones ($R^2=0,9898$). Basados en esta correlación y considerando las características físicas del ADNcs en solución (Chi, Wang et al. 2013), pudimos estimar que la velocidad de la resección en unas células control es alrededor de los 0,2 kb/hr. Velocidad que resulta 20 veces menor a la resección calculada en levaduras por cortes con enzima de restricción (Fishman-Lobell, Rudin et al. 1992; Vaze, Pellicoli et al. 2002). Sin embargo, incluso en levaduras, tan solo el 10 % de los cortes alcanzan esta velocidad ya que la mayoría es reseccionada a una tasa más lenta y con una heterogeneidad similar a la que observamos con *SMART* (Zierhut and Diffley 2008). De hecho, en nuestro caso, no son cortes limpios como los generados con las enzimas de restricción en levaduras, lo cual explicaría por sí mismo la razón de esta diferencia en velocidad.

Obtuvimos datos cruciales al eliminar proteínas clave para el proceso de resección, observamos que la pérdida de CtIP, reducía tanto el número de fibras de ADN reseccionado como la velocidad del proceso, de acuerdo con su papel como proteína crítica que promueve la resección. En contraste, con la depleción de 53BP1, la resección aceleró en la misma proporción que la que redujo la pérdida de CtIP. Este resultado va de acuerdo con las observaciones de que el complejo 53BP1-RIF1 bloquean la resección

(Cao, Xu et al. 2009; Chapman, Barral et al. 2013; Di Virgilio, Callen et al. 2013; Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013). De igual manera, nuestros resultados sugieren que 53BP1, el cual es reclutado a la cromatina dañada en todas las fases del ciclo celular y se extiende varias kilobases, no solo impide la resección en G1, sino que en S/G2 también disminuye la velocidad de resección. Interesantemente mientras la longitud de los tramos de resección para las células que carecen de 53BP1 o CtIP encajaron casi a la perfección con una regresión lineal, cuando eliminamos EXO1, observamos un fenómeno algo curioso; en este caso, si consideráramos todos los puntos de la cinética obteníamos una correlación muy pobre con una R^2 menor a 0,7; pero cuando eliminamos los primeros puntos de la recta (15 min) en las células que carecen de EXO1 mejoró bastante, dando una correlación lineal con una R^2 de 0,94. De esta manera, los resultados sugieren que la resección inicial en células carecientes de EXO1 es muy similar a las células control, pero después su tasa cae casi un 50%. Esta observación va de acuerdo con el papel de EXO1 en la segunda fase de la resección y que es prescindible para la iniciación de la misma (Gravel, Chapman et al. 2008; Huertas 2010).

En conjunto nuestros datos nos dan un indicio de que esta técnica puede ser utilizada para evaluar la resección, y más importante aún, nos permite realizar cálculos para averiguar con qué velocidad está ocurriendo este proceso. El *SMART* es una herramienta que nos puede servir para estudiar efectos sutiles en el proceso de resección. Por ejemplo, nos permite visualizar resección en condiciones en las que los focos de RPA no son observables, como 1 hora después de la inducción de daño en el ADN en células expresando un CtIP menos procesivo. La maquinaria de la resección de tramo largo, EXO1 y BLM (Gravel, Chapman et al. 2008; Huertas 2010), podría causar esta resección observada en las células que carecen del CtIP óptimo. Esto correlaciona con las observaciones en levaduras, en las que en la ausencia de Sae2, Exo1 es capaz de reseccionar el ADN, aunque a una velocidad menor (Moreau, Morgan et al. 2001; Clerici, Mantiero et al. 2006). Así, CtIP que fue previamente descrito como totalmente esencial para la resección (Sartori, Lukas et al. 2007), actúa en una manera similar a sus homólogos en levaduras Sae2 y Ctp1, facilitando la resección, aunque esta tiene lugar

aun en la ausencia de ellos pero a una velocidad menor. Además, el desarrollo de esta nueva técnica de mejor resolución para el estudio de la resección, afecta nuestro punto de vista simplista del proceso, permitiéndonos detectar cambios sutiles en la resección que previamente eran ignorados, como cambios en su velocidad o cuando no se afecta el número de células que van a reseccionar ni el número de cortes que son reseccionados pero este procesamiento de los extremos progresa más cerca o lejos de la rotura (Fig. R15). Por el simple conteo de células positivas a focos RPA sería imposible observar tales efectos. De esta manera usando el *SMART* se abre un nuevo campo de posibilidades.

Creemos que esta nueva tecnología nos ayudará a desentrañar y entender el complejo mundo de la resección del ADN y por lo tanto de la recombinación homóloga, de hecho, esta herramienta ha sido de utilidad en investigaciones sobre el control de la resección por medio de modificaciones postraduccionales, no solo por nuestro grupo (Jimeno, Fernandez-Avila et al. 2015), sino también por otros grupos de investigación (Meir, Galanty et al. 2015; Densham, Garvin et al. 2016), de igual manera ha contribuido en la descripción de nuevos factores que antagonizan este proceso (Lopez-Saavedra, Gomez-Cabello et al. 2016).

Finalmente, el *SMART* puede ser, en principio, fácilmente extrapolado a cualquier sistema celular, desde bacterias hasta células humanas, y puede servir para analizar la resección creada por cualquier agente que dañe el ADN, en cualquier lugar del genoma. A pesar, de las nuevas oportunidades que nos brinda el *SMART* para el estudio de la resección frente al conteo de los focos de RPA, es importante destacar que ambas técnicas son complementarias. El *SMART* nos brinda la velocidad y la longitud de ADNcs formado de aquellas roturas que han reseccionado. Pero no hace consideración si el número de cortes reseccionados o el número de células capaces de reseccionar es el mismo. Sin embargo, los focos de RPA reflejan una combinación de ambos, el número de cortes que han empezado a reseccionar y que tan lejos ha llegado la resección en los cromosomas.

II. El papel sutil en resección de la interacción entre CtIP y BRCA1

CtIP es una proteína multivalente, ya que puede interactuar con muchas otras para controlar procesos clave en la fisiología celular, incluyendo la resección y, por tanto, la reparación de los cortes de doble cadena en el ADN. Uno de sus interactores más conocidos es BRCA1, un importante supresor de tumores con una gran implicación en la reparación de los cortes de doble cadena. En este trabajo investigamos la relación que tiene la interacción de CtIP-BRCA1, mediada por la fosforilación de CtIP en la serina 327 (Yu and Chen 2004; Yu, Fu et al. 2006; Chen, Nievera et al. 2008), en el proceso de resección en humanos, tratando de esclarecer la controversia en su implicación en este proceso.

En concordancia con estudios previos (Sartori, Lukas et al. 2007; Huertas and Jackson 2009; Yun and Hiom 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010), obtuvimos que tanto la carencia de CtIP como la ausencia de la interacción entre CtIP y BRCA1 confieren sensibilidad ante la presencia de cortes de doble cadena, demostrando así un claro papel en la reparación de estos. Sin embargo, nuestros datos indican que este complejo no es absolutamente necesario para el proceso de resección, ya que la formación de focos de RPA no se ve afectada tras tratamientos con radiación ionizante o camptotecina ni en el mutante S327A, incapaz de interactuar con BRCA1, ni en ausencia de BRCA1 (Fig. R5). Aun así y, gracias a la técnica de *SMART*, podemos categorizar ahora su función en la resección con más detalle. Claramente observamos que la resección tiene lugar en ausencia de BRCA1, pero esta ocurre a una velocidad menor, este efecto es más prominente cuando el extremo 5' de los DSBs está bloqueado con los aductos de la topoisomerasa II unidos al mismo. Por tanto, podemos concluir que el papel de BRCA1 en la resección es incrementar la procesividad de la misma (Fig. D1). De hecho, esta función es totalmente dependiente de la interacción entre CtIP y BRCA1 y puede estar relacionado con el papel de antagonizar a 53BP1-RIF1 de los sitios de DSBs (Chapman, Barral et al. 2013; Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013). Interesantemente, el mutante S327A acumula focos de RIF1 en las fases S y G2 del ciclo celular (Escribano-Diaz, Orthwein et al. 2013), y

la falta de 53BP1 acelera la resección. Aun cuando hemos esclarecido un poco más el papel del complejo CtIP-BRCA1 todavía quedan algunos aspectos a explorar sobre la regulación de este complejo. Recientemente, nuestro grupo ha observado que la interacción entre CtIP y BRCA1 esta modulada por una modificación postranscripcional llamada neddilación, capaz de potenciar la interacción entre ambas proteínas y controlar la procesividad de la resección (Jimeno, Fernandez-Avila et al. 2015).

Nuestros datos concuerdan con lo publicado por Nakamura y colaboradores en 2010 (Nakamura, Kogame et al. 2010), pero en principio contradice los resultados publicados por el grupo de Kevin Hiom en 2009 (Yun and Hiom 2009). Sin embargo, pensamos que este papel sutil del complejo CtIP-BRCA1 podría dar explicación a esta aparente contradicción. A diferencia de nuestro trabajo, realizado con células de osteosarcoma humano (U2OS), ambos grupos realizaron su investigación utilizando células de pollo (DT40). Algo a tener en cuenta es que mientras en el laboratorio de Hiom realizaron los ensayos de complementación utilizando un CtIP humano, tanto el gen silvestre como mutante a alanina en la S327, Nakamura y colegas, utilizaron el gen de pollo, sobre el cual crearon la mutación para bloquear la unión con BRCA1 (S322A) (Nakamura, Kogame et al. 2010). Por tanto, es posible que el gen de pollo CtIP mutante en la serina 322, al igual que ocurre en nuestro modelo de U2OS, sea capaz de iniciar de manera eficiente el proceso de resección, aunque el proceso en sí sea menos procesivo. Sin embargo, la expresión de un transgén de origen humano en DT40, que posiblemente no complemente totalmente la delección, combinada con una versión ligeramente menos procesiva de la proteína debida a la mutación en S327, genere defectos más evidentes en resección observables incluso a nivel de focos de RPA. Esto se vería aún más exacerbado por el hecho de que en el caso del estudio de Hiom y colaboradores se utiliza DMSO como vehículo de la droga que causa la aparición de los cortes de doble cadena. Este solvente produce un estrés a las células que, según sabemos gracias a diversas observaciones en nuestro laboratorio, directamente tiene un impacto en resección. De hecho, y contrario a lo que veníamos argumentado sobre la participación del complejo CtIP-BRCA1 en resección, en el capítulo II de resultados cuando analizamos el fenotipo causado por la falta de dicho complejo en

presencia de DMSO (el solvente en el que van disueltos los inhibidores de las topoisomerasas) se observa un menor conteo de células positivas para RPA, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas a ningún test realizado (Fig. R20). Todo parece indicar que el efecto aditivo de diversos efectos sutiles (presencia de DMSO, ausencia del complejo CtIP-BRCA1, uso de un transgén de otra especie, etc.) logra producir un efecto observable en ensayos de menor resolución como los focos de RPA.

Este efecto tan sutil en resección del complejo, que pareciera ser irrelevante, puede explicar las consecuencias a largo plazo de BRCA1 en el desarrollo de tumores. La longitud del ADN reseccionado, regula el mecanismo de reparación que actuará en un corte de doble cadena (Hartlerode and Scully 2009; Heyer, Ehmsen et al. 2010; Huertas 2010). Mientras que la unión de extremos no homólogos clásica, solo ocurre en extremos con un mínimo o sin ningún procesamiento, la unión de extremos no homólogos mediada por micro-homología requiere de la resección que expone tramos cortos de homología (Hartlerode and Scully 2009). Más aún, la resección es esencial para todos los tipos de reparación dependientes de homología, pero cada una de ellas requiere una cantidad diferente de ADN reseccionado (Hartlerode and Scully 2009; Heyer, Ehmsen et al. 2010; Huertas 2010). Por ejemplo, un procesamiento limitado podría facilitar que el ADN recién sintetizado atrape el ADN reseccionado para formar una estructura de Holliday, favoreciendo así la recombinación en la cual los entrecruzamientos pudieran ocurrir (Hartlerode and Scully 2009; Heyer, Ehmsen et al. 2010; Huertas 2010). Por el contrario, una resección extensa, puede incrementar las posibilidades de que repeticiones no alélicas situadas en el mismo cromosoma se reparen por la vía de reparación mutagénica conocida como alineamiento de cadena sencilla (SSA) que siempre produce deleciones en los cromosomas (Hartlerode and Scully 2009; Heyer, Ehmsen et al. 2010; Huertas 2010).

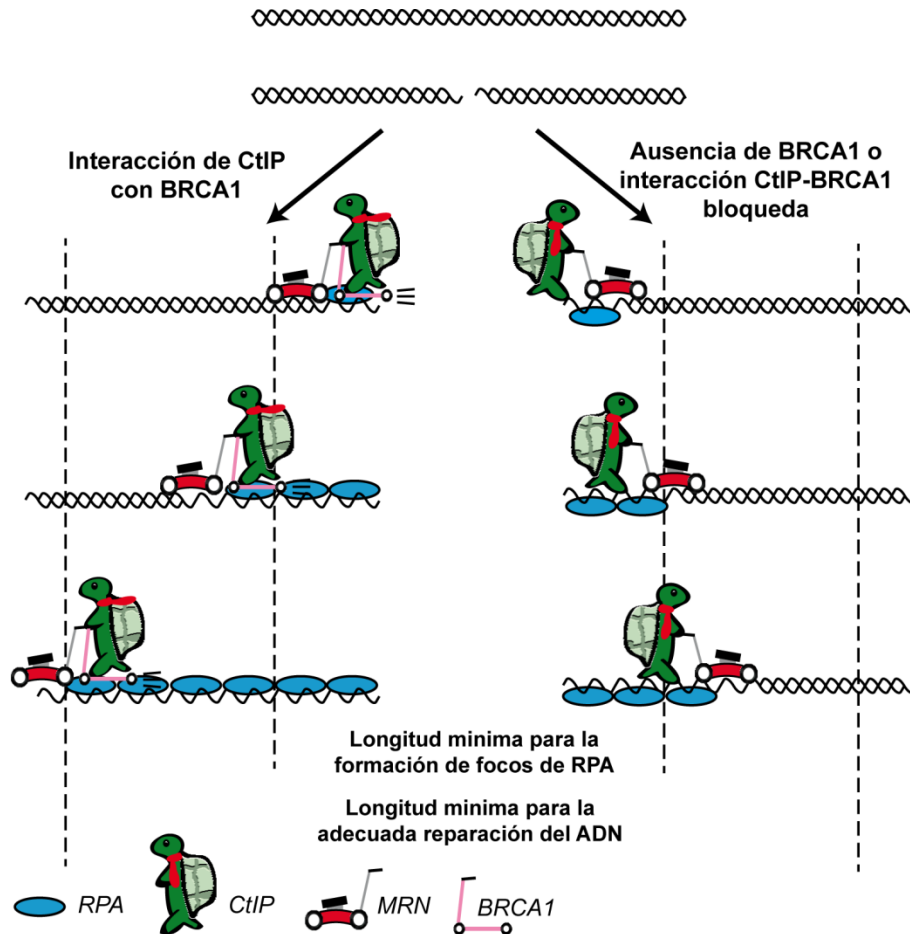


Figura D1. El papel sutil de la interacción entre CtIP y BRCA1 en resección. La interacción entre CtIP-BRCA1 no es propiamente esencial para la resección, este proceso ocurre aun en la ausencia de BRCA1 o de la interacción CtIP-BRCA1, aunque este sucede a una tasa menor (derecha). Por otro lado, en presencia del complejo CtIP-BRCA1, la resección ocurre a una mayor velocidad (izquierda).

III. El complejo CtIP y BRCA1 en el procesamiento de extremos bloqueados en su extremo 5'

Por otro lado, al analizar los focos de RPA tras el tratamiento con etopósido, encontramos que tanto en el mutante S327A como en las células carecientes de BRCA1, observábamos una clara disminución en los focos de RPA tras el tratamiento con ETOP. El etopósido

atrapa covalentemente a la topoisomerasa II en el extremo 5' del DSB, mientras que la CPT atrapa a la topoisomerasa I en el extremo 3', por lo tanto, sospechamos que tanto BRCA1 como la interacción entre CtIP-BRCA1 son especialmente importantes para eliminar a las proteínas unidas covalentemente en el extremo 5' del DSB. Para reparar las roturas causadas por venenos de las topoisomerasas son necesarias proteínas que eliminan a la enzima unida al ADN y/o reparan el corte resultante. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la interacción de CtIP con BRCA1, más allá de su sutil efecto en la resección propiamente dicha, está afectando de alguna manera la liberación de las topoisomerasas del ADN o a la reparación del mismo posteriormente, en concordancia con lo publicado previamente (Sartori, Lukas et al. 2007; Huertas, Cortes-Ledesma et al. 2008; Huertas and Jackson 2009; Nakamura, Kogame et al. 2010; Polato, Callen et al. 2014). Sin embargo, aún no se ha determinado si actúa en el paso de liberación de la topoisomerasa o en la reparación posterior del corte que queda. Posiblemente se trate de un proceso conservado, ya que Ctp1 (homólogo funcional de CtIP en *Schizosaccharomyces pombe*) es necesario para la liberación y posterior reparación de las topoisomerasas tipo II bloqueadas, mientras que la liberación de la topoisomerasa tipo I no se afecta en mutantes *ctp1Δ* pero sí su posterior reparación (Hartsuiker, Neale et al. 2009) y el mutante *ctp1Δ* acumula más Top2 covalentemente unida al ADN en respuesta al tratamiento con TOP-53 (un derivado de ETOP) que el silvestre, lo que sugiere que Ctp1 juega un papel en la eliminación de los polipéptidos covalentemente unidos a los extremos 5' de DSBs. De igual manera, tanto Ctp1 en *S. pombe* como Sae2 en *S. cerevisiae*, son necesarios para la eliminación de la nucleasa de la familia de la topoisomerasa II Spo11 en meiosis (Hartsuiker, Neale et al. 2009). Así, mientras los daños inducidos por IR o algunas drogas, pueden ser reseccionados aun en ausencia de Sae2 (Moreau, Morgan et al. 2001), la eliminación de los aductos de SPO11 durante la meiosis es completamente dependiente de dicha proteína (Neale, Pan et al. 2005). Sin embargo, existe una diferencia esencial entre los sistemas de levaduras y el de los vertebrados, ya que las primeras no tienen homólogo de BRCA1. Como BRCA1 está implicado en la degradación de los complejos atrapados de TOP1 y su escisión junto con el proteosoma (Kikuchi, Taniguchi et

al. 2005) y el complejo CtIP-BRCA1 junto al complejo MRN son necesarios para eliminar los aductos de la topoisomerasa II del ADN (Aparicio, Baer et al. 2016), existe la posibilidad de que en eucariotas superiores exista un nivel adicional de complejidad en la reparación de aductos de topoisomerasas controlada por la interacción CtIP-BRCA1.

IV. Las topoisomerasas tipo II en la resección.

Las topoisomerasas son enzimas que catalizan la interconversión entre los distintos isómeros topológicos del ADN. Se clasifican dependiendo el número de cortes que efectúan si hacen un corte en una o ambas cadenas del ADN, denominadas en tipo I y tipo II respectivamente. En esta tesis nos hemos centrado solo en las topoisomerasas tipo II. Los cambios topológicos que efectúan estas enzimas son requeridos por una gran variedad de procesos biológicos, como la transcripción, replicación y la segregación de los cromosomas (Chen, Chan et al. 2013; Bush, Evans-Roberts et al. 2015). Debido a la participación de las topoisomerasas en estos procesos del metabolismo del ADN es fácil suponer que desempeñan un papel importante o esencial en la reparación de este y la tolerancia al daño. Aunque muchos investigadores han sugerido un papel de las topoisomerasas en la reparación del ADN (Adachi, Suzuki et al. 2003; Lou, Minter-Dykhouse et al. 2005; Park and Avraham 2006; Mandraju, Kannapiran et al. 2008; Terry, Riches et al. 2009; Sunter, Cowell et al. 2010; Mandraju, Chekuri et al. 2011), en la actualidad hay poca información sobre la función concreta de estas enzimas en este proceso, más aún, la extensa mayoría de los reportes disponibles hasta el momento son con el uso de agentes inhibidores de las topoisomerasas que por sí mismos ocasionan daño en el ADN, como es el caso del etopósido.

Existen pocos modelos de cómo estas podrían influir en la reparación. En principio, hay tres funciones generales que podrían desempeñar las topoisomerasas según propone John Nitiss (Nitiss 1998):

- 1) Las topoisomerasas podrían participar directamente en la reparación del ADN. Esto podría incluir el reconocimiento del daño más eficientemente, o hacer más eficaz la unión de las enzimas de reparación a los sitios de daño en el ADN debido a la topología de este ADN alterado, o una participación directa en la reacción de reparación.
- 2) Las topoisomerasas podrían regular la expresión de genes importantes para la reparación del ADN.
- 3) Las topoisomerasas podrían influir en la supervivencia después de la exposición al daño del ADN por mecanismos indirectos. Cambios en el súper enrollamiento del ADN mediado por las topoisomerasas podrían alterar la reactividad del mismo ante agentes que lo dañan. Por ejemplo, los agentes intercalantes de ADN se unen más ávidamente a un ADN súper enrollado negativamente que a ADN relajado. Pero una amplia variedad de otros mecanismos indirectos también es posible.

En esta tesis hemos demostrado que la inactivación con el uso de inhibidores catalíticos de las topoisomerasas tipo II en células humanas (U2OS), ocasionan directamente una disminución en los niveles de resección en las células. Aunque con ambos compuestos se afectó la resección y el comportamiento frente a ellos es similar, los resultados más efectivos y con menor variación fueron obtenidos con el tratamiento con la bisdioxopiperazina (dexrazoxano). Esto probablemente debido a la especificidad por las topoisomerasas tipo II, su afinidad por la TOP2 α o bien por su forma de acción sobre estas. Mientras la merbarona previene el corte del ADN por TOP2, las bisdioxopiperazinas tales como el dexrazoxano (DEX, ICRF-187) inhiben la hidrólisis de ATP y mantienen TOP2 como una pinza cerrada (Nitiss 2009), sin embargo ninguna de estas inhiben la unión de estas enzimas al ADN. Algo importante a notar es el efecto que tienen las diferentes concentraciones usadas en el caso del DEX, esperábamos observar que, a mayor concentración de la droga detectaríamos un efecto más dramático en la resección, sin embargo, esto no fue así en el caso de los focos de RPA. Este fenómeno podría explicarse porque se produzca una saturación del sistema secuestrando a la enzima en otras

localizaciones, tal como se ha descrito para un veneno diferente como la Doxorubicina que induce formación de focos de γ H2AX a una concentración de 1 μ M pero que a concentraciones superiores la inhibe (Lyu, Kerrigan et al. 2007). En concordancia, esto no ocurre cuando se mide resección por fosforilación de RPA, que puede responder a la procesividad del evento y no sólo al número de cortes que están siendo reseccionados. Desconocemos a ciencia cierta el origen de este fenómeno, pero de lo que estamos seguros es que la inhibición de estas enzimas afecta la resección, tal como lo sugiere la ausencia de las mismas en células humanas deplecionadas para cada una de las isoformas y células de ratón *knock out* para la isoforma β .

En primera instancia esperábamos que la isoforma α fuese la que diera más efecto en la resección, ya que a esta isoforma se le ha ligado con más procesos relacionados con el metabolismo del ADN como la replicación, además se ha descrito que su pico de expresión se encuentra durante las fases S/G2 (Bush, Evans-Roberts et al. 2015), misma fase donde puede ocurrir la resección como se explica en la introducción (Apartado II.c.i) Sorprendentemente, esta isoforma apenas tuvo efecto en los focos de RPA, y no fue hasta que probamos con técnicas más sensibles como el *SMART* o el *ChIP* de RPA cuando logramos ver un efecto. Así mismo, observamos claramente un reclutamiento de la isoforma α al ADN cercano a un DSB. Una posible explicación de aparente discrepancia puede ser que el silenciamiento de la isoforma α o su inactivación por medio de inhibidor catalítico de la familia de las bisdioxopeperazinas (ICRF-197) conlleva a una respuesta alterada frente a radiación ionizante, causando una menor frecuencia en el número de cortes en los cromosomas tras ser irradiadas las células (Terry, Riches et al. 2009).

Por otro lado, la expresión de la isoforma β no depende del ciclo celular, y se encuentra en todas las fases de este, actualmente se desconocen la función de esta por completo, pero se le ha relacionado ampliamente con la regulación de la expresión de ciertos genes. Nuestros resultados sugieren una nueva función al facilitar la resección. De hecho, no es la primera vez que esta isoforma ha sido vinculada con la reparación de ADN ya que se ha visto que la falta de esta isoforma conlleva a una menor fosforilación de la histona H2AX

después de daño por radiación ionizante (Sunter, Cowell et al. 2010). Así mismo, esta isoforma se ha implicado en promover la reparación de DSBs después de daño provocado con peróxido de hidrógeno en células nerviosas (Mandraj, Kannapiran et al. 2008; Mandraj, Chekuri et al. 2011).

Otra considerable evidencia de la participación de estas enzimas en resección fue dada por una clara disminución en la eficiencia de reparación por *Single Strand Annealing* (SSA), tipo de reparación que es totalmente dependiente de tramos largos de resección. De hecho, la falta de una de la topoisomerasas fue suficiente para incrementar la eficiencia por la vía de reparación de NHEJ, aunque como se mencionó anteriormente en resultados, estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas. De igual forma, al evaluar la eficiencia de reparación por recombinación homóloga por el sistema DR-GFP, obtuvimos una disminución de esta cuando eliminamos de las células la isoforma α y, una menor y no significativa reducción al eliminar la isoforma β . Una vez más, logramos observar una respuesta desigual entre ambas isoformas, indicándonos que, aunque ambas isoformas están involucradas en resección, estas estarían realizando funciones distintas. En sintonía con esto, Mandraj et al sugieren que la isoforma α acelera el daño en ADN mientras que la isoforma β se encarga de promover la reparación ya que la ausencia de esta última causó mayor sensibilidad contra peróxido de hidrógeno (Mandraj, Kannapiran et al. 2008). De acuerdo con esta idea se ha demostrado que TOP2 β puede interactuar con diferentes proteínas tales como TopBP1 (*Topoisomerase Binding protein 1*) (Yamane, Kawabata et al. 1997) y WSTF (*Williams syndrome transcription factor*) (Xiao, Li et al. 2009), esta última relacionada con la correcta señalización de H2AX en presencia de daño. De esta manera la TOP2 β estaría implicada no solo en facilitar la resección sino también en la detección y señalización del daño. Alternativamente, esta isoforma podría estar envuelta en la regulación de genes involucrados con el DDR, como se ha demostrado con una disminución en la expresión del gen peroxiredoxina 2 en células con menor expresión de TOP2 β (Chikamori, Hill et al. 2006).

Por otro lado, en nuestros resultados en el reclutamiento de las isoformas de las topoisomerasas por CHIP pudimos observar que la TOP2 α es reclutada a los sitios de DSBs, pero no la TOP2 β , resultado en armonía con lo publicado sobre la localización nuclear de la primera (McClendon and Osheroff 2007). Además, estos nos indican que TOP2 α es requerida en posiciones más alejadas del daño. Este fenómeno cobra mucho sentido, ya que una rotura de doble cadena cambiaría la topología del ADN, relajándolo en el sitio de corte y como consecuencia, haciendo teóricamente prescindible la presencia de las topoisomerasas en la zona más cercana, pero siendo importante en regiones más alejadas. Por otro lado, notamos un efecto curioso, en aquellos sitios que observamos el reclutamiento de la isoforma α se manifestó un desplazamiento de la β , este fenómeno se asemeja a lo que sucede en mitosis en la que esta última se aleja de los cromosomas al ser reclutada la primera (McClendon and Osheroff 2007). Interesantemente este desplazamiento solo ocurre en los sitios más alejados del corte (800 pb y GEN), ya que en los más cercanos no observamos una reproducibilidad en este fenómeno. El que no encontremos un reclutamiento de la isoforma β pero sí de la α podría indicar que existe un mecanismo regulador entre estas isoformas. Una posible explicación sería que la isoforma β se encuentra en el ADN previamente a la aparición del daño, y que es desplazada por la isoforma α una vez iniciada la resección, para facilitar la extensión de este proceso. Esto explicaría el fenotipo tan marcado en la eficiencia de reparación por SSA (vía de reparación dependiente de tramos largo de resección) al eliminar la isoforma α del contexto celular y va en armonía en que la β tenga un efecto sutil en esta. En este escenario, la falta de la isoforma β solo lograría mermar el número de cortes que empezarían a reseccionar, pero una vez comenzado este fenómeno ya no veríamos una diferencia con respecto al control, justo lo que nos arrojan nuestros resultados. Esta teoría explicaría los demás efectos en las diferencias con los otros dos sistemas de reparación, en la que la falta de la isoforma α presenta un fenotipo más marcado. Esta manifestación de resultados diferentes viene a dar más fuerza a la premisa en la que ambas isoformas participan de manera diferencial en la resección. También explicaría por qué en primera instancia no observamos una bajada en el número de focos de RPA al silenciar la isoforma

α (Fig. R17), pero sí fuimos capaces de observar el efecto con la técnica de mayor sensibilidad (*SMART*). Por otro lado, el no observar el reclutamiento de RPA por medio de ChIP en un contexto de actividad catalítica limitada por la acción del dexrazozano viene a reforzar la idea no solo que esta actividad es importante para resección, sino que el efecto tan drástico que obtuvimos pudiera deberse de hecho a la inhibición conjunta de ambas isoformas, especialmente la β , que sospechamos es necesaria para estadios tempranos en el procesamiento del ADN. Esta idea apoyaría indirectamente la premisa de que dicha isoforma está relacionada con la detección de la rotura (Mandraj, Kannapiran et al. 2008; Sunter, Cowell et al. 2010).

Tratando de averiguar el mecanismo por el cual las topoisomerasas ayudan en la resección, probamos el efecto que tendría eliminar del contexto celular proteínas importantes para la eliminación de aductos de las topoisomerasas y la recombinación homóloga tales como BRCA1 y CtIP. Al evaluar la resección en células en un fondo sin BRCA1, sin CtIP o sin la interacción de estas, no fuimos capaces de ver un efecto epistático con los inhibidores de las topoisomerasas, indicándonos que ni BRCA1, CtIP ni el complejo de estas dos proteínas están involucradas en el mecanismo de actuación de las topoisomerasas en resección.

Resumiendo, nuestras observaciones en conjunto evaluando la resección, por la formación de focos de RPA y la longitud de fibras de ADN de cadena sencilla por *SMART*, junto con lo observando en el reclutamiento de RPA a sitios de DSBs por ChIP en ausencia de la actividad catalítica de las topoisomerasas, nos indican una clara implicación de las topoisomerasas tipo II en la resección, sugiriendo que estas facilitan la procesividad de esta, y que ambas tienen funciones diferentes en este proceso. Creemos que la isoforma α está probablemente involucrada en el control del tamaño de la resección, mientras que la isoforma β facilita la resección a un nivel global, en estadios más iniciales, con una mayor implicación en decidir el número de roturas en el ADN que se van a reseccionar. Esto apoyaría indirectamente la teorías publicadas donde se atribuyen papeles diferentes en la reparación del ADN a las isoformas de topoisomerasa tipo II (Mandraj, Kannapiran et al.

2008) y directamente a los modelos propuestos por John Nitiss sobre la participación de estas enzimas en la reparación del ADN (Nitiss 1998).

CONCLUSIONES

1. La técnica de *Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART)* como una técnica para medir la resección a niveles de moléculas individuales, proporciona la longitud de la resección en un escenario determinado y permite calcular la velocidad a la que el proceso tiene lugar. Esta herramienta nos permite detectar efectos sutiles en el proceso de resección que previamente eran ignorados.
2. El complejo CtIP-BRCA1 no es esencial para que ocurra la resección de los cortes de doble cadena. Sin embargo, BRCA1, a través de su interacción con CtIP, juega un papel sutil en el control de la resección mediando, especialmente, la velocidad a la que ocurre el proceso.
3. La presencia de este complejo es especialmente requerida para el procesamiento de los extremos de los cortes generados por el veneno de la topoisomerasa II.
4. La interacción de CtIP y BRCA1 es necesaria para una correcta señalización del *checkpoint* de ATR.
5. Para un eficiente procesamiento de los cortes de doble cadena en el ADN se requiere de la presencia de la actividad catalítica de las topoisomerasas de tipo II. Ambas isoformas están involucradas en este proceso.
6. La isoforma α de la topoisomerasa II es reclutada a la cercanía de los cortes de doble cadena, pero no la isoforma β . Los puntos de mayor señal de reclutamiento se encuentran en sitios más distales del punto del corte.
7. La topoisomerasas del tipo II influyen en la elección en la vía de reparación de los cortes de doble cadena. La ausencia de ambas isoformas, en especial la α , conduce a un aumento en el NHEJ y una disminución en HR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas de cultivo celular

A. Líneas Celulares y métodos de cultivo

En esta tesis se utilizaron los siguientes tipos celulares (Tabla M1). Las líneas celulares U2OS, HEK293 y HEK293T, se cultivaron en incubadores HEPA class 100 (Thermo) a 37° C y 5 % de CO₂ en medio *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS; Sigma), 2mM de L-glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco). En el caso de las líneas celulares MEF se cultivaron en DMEM completo a 37° C en condiciones de hipoxia al 3 % de O₂.

Las líneas celulares derivadas de HEK293 y U2OS expresando proteínas de fusión GFP-CtIP, GFP-CtIP-S327A, GFP-CtIP-S327D y GFP, se cultivaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, con la adición de 0,5 mg/ml de G418 (A1720, Sigma).

Las líneas derivadas de U2OS que expresan shRNAs contra diferentes genes (Tabla M2) y las líneas celulares con los sistemas DR-GFP, SA-GFP y EJ5, se cultivaron en el mismo medio indicado usando como selección puromicina (1 µg/ml, P8833, Sigma).

Tabla M1. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.

Línea celular	Características	Resistencia	Referencia
U2OS	Línea de osteosarcoma humano	Ninguna	ATCC HTB-96
HEK293T	Embrionaria de riñón humano inmortalizada con el antígeno T	Neomicina Kanamicina	ATCC CRL-11268
HEK293	Embrionaria de riñón humano	Ninguna	ATCC CRL-1573
U2OS-DR-GFP	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema DR-GFP (Conversion Génica).	Puromicina Ampicilina	Cedida por Dr. Stphen P. Jackson (Sartori et al, Nature 2007).
U2OS-SAGFP	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema SAGFP (<i>Single Strand Annealing</i>).	Puromicina Ampicilina	Generada en nuestro laboratorio por Ana López-Saavedra por integración estable del plásmido hprtSAGFP (Addgene 41594).
U2OS-EJ5	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema EJ5 (NHEJ Total).	Puromicina Ampicilina	Generada en nuestro laboratorio por Ana López-Saavedra por integración estable del del plásmido pimEJ5GFP (Addgene 44026).
U2OS-GFP-CtIP	Línea U2OS que lleva integrado el gen exógeno GFP-CtIP.	G-418	Cedida por Dr. Stphen P. Jackson (Sartori et al, Nature 2007).
U2OS-GFP-CtIP-S327A	Línea U2OS que lleva integrado el gen exógeno GFP-CtIP en su versión fosfomutante S327A.	G-418	Generada por Pablo Huertas en el laboratorio de Stephen P. Jackson.
U2OS-GFP-CtIP-S327D	Línea U2OS que lleva integrado el gen exógeno GFP-CtIP en su versión fosfomimético S327D.	G-418	Generada por Pablo Huertas en el laboratorio de Stephen P. Jackson.

Línea celular	Características	Resistencia	Referencia
U2OS-GFP	Línea U2OS que lleva integrado el gen exógeno GFP.	G418	Cedida por Dr. Stephen P. Jackson (Sartori et al, Nature 2007).
U2OS-DIVA	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema inducible que genera cortes de doble cadena con la enzima de restricción AsiSI en respuesta a tamoxifeno.	Puromicina	Cedida por Dra. Gaëlle Legube (Aymard F. et al, Nature Structural & Molecular Biology, 2014).
HEK293-GFP-CtIP	Línea HEK293 que lleva integrado el gen exógeno GFP-CtIP.	G418	Generada para esta tesis a partir del plásmido pGFP-CtIP.
HEK293-GFP-CtIP-S327A	Línea HEK293 que lleva integrado el gen exógeno GFP-CtIP en la versión fosfomutante S327A.	G418	Generada para esta tesis a partir del plásmido pGFP-CtIP-S327A.
HEK293-GFP-CtIP-S327D	Línea HEK293 que lleva integrado el gen exógeno GFP-CtIP en la versión fosfo mimética S327D.	G418	Generada para esta tesis a partir del plásmido pGFP-CtIP-S327D.
HEK293-GFP	Línea HEK293 que lleva integrado el gen exógeno GFP.	G418	Generada para esta tesis a partir del plásmido pGFP.
MEF-WT	Fibroblastos embrionarios de ratón	Ninguna	Cedidos por John Petrini.
MEF TOP2β ^{-/-}	Fibroblastos embrionarios de ratón, homólogos recesivos para la isoforma beta del gen Topoisomerasa 2.	Ninguna	Cedida por Caroline Austin (Errington et al. Molecular Pharmacology, 1999).

Línea celular	Características	Resistencia	Referencia
MEF RAD50-47	Fibroblastos embrionarios de ratón expresando la versión mutante Rad50-47.	Ninguna	Cedido por John Petrini.

B. Crio conservación y descongelación de células

Para la conservación de las células, un mínimo de 1 millón de células son tripsinizadas, centrifugadas durante 5 minutos a 500 g y temperatura ambiente, resuspendidas en 1 ml de solución de congelación (FBS y DMSO al 10 %). Se realizan alícuotas en crio viales de 1,5 ml que son depositados en contenedores *MrFrosty* (C1562, Sigma). Los contenedores se guardan a -80° C durante 24 horas (este sistema permite el descenso gradual de la temperatura 1° C/minuto) lo que permite una congelación óptima de las células para su almacenamiento durante largos periodos de tiempo. Finalmente, los viales se trasladan a tanques con nitrógeno líquido para la conservación a largo plazo.

Los viales de células congeladas se descongelan en un baño a 37° C, e inmediatamente tras su descongelación se transfieren a un tubo falcon de 15 ml conteniendo 5 ml de medio de cultivo completo. Se centrifugan durante 5 min a 500 g a temperatura ambiente y se aspira el medio, eliminando así el DMSO. Las células se resuspenden en 5 ml de medio completo y se colocan en una placa de 10 cm con otros 5 ml de medio completo. Entonces, las placas se incuban a 37° C con las condiciones óptimas de O₂ o CO₂ según el caso.

C. Transfecciones

Según las necesidades experimentales y el tipo celular se realizaron dos métodos de transfecciones diferentes, por medio de *FuGENE* o por el método de fosfato de calcio, los cuales se describen a continuación.

a. *FuGENE*

Se siembran 5×10^5 células U2OS en una placa de 10 cm y se incuban a 37° C durante 24 horas. Siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante, se realiza una mezcla a concentración final de 0.20 µg/µl del plásmido de interés en *OptiMEM* (Gibco, 11058-021)

con una relación 3.5:1 *FuGENE*:Plásmido. Para ello, se mezclan 7.2 µg de ADN en 332 µl de *OptiMEM*, posteriormente se añade 21 µl de *FuGENE HD* Transfection Reagent (Promega, E2312). Se mezcla suavemente mediante una micropipeta automática y se incuba durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se añade gota a gota sobre el medio mientras se agita suavemente la placa para conseguir una distribución homogénea y minimizar el efecto tóxico del reactivo de transfección.

b. Fosfato de Calcio

Se siembran $2,7 \times 10^6$ de células HEK293T en placas de 10 cm 24 horas antes de la transfección. Las células deben tener una confluencia del 40-50% en el momento de la transfección. Treinta minutos antes de comenzar la transfección se renueva el medio. Se prepara una mezcla con él o los plásmidos de interés hasta tener 30 µg de ADN total. Se añade 250 mM concentración final de CaCl_2 y se complementa el volumen hasta 500 µl con agua bidestilada. Por otro lado, se preparan tubos de 15 ml con 500 µl de una solución 2XHBS (Tampón Hepes Salino, Sigma 51558). Mientras se burbujea, se añade la mezcla de los plásmidos y el CaCl_2 gota a gota sobre la solución 2XHBS. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se añade al medio gota a gota mientras se agita suavemente la placa, permitiendo la distribución homogénea de la mezcla de transfección. Se incuban las células a 37° C durante 24 horas. Pasado ese tiempo se cambia el medio. En el caso específico para la creación de las líneas HEK293-GFP, GFP-CtIP, GFP-CtIP-S327A y GFP-CtIP-S327D, se usó una cantidad total de 15 µg de ADN del correspondiente plásmido.

D. Producción y Transducción viral

La producción de partículas lentivirales se realizó básicamente con el protocolo descrito anteriormente por Gómez-Cabello et al, 2013. De forma breve, mediante la cotransfección en células HEK293T de los plásmidos para la envuelta, pVSVG (5 µg), para la cápside viral p8.91 (10 µg) y el vector de interés, shRNA ó el plásmido pBFP-*I*Scel (15 µg), por el método de cloruro de calcio, descrito anteriormente.

Se realizaron dos protocolos diferentes de producción y transducción según las necesidades experimentales:

a. Para silenciamiento génico.

Pasadas 48 horas después de la transfección, se recupera el medio con la ayuda de una jeringa, se aspira el medio de cultivo y se filtra con filtros de PVDF de 0.45 µm. Se agrega medio normal a las placas con HEK293T y se vuelven a incubar a 37° C. El medio que ha sido filtrado se diluye 1:1 con medio normal, y se agrega 8 µg/ml de bromuro de

hexadimentrina (Polybrene, Sigma H9268). La mezcla de medio y virus conteniendo la hexadimentrina se puede almacenar a -80° C hasta su uso o bien se continúa con la transducción directamente, teniendo en cuenta que partiendo de una placa de 10 cm se pueden infectar 2 placas de 10 cm. Para proseguir con la transducción, a las células que serán infectadas se les retira el medio y se agrega el medio conteniendo los virus. Se incuban las células en condiciones normales durante 24 horas (37° C, 5 % CO₂). Pasadas 24 horas se repite el procedimiento de recuperar el medio, filtrar, diluir e infectar, en esta ocasión ya no se agrega medio normal a las HEK293T sino se preparan para su eliminación. Un día después de la última infección, se retira el medio de cultivo y se realizan dos lavados con PBS 1X, añadiendo por último medio de cultivo completo y así las células están listas para llevar a cabo los experimentos según se requiera.

Tabla M2. shARN utilizados en esta tesis

Gen blanco	Descripción	Comercial	Referencia
Scramble	pLKO.1-puro Non-Target shRNA Control Plasmid DNA	Sigma	SHC016
CtIP (RBBP8)	TRCN0000318736	Sigma	NM_0022894.1-3008s1c1
BLM	TRCN0000004906	Sigma	NM_000057.1-3578s1c1
EXO1	TRCN0000010331	Sigma	NM_130398.x-2736s1c1
BRCA1	TRCN0000009823	Sigma	NM_007294.x-7048s1c1
53BP1	TRCN000000	Sigma	NM_001003931.1-2109s1c1

b. Para expresión de la BFP-ISceI.

En este caso se procede de la siguiente manera. Después de incubar las células HEK293T durante 48 horas, se recogen los virus, para ello, se aspira el medio de cultivo con jeringas y se filtra con filtros de PVDF de 0.45 µm. El filtrado se coloca en tubos especiales para ultracentrífuga cuidando de no llenar demasiado los tubos, dejando aproximadamente 2 cm libres desde la boca. Las muestras se centrifugan a 22.000 rpm durante 1,5 horas a 4° C (Avanti 301 Rotor JS 24-15), tras lo cual se retira el sobrenadante y se resuspende el

precipitado (invisible) en 500 µl de DMEM por placa de 10 cm. Se realizan alícuotas de 2, 5, 50, 100, 200 y 500 µl. Se almacenan a -80° C hasta su empleo.

En el momento de continuar con la transducción, se utilizan células sembradas del día anterior. El día de la transducción se prepara una mezcla de medio DMEM con hexadimetrina a 8 µg/ml, y partículas lentivirales a una MOI (Multiplicity of Infection; ver titulación lentiviral (I.II.V.b) de 5 o 10 (según los ensayos). Al día siguiente se procede a realizar un lavado con PBS 1X y a añadir medio nuevo. Se incuban las células durante 48 horas, tras las cual, se retira el medio y se realizan tres lavados con medio normal. Después del tercer lavado las células están listas para realizar el experimento correspondiente.

E. Citometría de flujo.

a. Análisis del Ciclo Celular

Se siembran 300.000-500.000 células en placas de 6 cm en medio de cultivo normal. Tras ser sometidas a los tratamientos experimentales necesarios, las células son recogidas por tratamiento con tripsina (Sigma, T4049). Las muestras se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavan con PBS 1X. Las células se resuspenden en 200 µl de PBS frío y se fijan añadiendo 2 ml de etanol frío al 70 % gota a gota agitando suavemente y por las paredes del tubo. Se incuban durante al menos 2 horas a 4° C y a continuación se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realiza un lavado con PBS 1X y se resuspenden en un volumen de 200 µl de PBS 1X. Se tratan las muestras con una mezcla de PBS 1X con RNasa A a 0,2 mg/ml (Sigma, R5503) e yoduro de propidio a 1 µg/µl (Sigma, P4864). Se incuban a 37° C durante 15-30 minutos y se conservan en oscuridad a 4° C hasta su análisis. Se emplea un citómetro de flujo "BS FACSCalibur™ Flow Cytometer" (BD Biosciences, 342975) y el software "Cell Quest Pro" para el análisis de las muestras.

b. Titulación de la producción lentiviral

Tras la producción lentiviral de BFP-IsceI (apartado D de esta sección), se calcula la cantidad de virus producidos, para lo cual se cultivan 25.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Al día siguiente, se prepara medio de cultivo DMEM completo con 8 µg/ml de hexadimetrina y se añade 1 ml de dicha mezcla a todos los pocillos a los que previamente se les ha retirado el medio de cultivo. A continuación, se añaden 0, 5, 10 y 20 µl de una dilución 1:10 en medio DMEM del stock lentiviral (la alícuota de 2 µl previamente separada en la producción lentiviral). Se mezcla suavemente y se incuba durante 24 horas. Al día siguiente se realiza un lavado con PBS 1X y se añade medio fresco

incubando hasta un total de 72 horas desde el día de la transducción. Después, las células se lavan con PBS 1X, son tripsinizadas, neutralizadas con medio DMEM completo y centrifugadas en tubos para citometría a 500 g por 5 min a temperatura ambiente. Se realiza un lavado con PBS 1X y se fijan con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a 4° C. Las muestras se centrifugan a 500 g durante 5 min a temperatura ambiente, se realizan dos lavados con PBS 1X y finalmente, se resuspenden en 100-200 µl de PBS 1X para su análisis mediante citometría. El análisis del número de células infectadas se cuantifica mediante citometría con el equipo FACSAria (láser BP 407 nm y filtro 450/40) (Shaheen, Faqeih et al.). Se cuentan 10 000 eventos (células) y se cuantifica cuántas expresan la proteína fluorescente azul (BFP). El título (nº de unidades infectivas/ml) se calcula en base al número de partículas infectivas del 25-50 % de células azules.

c. Análisis de proteínas fluorescentes y vías de reparación in vivo por FACS

Para el análisis de proteínas fluorescentes. Se siembran 50.000 células en cada pocillo. Al día siguiente, las células son infectadas con partículas lentivirales que contienen el plásmido pBFP-*I-SceI* el cual expresa la proteína azul fluorescente y la enzima de restricción *I-SceI* (BFP-*I-SceI*). La infección se realiza a una M.O.I. 5 y hexadimetrina a 8 µg/ml tal como se describe en el apartado I.II.IV.a. Después de 16-18 horas de la infección, las células son lavadas con PBS, tripsinizadas, neutralizadas con medio DMEM completo y centrifugadas en tubos para citometría a 500 g. Se realiza un lavado con PBS y se fijan con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a 4° C. Las muestras se centrifugan, se realizan dos lavados con PBS y finalmente, se resuspenden en 100-200 µl de PBS para su análisis mediante citometría en un equipo BD FACSAria. Los datos son recogidos y analizados mediante el software FACSDiva v5.0.3. Se consideran cinco parámetros, side scatter (SSC), forward scatter (FSC), la fluorescencia azul (láser BP 407 nm y filtro 450/40), la fluorescencia verde (láser BP 488 nm y filtro 530/30) y la fluorescencia roja (láser BP 488 nm y filtro 575/26). Se contabilizan 10.000 eventos azules (células que expresaban la proteína BFP) y se cuantifica el número de células verdes fluorescentes y/o rojas del total de células positivas a la fluorescencia azul. Se realizaron duplicados de cada condición experimental y se realizaron triplicados de cada experimento.

Para el análisis de vías de reparación in vivo. Se emplearon los sistemas DRGFP, SAGFP y EJ5 realizando silenciamientos génicos para su caracterización y para el estudio del efecto en reparación de genes de interés. De igual manera, se siembran 50.000 células de cada uno de los sistemas en placas de 12 pocillos. Al día siguiente se transfectan con el siRNA

que se requiera, con el procedimiento anteriormente descrito en apartado C.a. Pasadas 24 horas post transfección se transducen con partículas lentivirales que contienen el plásmido pBFP-*I-SceI* y se continua el procedimiento como se ha descrito anteriormente.

Un esquema de los sistemas de reparación empleados aparece en la Figura M1 y una breve descripción de los mismos se realiza a continuación.

d. Descripción de los Sistemas de Reparación in vivo

a. DR-GFP

El sistema DR-GFP se compone de dos repeticiones directas (DR) truncadas del gen GFP y separadas 3,7 kb por el gen de la puromicina N-acetiltransferasa. Uno de los genes de GFP, *SceGFP*, contiene el sitio de reconocimiento de la nucleasa *I-SceI* (18 pb), que durante su clonación generó un cambio de fase de lectura dando dos codones de paro, finalizando así la traducción. Cuando la enzima de restricción se expresa *in vivo*, en la copia *SceGFP* se produce un corte de doble cadena. Aguas abajo de la *SceGFP* la construcción lleva un fragmento interno de la GFP (iGFP) de 812 pb. Como resultado de la recombinación homóloga entre dichas secuencias, se pueden generar dos productos de recombinación: una conversión génica de tramo corto sin entrecruzamiento dentro de la región homóloga (STGC; tanto usando la copia presente en la misma molécula como en la cromátida hermana) o una delección del producto. En ambos casos, la secuencia iGFP actúa como donador de información. La delección de una región se puede dar tanto por un evento de recombinación conservativa asociado a un entrecruzamiento o por una reparación no conservativa por alineamiento de cadena simple en la que la secuencia entre las dos repeticiones de la GFP es degradada. Mientras los eventos STGC restauran un gen de la GFP intacto, por lo que las células fluorescen en verde, un evento de delección por el que se mantiene sólo el extremo 5' de la GFP codificaría una proteína carboxilo terminal truncada.

b. SA-GFP

El sistema SA-GFP consiste en dos fragmentos del gen GFP, el 5'GFP y el *SceGFP*3', los cuales comparten 266 pb de homología. La inducción del corte de doble cadena por la endonucleasa *I-SceI* y su posterior reparación por SSA resulta en un gen GFP funcional, ya que al alinear las secuencias homólogas permiten un apropiado procesamiento y las células fluorecerán en verde. Además, como resultado de la reparación por SSA se elimina un fragmento de 2,7 kb del cromosoma. El sistema puede ser reparado también por otros tipos de recombinación homóloga, pero esta reparación no restaura un gen funcional de la GFP y por tanto no se puede cuantificar mediante este sistema.

c. EJ5

El sistema EJ5 detecta múltiples tipos de eventos de reparación por NHEJ, es por tanto considerado un ensayo para medir el NHEJ total. El EJ5 contiene un promotor que está separado de un gen que codifica para la GFP por un gen de resistencia a puromicina y que estaba flanqueado por dos sitios para la endonucleasa I-SceI en la misma orientación. Tras la inducción de los DSBs en la diana de I-SceI y su reparación por NHEJ, el gen de resistencia a puromicina es escindido y el promotor unido al resto del sistema restaura la expresión del gen GFP. La ligación de los dos sitios de corte generados por I-SceI puede restaurar o no la diana de I-SceI, pero en ambos casos se obtiene la expresión del gen GFP y por tanto células verdes.

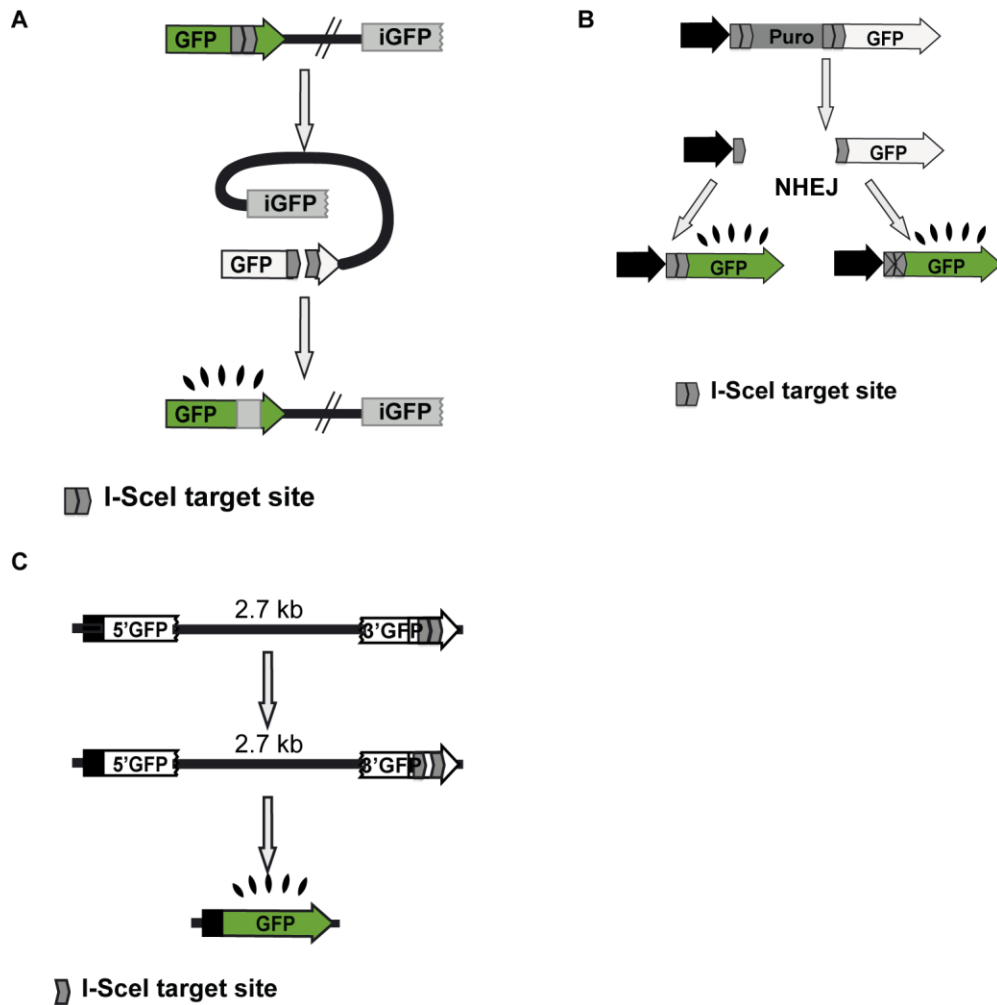


Figura M1. Representación gráfica de los Sistemas de Reparación in vivo. A, Sistema DR-GFP (Direct-repeat GFP). B, Sistema SA-GFP. C, Sistema EJ5.

F. Ensayos de supervivencia celular (Clonogénicos)

Se siembran células U2OS transfectadas de manera estable con las respectivas proteínas de fusión, GFP-CtIP, GFP-CtIP-S327A, GFP-CtIP-S327D y GFP en placas de 6 pocillos, a una concentración de 250 células en tres de los pocillos y 500 células en los otros tres. Se incuban a 37° C durante 24 horas. Se tratan con las diferentes concentraciones de camptotecina, CPT (0.01, 0.1 y 1 mM) y etopósido, ETOP (2, 5 y 10 µM) usando como control DMSO. El tratamiento se mantiene durante 1 hora, tras el que se reemplaza el medio de las placas por medio de cultivo fresco y se dejan crecer durante 10-14 días en condiciones óptimas (37° C y 5 % de O₂), hasta la formación de colonias. Para la visualización de las colonias se realiza una tinción con cristal violeta. Para ello, se elimina el medio de cultivo y se lava dos veces con PBS 1X, se tiñen las células con una solución al 0,5 % de cristal violeta (Merck) y 20 % de etanol. Cuando las colonias están teñidas, se retira el cristal violeta y se lava con agua del grifo. Una vez secas, se cuenta el número de las colonias y se referencian al tratamiento con DMSO, tomándolo como el 100 %. Para calcular el valor de cada muestra se hace la media de las seis replicas (tres con 250 células y tres con 500 células).

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

A. Manipulación del ADN

Amplificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se amplificó en *Escherichia coli* DH5α (DH5α: *SupE44 Δlac U169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) competentes (producidas por el Servicio de Organismos Modelos del centro). Para ello, se transforman por choque térmico. Brevemente, se mezclan 50 µl de células competentes con 50-100 ng de ADN y se incuban en hielo 30 minutos. A continuación, las bacterias se someten a un choque térmico incubándolas a 42° C durante 120 segundos, tras lo cual se colocan en hielo por 3 min. Después, se añade 1 ml de medio LB (Luria-Bertani, 10 g/L NaCl, 10 g/L bacto triptona y 5 g/L de extracto de levadura) y se incuban durante 1 hora a 37° C en agitación (200 rpm). Las bacterias se recogen por centrifugación (13.000 rpm/1min) y se siembran en LB suplementado con el antibiótico de selección (ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (25 µg/ml)). El ADN se purifica con el kit "*Pure Yield Plasmid Maxiprep System*" (A2392, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN en solución

se estima por el espectrofotómetro ND-1000 (*Nanodrop*) según la absorbancia a 260 nm. En la tabla M3 se detallan los plásmidos usados en esta tesis.

Tabla M3. Plásmidos utilizados en esta tesis

Plásmido	Características	Resistencia	Referencia
pVSVG	Expresión proteínas envuelta viral	Ampicilina	Cedido por el Dr. Felipe Cortés Ledesma
p8.91	Expresión proteínas cápside	Ampicilina	Cedido por el Dr. Felipe Cortés Ledesma
pRRLEF1aHA.NL S.SceOPT.T2A.Tag BFP (pBFP- <i>I</i> SceI)	Expresa la proteína azul fluorescente y la enzima de restricción <i>I</i> -SceI	Ampicilina	Addgene (31484) (Certo et al., 2011)
pEGFP-C1-CtIP	Expresión de GFP-CtIP		Huertas et al 2008
pEGFP-C1-CtIP-S327A	Expresión de GFP-CtIP-S327A	Ampicilina	P. Huertas
pEGFP-C1-CtIP-S327D	Expresión de GFP-CtIP-S327D	Ampicilina	P. Huertas
pEGFP-C1	Expresión de GFP	Ampicilina	Clontech (6084-1)
pHALO-BARD1	Expresión de BARD1	Ampicilina	Cedido por Dr. Ko Sato
pSFB-BRCA1	Expresión de BRCA1	Kanamicina	Cedido por Dr. Ko Sato

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis del ADN se realiza en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X teñido con *RedSafe* (21141, *Intron Biotechnology*). A las muestras se les añade tampón de carga (10X *Loading buffer*, Takara). La imagen es visualizada mediante el *software Quantity One* (Bio-Rad).

Digestión del ADN con enzimas de restricción

Para la digestión de fragmentos de ADN se usan nucleasas de la empresa Takara siguiendo las instrucciones del fabricante.

B. Análisis del ARN

Extracción de ARN

Las células cultivadas en placas son lavadas con PBS 1X y tripsinizadas. Posteriormente centrifugadas a 500 g durante 5 min a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante. El pellet es congelado a -80° C o directamente se procede a la extracción mediante el *kit RNeasy mini kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de ARN total

La concentración del ARN en solución es estimada por el espectrofotómetro ND-100 (*Nanodrop*) según la absorbancia a 260 nm. Para visualizar la calidad del ARN, se realizan geles de agarosa al 1 % en tampón TAE1X teñidos con *RedSafe* y se someten a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de longitud del gel.

Síntesis de ADN complementario

Para la obtención del ADN complementario a partir del ARN se utiliza el *kit Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen) y el sistema *Super-Script™ First strand* (Invitrogen) siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

PCR Cuantitativa

Para comparar el nivel de expresión de diversos ARN mensajeros, se realizan PCRs cuantitativas en un equipo ABI 7500FAST. Se utiliza como reactivo para la PCR el *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, 172-5124) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos para amplificar los diferentes ADNcs se encuentran en la Tabla M4.

Los valores Ct medios de cada triplicado en cada condición se normalizan con respecto a la expresión del gen de la β -actina como control endógeno. El valor relativo para el $\Delta\Delta Ct$ se calcula en base al control endógeno y las condiciones de expresión de los diferentes shRNAs respecto al shRNA control (*shScramble*).

Tabla M4. Oligonucleótidos para qPCR utilizados en esta tesis.

Nombre oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)
Rv Exo1	AGGCTGGATGCTCACTTTGT
Fw Exo1	AGTGGTG CAGTTGTGGTTCC
Fw ActB	ACGAGGCC CAGAGCAAGA
RV ActB	GACGATGCCGTGCTCGAT

C. Análisis de proteínas

a. Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Se obtienen los extractos de proteínas a partir de células cultivadas en placas de 6, 10 o 15 cm usando el tampón de lisis Laemmli 2X (4 % SDS, 20 % glicerol, 125 mM Tris-HCl pH 6,8) sobre las placas a las que previamente se les ha realizado un lavado con PBS 1X. Los extractos son recogidos mediante rascadores. Para romper la cromatina, son pasados al menos 10 veces por unas jeringas con aguja de 0,5 x 16 mm (BD Platipak).

Extracción de proteínas en condiciones nativas

Las proteínas extraídas en condiciones nativas, se utilizan en los protocolos de inmunoprecipitación de proteínas. Se prepara un tampón de lisis (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7,5 y 0,2 % Tritón) con inhibidores de proteasas (11873580001, Roche), inhibidores de fosfatasa s (P0044, Sigma). Las células son recogidas desde una placa de 15 cm de diámetro al 70-80 % de confluencia. Se realizan dos lavados de PBS frío y se retira asegurándose de eliminar el mayor volumen del lavado y evitando así la dilución del extracto. Se añaden 150 µl de tampón de lisis con los inhibidores y las células se levantan de la placa mediante rascadores. El extracto se pasa 10 veces por una jeringa con aguja de 0,5 x 16 mm (BD Platipak). Se centrifuga durante 5 minutos a 13 000 rpm a 4° C y se recogió el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop

La cuantificación de las proteínas que se extraen con buffer laemmli, se realiza con 1 µl de muestra mediante el espectrofotómetro ND-100 (Nanodrop) en función de la absorbancia a 280 nm, el cual daba el resultado de cuantificación en µg/µl directamente.

Cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford

Para cuantificar las proteínas que se extraen en condiciones nativas. Se parte de una solución de BSA (albúmina serobovina) a 1 mg/ml con la que se preparan muestras con 0, 1, 2, 5, 10 y 20 µg de BSA en 100 µl de agua destilada y se añaden 900 µl del reactivo Bradford (B6916, Sigma). De igual forma, se preparan muestras con 2 µl de los extractos a cuantificar en 98 µl de agua destilada agregando 900 µl del reactivo Bradford. La medición de la densidad óptica se lleva a cabo a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro DU 800 (*Beckman Coulter*). Con las muestras de concentración conocida de BSA se realiza una recta de regresión para obtener una curva patrón que se utiliza para calcular la concentración de proteína en µg/µl de cada extracto.

Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Para separar las proteínas por tamaño se utilizó el método de geles de SDS-poliacrilamida desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se preparan con una solución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) a diferentes porcentajes según el tamaño de las proteínas a analizar. La zona de empaquetamiento se prepara con el tampón Tris-HCl 125 mM pH 6,8; 0,1% SDS y la zona de separación en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8; 0,1% SDS. Para desencadenar la polimerización se añade persulfato de amonio (APS, por sus siglas en inglés) a una concentración final de 0,1% y 0,04% (v/v) de TEMED. Las muestras se preparan con tampón de carga 4X y en cada gel se cargaron 30-100 µg de proteína total, previamente hervidos a 100° C durante 5 minutos. Los geles se corren en un tampón 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1 % SDS, a un voltaje constante de 180 V en un sistema *Mini-Protean TetraCell* (Bio-Rad).

Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Las proteínas separadas en geles de SDS-poliacrilamida se transfieren a una membrana de PVDF de baja fluorescencia (Immobilon-FL, IPFL00010) que previamente se activa con metanol durante 1 minuto y se equilibra en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol) al menos 5 minutos. Se utiliza el sistema Mini Trans-Blot de Bio-Rad. La transferencia se realiza a 400 mA durante 1-2 horas a 4° C. En caso de llevarla a cabo durante 2 horas se recirculariza el tampón con ayuda de un agitador magnético.

Inmunodetección de proteínas (western blot)

La membrana de PVDF se incuba con una solución de bloqueo comercial (Solución de Bloqueo para Odyssey, 927-40003) durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (Tabla M5) se preparan en la solución de bloqueo con 0,1 % de Tween y se incuban a 4° C en agitación toda la noche.

Posteriormente, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1 % y la membrana se incuba con los anticuerpos secundarios (Tabla M6) diluidos en solución de bloqueo durante 40 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1 %. Al finalizar la membrana se enjuaga con TBS 1X y se pone a secar a temperatura ambiente.

Finalmente, las membranas se escanean en un equipo ODYSSEY CLx (Li-Cor) a dos longitudes de onda del infrarrojo (700 y 800 nm). El procesamiento y la cuantificación de imágenes se realiza con el software Image Studio v.2.1, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunoprecipitación (IP) de proteínas con GFP TRAP

Las células estables HEK293 con GFP-CtIP, GFP-CtIP-S327A, GFP-CtIP-S327D y GFP se siembran en una placa de 10 cm al 40-50 % de confluencia. Al día siguiente, se co-transfectan con los plásmidos HALO-BARD1, SFB-BRCA1 y shCtIP, con el método de fosfato de calcio descrito anteriormente (apartado I.II.III.b). Al día siguiente se cambia el medio de cultivo y a las 48 horas de la transfección, se retira el medio de cultivo y se lava con PBS 1X frío. Las células son levantadas con ayuda de un rascador en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 % de Triton X-100; suplementado con inhibidores de proteasas (Roche), y coctel de inhibidores de fosfatasas (Sigma). El extracto de proteínas se cuantifica con el método de Bradford (descrito en el apartado I.II.I.V). 1 mg de cada extracto se incuba con 20 µl de perlas magnéticas anti GFP_M (Chromotek) a 4° C con agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente, con la ayuda de una gradilla magnética, se realizan 3 lavados con buffer de lisis y finalmente las proteínas son eluidas de las perlas magnéticas en lisis buffer hirviéndolas durante 5 min. Los eluidos son resueltos en geles de SDS-PAGE y analizados por western blot.

Tabla M5: Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.

Proteína	Aplicación	Fuente	Referencia	Dilución
BRCA1	IP	Santa Cruz	sc-642	5 µl
BRCA1	IP, WB	Santa Cruz	sc-6954	5 µl, 1:500
HSP70	WB	Santa Cruz	sc-24	1:10.000
α-Tubulina	WB	Sigma	T9026	1:25.000
RPA32	WB, IF, CHIP	Abcam	ab2175	1:500
RPA32	IF	Santa Cruz	Sc-28709	1:200
RIF1	IF	Bethyl Laboratories	A300-568A	1:100
Non related Rabbit IgG	IP	Sigma	I8140	1 µg
Non related Mouse IgG	IP	Sigma	I8765	1 µg
CtIP	WB	No	R. Baer	1:5000
γH2Ax	WB, IF, CHIP	Cell Signaling	2577L	1:1000, 1:500, 2µg
γH2Ax	WB, IF	Millipore	05-636	1:1000, 1:500
Mre11	WB	Novus Biologicals	NB100-142	1:5000
BrdU	SMART	Amersham	RPN 202	1:1000
CHK1	WB	Santa Cruz	Sc-8408	1:1000
p-CHK1 Ser345	WB	Cell Signalling	2348	1:1000
CHK2	WB	Abcam	Ab47433	1:1000
p-CHK2 Thr68	WB	Abcam	Ab38461	1:1000

IF, inmunofluorescencia. WB Western blotting. IP, Inmunoprecipitación

Tabla M6: Anticuerpos Secundarios usados en esta tesis.

Anticuerpo	Fuente	Aplicación	Dilución
Alexa Fluor 594 cabra anti-ratón	Invitrogen	IF	1:1000
Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo	Invitrogen	IF	1:1000
Alexa Fluor 647 cabra anti-ratón IgG	Invitrogen	IF	1:1000
Alexa Fluor 568 cabra anti-conejo	Invitrogen	IF	1:1000
IR-Dye 680 RD cabra anti-ratón IgG (H+L)	Li-Cor	WB	1:5000-1:20.000
IR-Dye 800CW cabra anti-conejo IgG (H+L)	Li-Cor	WB	1:5000
IR-Dye 800CW burro anti-cabra IgG (H+L)	Li-Cor	WB	1:5000-1:20.000

IF, inmunofluorescencia. WB Western blotting. IP, Inmunoprecipitación

D. Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART)

Se siembran 1×10^6 células U2OS en placas de 10 cm, al día siguiente se cambia el medio de cultivo por uno conteniendo $32 \mu\text{M}$ de Bromo-deoxi-uridina (BrdU) (GE Healthcare) y se incuban durante 24 horas a 37°C , así asegurando que al menos una de las cadenas de ADN estará marcada con BrdU. Para aquellas muestras destinadas a tratamiento con radiación ionizante, se da una única dosis de 10 Gy y se colocan a 37°C después de la radiación. Para tratar con etopósido, se cambia el medio a las placas por uno conteniendo $10 \mu\text{M}$ de ETOP, se incuban a 37°C . Dependiendo de las condiciones que cada experimento requiera, las muestras se dejan en incubación durante 15 min, 30 min, 60 min después del tratamiento con radiación o etopósido.

El ADN genómico se extrae embebido en agarosa de bajo punto de fusión (LMP por sus siglas en inglés (Biorad)). Para este fin, las células se lavan con PBS frío y la cantidad de células se determina con un contador de células (Beckman Coulter, Z series 9914591-D). Las células se centrifugan a 400 g durante 3 min, se retira el sobrenadante y se resuspenden en PBS 1X a una concentración final de 4×10^5 células en $50 \mu\text{l}$ de PBS 1X. Se coloca la suspensión a 42°C y se mezcla cuidadosamente con un volumen igual de agarosa LMP fundida y atemperada a 42°C . La suspensión celular se transfiere a un molde para la formación de un bloque de agarosa, en adelante “plug”. Una vez formado el plug, éste es

transferido a un tubo de fondo redondo de 12 ml. Se añaden 500 μ l de buffer TE50 (Sigma) conteniendo 1% de L-lauril-sarcosil (Sigma) y 0,2 mg/ml de proteinasa K (Sigma). Se incuba a 50° C durante toda la noche. Después se cambia el buffer TE50 por buffer TE50 fresco con la misma cantidad de sarcosil y proteinasa K, y se incuba seis horas más a 50° C. De aquí en adelante se toman precauciones de manipulación ya que los plug de ADN son translúcidos y extremadamente frágiles. Al terminar la incubación se realizan 4 lavados de 10 minutos con 10 ml de TE50 y se procede a la tinción del plug con YOYO-1. Para la tinción, se preparan 100 μ l de buffer TE con 15 μ M de YOYO-1 (Molecular Probes) para cada plug. Se incuban en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizan 4 lavados de 5 minutos con 10ml de TE. Al finalizar los lavados se agregan por cada plug 3 ml de buffer MES (Sigma) previamente calentado a 67° C. Las muestras se incuban a 65° C durante aproximadamente 25 min hasta que la agarosa del plug queda totalmente fundida, se retiran del termobloque y se deja que alcancen la temperatura ambiente gradualmente. A continuación, se agregan a cada plug 3 UI de β -Agarasa (NEB) y se incuba toda la noche a 45° C. Pasado el tiempo de incubación se dejan las muestras a temperatura ambiente hasta su colocación en el dispositivo de DNA combing (GenomicVision) para estirar las fibras de ADN. Para ello, las muestras son colocadas en reservorios de teflón y los cubreobjetos silanizados (GenomicVision) son sumergidos en la solución de ADN, los cubreobjetos se retiran de la solución a una velocidad constante de 300 μ m/s.

Se corrobora por medio del microscopio de epifluorescencia que las fibras están bien estiradas utilizando la tinción con YOYO-1. A continuación, se procede a la inmunodetección del BrdU. Para esto, se colocan los cubreobjetos en un horno a 60° C durante 2 horas, permitiendo la fijación de las fibras de ADN en el cubreobjetos, después se fijan bocarriba a un portaobjeto y se bloquea con una solución de BSA al 1 % en PBS 1X durante 15 min a temperatura ambiente. Se les coloca el anticuerpo primario (Anti-BrdU) a una dilución 1:500 en PBS1X/Triton 0,1 % (PBS/T) y se incuban a temperatura ambiente durante 45 min en oscuridad. Se realizan 4 lavados de 2 minutos con PBS/T y se incuban con el anticuerpo secundario (Anti-Mouse Alexa Flour 594) en una dilución 1:1000 en PBS/T, se incuban en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizan 4 lavados de 2 minutos con PBS/T. Se secan las muestras y se montan con 18 μ l de *Prolong gold antifade reagent* (Molecular Probes). Las muestras se almacenan a -20° C hasta el momento de su visualización.

E. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en línea U2OS AsiSI-ER (DIVA)

a. Cultivo y extracción de la cromatina

Para inmunoprecipitar la cromatina se siguió el protocolo descrito por el grupo de Gaëlle Legube, (Jason S, 2010). Para esto se siembran 5×10^6 células DIVA en 20 ml de medio DMEM en placas de 15 cm; al día siguiente, se tratan los cultivos con 300 nM de Z-4-Hidroxi-tamoxifeno (4-OH) durante 4 horas. Dependiendo de las necesidades experimentales algunos cultivos se tratan con el inhibidor catalítico de la topoisomerasa 2, Dextrazona (1 μ M) y DMSO como control.

Pasadas las 4 horas los cultivos se fijan con formaldehído al 1 % por 15 min a temperatura ambiente y agitación constante permitiendo una distribución homogénea del formaldehído para generar enlaces covalentes entre el ADN y las proteínas, proceso denominado “*crosslink*”. El *crosslink* se detiene añadiendo 0,125 M de glicina, incubando por 5 min a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizan a continuación dos lavados con PBS 1 X y se agrega 750 μ l de PBS 1 X frío para recolectar las células mediante un rascador. Las células se colectan en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugan a 2.000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se prosigue con el protocolo, o en su defecto los pellets de las células se almacenan a -80 °C hasta su uso.

En caso de continuar con el protocolo, se añade buffer de lisis a celular (200 μ L Pipes 0,5M pH; 850 μ L KCl 2M; 1 mL NP-40 10 %; H₂O qsp 20mL + 2 tabletas de inhibidor de proteasas «complete mini EDTA free» Roche) a las muestras en los tubos Falcon, se añade 200 μ l de buffer de lisis por cada millón de células, es decir, por cada placa con 5 millones se usa 1 ml de buffer de lisis celular. Se resuspende el pellet en el buffer de lisis y se incuba 10 min en hielo. Transcurrido el tiempo se centrifugan las muestras a 4.000 rpm a 4° C, se descarta el sobrenadante. Para la lisis nuclear se utiliza la mitad del volumen usado en el buffer de lisis celular, es decir, para cada placa con 5 millones de células se usa 500 μ l de buffer de lisis nuclear (1 mL Tris 1M pH 8,1; 400 μ L EDTA 0,5M pH8; 2 mL SDS 10 %; H₂O qsp 2 tabletas de inhibidor de proteasas «complete mini EDTA free» Roche). Se resuspende el pellet en el buffer de lisis nuclear pasando todo el volumen a un nuevo tubo falcon de 15 ml, incubando en hielo durante 10 min. Inmediatamente se sónica la cromatina para adquirir fragmentos, entre 400-500 pb. En un baño de hielo y agua, se dan 7 ciclos a 10 % de amplitud, durante 15 min con intervalos de 30 segundos de sonicación y 30 segundos sin sonicar, con el fin de evitar el sobre calentamiento de las muestras. Las muestras deben de acabar traslucidas y sin espuma, indicativos de que la sonicación ha funcionado apropiadamente.

Se cuantifica el ADN de cada muestra en el *Nanodrop*, usando como blanco el buffer de lisis nuclear. A continuación, se diluyen las muestras 10 veces con buffer de dilución (50 µL SDS 10 %; 5,5 mL Triton X100 10 %; 120 µL EDTA 0,5 M pH 8; 835 µL Tris 1 M pH 8,1; 1670 µL NaCl 5 M; H₂O qsp 50mL + 1 tableta de inhibidor de proteasas «complete EDTA free» Roche) y se procede con la inmunoprecipitación.

b. Inmunoprecipitación

Para preparar la matriz para la inmunoprecipitación, la resina se lava dos veces con buffer para IP (1 V de buffer de lisis nuclear/ 9 V de buffer de dilución), se incuba en agitación durante 4 horas a 4° C en buffer de IP con 50 µl de BSA a 20 mg/ml. Pasadas las 4 horas se lavan 2 veces con buffer de IP y se resuspenden en buffer IP en el volumen original del que se partió.

Importante: Se guardan 100 µl de cada muestra y se etiquetan como “Input” los cuales se almacenan a -20° C hasta su uso. Por cada inmunoprecipitación que se realiza se utilizan 200 µg de cromatina. Entonces, se separan en diferentes tubos falcon de 15 ml por cada anticuerpo que se usará, por ejemplo y en cada caso experimental, IgG, γH2Ax, RPA, TOP2A y TOP2B. Por cada muestra se usan 2 µg de anticuerpo correspondiente, y se incuban toda la noche a 4 °C en agitación.

Anterior al comienzo de la inmunoprecipitación, se someten las muestras a una selección negativa, denominada “pre-clearing” con la finalidad de eliminar aquellas proteínas o elementos que se unen preferentemente a la resina con la que se lleva a cabo la inmunoprecipitación. Para esto, se usan 100 µl de resina magnética con la inmunoglobulina G unida a ella por cada muestra, preparada como se ha descrito, pero sin anticuerpo. Así, a cada muestra en tubo falcon de 15 ml se le agregan 100 µl de resina previamente preparada y se deja incubando en agitación durante 1-2 horas a 4 ° C. Seguido, se centrifugan las muestras a 4000 rpm a 4° C y se recupera el sobrenadante. Después, a cada sobrenadante se añaden 100 µl de resina magnética previamente preparada, incubando en agitación a 4° C durante 2 horas. Al finalizar, se centrifugan las muestras 1 min a 200 rpm y 4° C. Se descarta el sobrenadante y se lava la resina con 1 ml de buffer de diálisis (80 µL EDTA 0,5 M; 999 µL Tris 1 M pH 8,1; 200 µL Sarkosyl 20 %; H₂O qsp 20 mL2 tabletas de inhibidor de proteasas «complete mini EDTA free» Roche). Para facilitar el manejo de las muestras, estas se transfieren de tubos falcón de 15 ml a microtubos de 1,5 ml. Con ayuda de una gradilla magnética se retira el sobrenadante y se realizan 5 lavados con buffer de lavado (1,66 mL Tris 3 M pH 8,8; 5 mL LiCl 5 M; 5 mL NP-40 10 %; 5 mL NaDoc 10 %; H₂O qsp 50 mL + 1 tableta de inhibidor de proteasas «complete EDTA free» Roche) durante 5-10 min a 4 °C y en agitación. Realizar 2 lavados

con TE 1X, siguiendo el mismo procedimiento anterior. Resuspender la resina en 200 μ l de TE 1X. Se descongelan los inputs a los que se les añade 100 μ l de TE 1X. A todas las muestras (IPs e inputs) se les añade 1 μ l de RNAsa A (10 mg/ml) y se incuba a 37° C durante media hora. Se añade 4 μ l de SDS 10 % y se incuba a 70° C en termobloque en agitación (1.200-1.400 rpm) durante toda la noche, esto con la finalidad de revertir el crosslink.

Al día siguiente, para eliminar toda proteína de las muestras se añaden 4 μ l de proteinasa K (10 μ g/ml) y se incuba durante hora y media a 45° C. Finalizado el tiempo se procede con una purificación fenol-cloroformo. Se añade 200 μ l de fenol, se agita con ayuda de un Vortex, se centrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos. Se recupera el sobrenadante y se coloca en un nuevo microtubo. Al tubo de la primera extracción con fenol se le agregan 200 μ l de TE1X para realizar otra extracción, asegurándonos así de recuperar todo el material posible. De igual manera que lo anterior, se mezcla y se centrifuga a máxima velocidad, durante 5 min. Se recupera el sobrenadante y se junta con la primera extracción, se añaden 400 μ l de cloroformo, se agita con ayuda de un Vortex, se centrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos y se recupera la fase superior. Se repite otra vez el paso anterior. El ADN se precipita con 2,5V de etanol, 0,1V de acetato de sodio 3M y 1 μ L de glicógeno. Se incuban a -20° C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifuga a velocidad máxima durante 30 min y se hace un lavado con 500 μ l de etanol al 70 %, se centrifuga a máxima velocidad durante 15 min y se dejan secar los pellets. Finalmente, las muestras se resuspenden en 100 μ l de agua libre de nucleasas.

Se procede con la PCR cuantitativa. Antes de agregar las muestras de ADN, se calientan a 65° C durante 5 min. Se realiza la siguiente mezcla:

Primer Fwd	0,5 μ l
Primer Rev	0,5 μ l
ADN	2.0 μ l
Sybr Green [®]	5.0 μ l
Agua	2.0 μ l
TOTAL	10 μ l

Tabla M7: Oligonucleotidos usados en CHIP en esta tesis.

Numero	Oligonucleotido	Sentido	Secuencia
1	DSB-3_800bp	Fwd	GGCACCTCAACAGGTAGCAT
		Rev	GCCTCTCTTCGATGCTTTTG
2	DSB-3_80bp	Fwd	GGAAGGAGGGGCTACTAGGG
		Rev	GAAAGCCCCATTCAGTTTGA
3	DSB-3_gene	Fwd	CAAAGATGACCACAGCCTCA
		Rev	CACACCCCAAGAAAAGAGGA
4	DSB-5_800bp	Fwd	GGGGAAATTGGGCATTAGTT
		Rev	TTCGCCTCTTGGTTCTCTGT
5	DSB-5_80bp	Fwd	GGTGCCACAGCTCTCTATG
		Rev	GAAGCCAGAGGAGTGCCTG
6	DSB-III_800bp	Fwd	GGGACAGCGCTACTTTG
		Rev	TCGCTAGGCCAGCAGTT
7	DSB-III_200bp	Fwd	GGGGCTTTTGGGAAAATTAC
		Rev	AGCGACTCTTGCCTCTG
8	DSB-III_80bp	Fwd	CCGTCCGTTACGTAGAATGC
		Rev	GGGCGGGGATTATGTAATTT
9	DSB-III_gene	Fwd	CAGGCCGTTGAACAGGTTAT
		Rev	TCAGCTGCAAAAACAGTTGC
10	DSB-IV_800bp	Fwd	GAGGAACCATTTCGACAAGA
		Rev	CTGACCAAGGAAGCCTCAAG
11	DSB-IV_80bp	Fwd	GAGGAGCGCAGGACACTG
		Rev	CCAATTAGAGACCACCCGTTT
12	DSB-V_800bp	Fwd	GTCAGTATGGCCCCAGAGTC
		Rev	ACGGCTGATGGACTTAGACG
13	DSB-V_80bp	Fwd	CCTAGCTGAGGTCGGTGCTA
		Rev	GAAGAGTGAGGAGGGGGAGT
14	DSB-V_gene	Fwd	AAGCCACAGCCCACTAAAGA
		Rev	GGCTGTCTCAAGCAAACCTC

Microscopía

a. Inmunofluorescencia de RPA y γ H2AX

Para la detección de γ H2AX y RPA por inmunofluorescencia, se utilizan células U2OS o MEF dependiendo de cada condición experimental. En el caso de las células U2OS estas se infectan con virus de los respectivos shRNA. Después de la infección se añade antibiótico para la selección de aquellas células infectadas y 48 horas después del inicio de la

selección se siembran las células sobre cubreobjetos redondos en placas de 24-pocillos, a una concentración de 3×10^4 células por pocillo. O bien se transfectan con los siRNA respectivos, y de igual manera que lo anterior 48 horas post transfección se siembran en placas de 24 pocillos. En el caso de las MEF, se siembran 3×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos.

Según las necesidades experimentales, las células reciben tratamientos o no con diferentes agentes, a distintas concentraciones. De forma breve se usan 1 μM de camptotecina (CPT), 10 μM de etoposido (VP-16), 1 μM de dexrazoxano (DEX), 5 μM merbarona (MER), DMSO, 10 Gy de radiación ionizante (IR) y sin daño. En específico, cuando se utilizaron DEX Y MER, las células son pre tratadas con estos agentes por 30 min y posteriormente reciben o no una dosis de 10 Gy de IR. En todos los casos las células son cosechadas 1 hora después del tratamiento con (IR, CPT, ETOP), y se realiza 1 lavado con PBS frío. Se lleva a cabo una pre-extracción de 5 minutos en hielo en el tampón 25 mM Tris-Hcl pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 3 mM MgCl_2 ; 300 mM de sacarosa y 0.5 % de Tritón X-100. Posteriormente, las células son fijadas con 4 % de paraformaldehído en PBS durante 15 min y se bloquean con 5 % de FBS en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tabla M8: Agentes y drogas utilizados en esta tesis.

Droga	Diana	Concentración	Referencia	Marc a
Camptotecina	Topoisomerasa I	0,1 y 1 μM	C9911	Sigma
Dexrazoxano	Topoisomerasa II	1 y 5 μM	D1446	Sigma
DMSO				Sigma
Etopósido	Topoisomerasa II	5 y 10 μM	E1383	Sigma
Merbarona	Topoisomerara II	1 y 5 μM	M2070	Sigma
G418	Inhibidor de la elongación peptídica		A1720	Sigma
Z-4-Hidroxi-tamoxifeno	Receptor de estrógenos	300nM	H7904	Sigma

La inmunodetección se realiza con anticuerpos diluidos en 5 % de FBS en PBS. La incubación con el anticuerpo primario se lleva a cabo a 4 °C durante toda la noche. A continuación, se realizan tres lavados con PBS frío y se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido en PBS con 5 % de FBS durante una hora a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Tras lavar de nuevo con PBS tres veces se montan los cubreobjetos en portaobjetos usando *VectaShield* (Vector Laboratories) como medio de montaje.

Para visualizar las señales de fluorescencia de γ H2AX y RPA se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DM6000, con un objetivo HCX PL APO 40x/1.4 seco. Las imágenes se obtuvieron y procesaron con el software LASAF.

b. Inmunofluorescencia para 53BP1 y γ H2AX

Se utilizan células U2OS, de siembran de acuerdo como se describe en el apartado anterior, y se trataron o no con los agentes mencionados. En este caso después del lavado con PBS, se fijan las células con metanol durante 10 min a 4° C, seguido de un lavado con acetona de 30 segundos a 4° C, se vuelve a lavar con PBS frío y se bloquean con PBS con 5 % de FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Y se prosiguió con la inmunodetección como se describe en el apartado anterior.

c. Inmunofluorescencia para RIF1

Las células U2OS, de siembran de acuerdo como se describe en el apartado I.II.XI, y se tratan o no con los agentes mencionados. En este caso después de los lavados se fijan las células con paraformadehído al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de un proceso de permeabilización con 0,025 % de Triton X-100 durante 10 min a temperatura ambiente. Después se realizan lavados con PBS frío y se bloquean con PBS con 5 % de FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Y se continúa con la inmunodetección como se describe en el apartado anterior.

d. Microscopía para SMART

Para visualizar las señales de fluorescencia de BrdU en las fibras de ADN se utiliza un microscopio de fluorescencia Nikon NI-E, con un objetivo PLAN FLOUR40x/0.75 PHL DLL. Las imágenes se obtienen y procesan con el software NIS ELEMENTS de Nikon. Para la generación de los mosaicos se realizan fotos a 400 campos (20 x 20) de las laminillas de cada uno de los tratamientos, fusionándolas con un 10 % de superposición para cada imagen.

Para medir la longitud de las fibras se utilizó la herramienta regla del menú de análisis de *Adobe Photoshop CS4 Extended versión 11.0* (Adobe Systems Incorporated).

Análisis Estadístico

La significancia estadística fue determinada usando el programa PRISM (Graphpad Software Inc.) Usando la prueba de t de Student (t-test). La significancia estadística se graficó con uno, dos o tres asteriscos (*, **, ***) cuando el valor de p es menor a 0,05; 0,01 y 0,001 respectivamente. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para determinar las diferencias entre las poblaciones en el ensayo de SMART.

REFERENCIAS

- Aguilera, A. and B. Gomez-Gonzalez (2008). "Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences." *Nat Rev Genet* **9**(3): 204-217.
- Alderton, G. K., H. Joenje, et al. (2004). "Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway." *Hum Mol Genet* **13**(24): 3127-3138.
- Andres, S. N., A. Vergnes, et al. (2012). "A human XRCC4-XLF complex bridges DNA." *Nucleic Acids Res* **40**(4): 1868-1878.
- Antoniou, A., P. D. Pharoah, et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." *Am J Hum Genet* **72**(5): 1117-1130.
- Aparicio, T., R. Baer, et al. (2014). "DNA double-strand break repair pathway choice and cancer." *DNA Repair (Amst)* **19**: 169-175.
- Aparicio, T., R. Baer, et al. (2016). "MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts." *J Cell Biol* **212**(4): 399-408.
- Aymard, F., B. Bugler, et al. (2014). "Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks." *Nat Struct Mol Biol* **21**(4): 366-374.
- Azuma, Y., A. Arnaoutov, et al. (2003). "SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis." *J Cell Biol* **163**(3): 477-487.
- Baer, R. and T. Ludwig (2002). "The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity." *Curr Opin Genet Dev* **12**(1): 86-91.
- Barton, O., S. C. Naumann, et al. (2014). "Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1." *J Cell Biol* **206**(7): 877-894.
- Bennardo, N., A. Cheng, et al. (2008). "Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair." *PLoS Genet* **4**(6): e1000110.
- Bensimon, A., A. Simon, et al. (1994). "Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface." *Science* **265**(5181): 2096-2098.
- Blier, P. R., A. J. Griffith, et al. (1993). "Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks." *J Biol Chem* **268**(10): 7594-7601.
- Buis, J., T. Stoneham, et al. (2012). "Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2." *Nat Struct Mol Biol* **19**(2): 246-252.
- Bunting, S. F., E. Callen, et al. (2010). "53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks." *Cell* **141**(2): 243-254.
- Burden, D. A. and N. Osheroff (1998). "Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme." *Biochim Biophys Acta* **1400**(1-3): 139-154.
- Bush, N. G., K. Evans-Roberts, et al. (2015). "DNA Topoisomerases." *EcoSal Plus* **6**(2).
- Caestecker, K. W. and G. R. Van de Walle (2013). "The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present." *Exp Cell Res* **319**(5): 575-587.
- Cantor, S. B., D. W. Bell, et al. (2001). "BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function." *Cell* **105**(1): 149-160.
- Cao, L., X. Xu, et al. (2009). "A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency." *Mol Cell* **35**(4): 534-541.

Referencias

- Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.
- Cimprich, K. A. and D. Cortez (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 616-627.
- Clarke, D. J. (2009). DNA Topoisomerases: Methods and Protocols, Humana Press.
- Clerici, M., D. Mantiero, et al. (2006). "The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling." EMBO Rep **7**(2): 212-218.
- Champoux, J. J. (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism." Annu Rev Biochem **70**: 369-413.
- Chang, C. C., Y. R. Wang, et al. (2013). "New insights into DNA-binding by type IIA topoisomerases." Curr Opin Struct Biol **23**(1): 125-133.
- Chapman, J. R., P. Barral, et al. (2013). "RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection." Mol Cell **49**(5): 858-871.
- Chapman, J. R., M. R. Taylor, et al. (2012). "Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice." Mol Cell **47**(4): 497-510.
- Chen, L., C. J. Nievera, et al. (2008). "Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair." J Biol Chem **283**(12): 7713-7720.
- Chen, P. L., F. Liu, et al. (2005). "Inactivation of CtIP leads to early embryonic lethality mediated by G1 restraint and to tumorigenesis by haploid insufficiency." Mol Cell Biol **25**(9): 3535-3542.
- Chen, S. and G. Parmigiani (2007). "Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance." J Clin Oncol **25**(11): 1329-1333.
- Chen, S. H., N. L. Chan, et al. (2013). "New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases." Annu Rev Biochem **82**: 139-170.
- Chen, T., Y. Sun, et al. (2015). "Topoisomerase IIalpha in chromosome instability and personalized cancer therapy." Oncogene **34**(31): 4019-4031.
- Chi, Q., G. Wang, et al. (2013). "The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory." Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **392**(5): 1072-1079.
- Chinnadurai, G. (2006). "CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries." Biochim Biophys Acta **1765**(1): 67-73.
- Chiruvella, K. K., Z. Liang, et al. (2013). "Repair of double-strand breaks by end joining." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(5): a012757.
- Davies, O. R., J. V. Forment, et al. (2015). "CtIP tetramer assembly is required for DNA-end resection and repair." Nat Struct Mol Biol **22**(2): 150-157.
- Deweese, J. E. and N. Osheroff (2009). "The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing." Nucleic Acids Res **37**(3): 738-748.
- Di Virgilio, M., E. Callen, et al. (2013). "Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching." Science **339**(6120): 711-715.
- Dohrn, L., D. Salles, et al. (2012). "BRCA1-mediated repression of mutagenic end-joining of DNA double-strand breaks requires complex formation with BACH1." Biochem J **441**(3): 919-926.
- Dou, H., C. Huang, et al. (2010). "Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex." Mol Cell **39**(3): 333-345.
- Downs, J. A. and S. P. Jackson (2004). "A means to a DNA end: the many roles of Ku." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 367-378.
- Drost, R., P. Bouwman, et al. (2011). "BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance." Cancer Cell **20**(6): 797-809.

- Duxin, J. P., H. R. Moore, et al. (2012). "Okazaki fragment processing-independent role for human Dna2 enzyme during DNA replication." *J Biol Chem* **287**(26): 21980-21991.
- Eid, W., M. Steger, et al. (2010). "DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability." *EMBO Rep* **11**(12): 962-968.
- Escribano-Diaz, C., A. Orthwein, et al. (2013). "A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice." *Mol Cell* **49**(5): 872-883.
- Feldmann, E., V. Schmiemann, et al. (2000). "DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining." *Nucleic Acids Res* **28**(13): 2585-2596.
- Feng, L., K. W. Fong, et al. (2013). "RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair." *J Biol Chem* **288**(16): 11135-11143.
- Ferretti, L. P., L. Lafranchi, et al. (2013). "Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs." *Front Genet* **4**: 99.
- Fishman-Lobell, J., N. Rudin, et al. (1992). "Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated." *Mol Cell Biol* **12**(3): 1292-1303.
- Forment, J. V., R. V. Walker, et al. (2012). "A high-throughput, flow cytometry-based method to quantify DNA-end resection in mammalian cells." *Cytometry A* **81**(10): 922-928.
- Frit, P., N. Barboule, et al. (2014). "Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks." *DNA Repair (Amst)* **17**: 81-97.
- Froelich-Ammon, S. J. and N. Osheroff (1995). "Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism." *J Biol Chem* **270**(37): 21429-21432.
- Fu, Q., J. Chow, et al. (2014). "Phosphorylation-regulated transitions in an oligomeric state control the activity of the Sae2 DNA repair enzyme." *Mol Cell Biol* **34**(5): 778-793.
- Furuta, S., J. M. Wang, et al. (2006). "Removal of BRCA1/CtIP/ZBRK1 repressor complex on ANG1 promoter leads to accelerated mammary tumor growth contributed by prominent vasculature." *Cancer Cell* **10**(1): 13-24.
- Fusco, C., A. Reymond, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein." *Genomics* **51**(3): 351-358.
- Ganapathi, R. N. and M. K. Ganapathi (2013). "Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II." *Front Pharmacol* **4**: 89.
- Germe, T. and O. Hyrien (2005). "Topoisomerase II-DNA complexes trapped by ICRF-193 perturb chromatin structure." *EMBO Rep* **6**(8): 729-735.
- Goodarzi, A. A., Y. Yu, et al. (2006). "DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity." *EMBO J* **25**(16): 3880-3889.
- Gospodinov, A., T. Vaissiere, et al. (2011). "Mammalian Ino80 mediates double-strand break repair through its role in DNA end strand resection." *Mol Cell Biol* **31**(23): 4735-4745.
- Gravel, S., J. R. Chapman, et al. (2008). "DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection." *Genes Dev* **22**(20): 2767-2772.
- Grawunder, U., M. Wilm, et al. (1997). "Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells." *Nature* **388**(6641): 492-495.
- Griffith, E., S. Walker, et al. (2008). "Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling." *Nat Genet* **40**(2): 232-236.
- Gu, B. and P. L. Chen (2009). "Expression of PCNA-binding domain of CtIP, a motif required for CtIP localization at DNA replication foci, causes DNA damage and activation of DNA damage checkpoint." *Cell Cycle* **8**(9): 1409-1420.

Referencias

- Haggarty, S. J., K. M. Koeller, et al. (2003). "Small molecule modulation of the human chromatid decatenation checkpoint." *Chem Biol* **10**(12): 1267-1279.
- Harkins, T. T., T. J. Lewis, et al. (1998). "Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP." *Biochemistry* **37**(20): 7299-7312.
- Hartlerode, A. J. and R. Scully (2009). "Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells." *Biochem J* **423**(2): 157-168.
- Hartsuiker, E., M. J. Neale, et al. (2009). "Distinct requirements for the Rad32(Mre11) nuclease and Ctp1(CtIP) in the removal of covalently bound topoisomerase I and II from DNA." *Mol Cell* **33**(1): 117-123.
- Helmink, B. A., A. T. Tubbs, et al. (2011). "H2AX prevents CtIP-mediated DNA end resection and aberrant repair in G1-phase lymphocytes." *Nature* **469**(7329): 245-249.
- Her, J., N. Soo Lee, et al. (2016). "Factors forming the BRCA1-A complex orchestrate BRCA1 recruitment to the sites of DNA damage." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**(7): 658-664.
- Herrick, J. and A. Bensimon (1999). "Single molecule analysis of DNA replication." *Biochimie* **81**(8-9): 859-871.
- Heyer, W. D., K. T. Ehmsen, et al. (2010). "Regulation of homologous recombination in eukaryotes." *Annu Rev Genet* **44**: 113-139.
- Higgins, N. P. and A. V. Vologodskii (2015). "Topological Behavior of Plasmid DNA." *Microbiol Spectr* **3**(2).
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-374.
- Huen, M. S., S. M. Sy, et al. (2010). "BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 138-148.
- Huertas, P. "DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break." *Nat Struct Mol Biol* **17**(1): 11-16.
- Huertas, P. (2010). "DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break." *Nat Struct Mol Biol* **17**(1): 11-16.
- Huertas, P., F. Cortes-Ledesma, et al. (2008). "CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination." *Nature* **455**(7213): 689-692.
- Huertas, P. and S. P. Jackson (2009). "Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair." *J Biol Chem* **284**(14): 9558-9565.
- Iacovoni, J. S., P. Caron, et al. (2010). "High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome." *EMBO J* **29**(8): 1446-1457.
- Jackson, S. P. (2002). "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." *Carcinogenesis* **23**(5): 687-696.
- Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." *Nature* **461**(7267): 1071-1078.
- Jazayeri, A., J. Falck, et al. (2006). "ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks." *Nat Cell Biol* **8**(1): 37-45.
- Jeggo, P. A. and M. Lobrich (2005). "Artemis links ATM to double strand break rejoining." *Cell Cycle* **4**(3): 359-362.
- Jensen, L. H., M. Dejligbjerg, et al. (2004). "Characterisation of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells." *BMC Pharmacol* **4**: 31.
- Jia, X., T. Weinert, et al. (2004). "Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants." *Genetics* **166**(2): 753-764.

- Jimeno, S., M. J. Fernandez-Avila, et al. (2015). "Neddylation inhibits CtIP-mediated resection and regulates DNA double strand break repair pathway choice." Nucleic Acids Res **43**(2): 987-999.
- Johnson, R. D. and M. Jasin (2000). "Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells." EMBO J **19**(13): 3398-3407.
- Ju, B. G., V. V. Lunyak, et al. (2006). "A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription." Science **312**(5781): 1798-1802.
- Kaidi, A., B. T. Weinert, et al. (2010). "Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation." Science **329**(5997): 1348-1353.
- Kaufmann, S. H. (1998). "Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers." Biochim Biophys Acta **1400**(1-3): 195-211.
- Kennedy, R. D. and A. D. D'Andrea (2005). "The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd." Genes Dev **19**(24): 2925-2940.
- Kikuchi, K., Y. Taniguchi, et al. (2005). "Fen-1 facilitates homologous recombination by removing divergent sequences at DNA break ends." Mol Cell Biol **25**(16): 6948-6955.
- Kim, H. S., H. Li, et al. (2006). "DNA damage-induced BARD1 phosphorylation is critical for the inhibition of messenger RNA processing by BRCA1/BARD1 complex." Cancer Res **66**(9): 4561-4565.
- Kim, J. E., S. A. McAvoy, et al. (2005). "Human TopBP1 ensures genome integrity during normal S phase." Mol Cell Biol **25**(24): 10907-10915.
- Kim, J. H., E. J. Cho, et al. (2005). "CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain." Nat Struct Mol Biol **12**(5): 423-428.
- Koipally, J. and K. Georgopoulos (2000). "Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity." J Biol Chem **275**(26): 19594-19602.
- Koipally, J. and K. Georgopoulos (2002). "Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression." J Biol Chem **277**(26): 23143-23149.
- Krejci, L., V. Altmanova, et al. (2012). "Homologous recombination and its regulation." Nucleic Acids Res **40**(13): 5795-5818.
- Kurosawa, A., H. Koyama, et al. (2008). "The requirement of Artemis in double-strand break repair depends on the type of DNA damage." DNA Cell Biol **27**(1): 55-61.
- Lafranchi, L., H. R. de Boer, et al. (2014). "APC/C(Cdh1) controls CtIP stability during the cell cycle and in response to DNA damage." EMBO J **33**(23): 2860-2879.
- Larsen, A. K., A. E. Escargueil, et al. (2003). "From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II." Prog Cell Cycle Res **5**: 295-300.
- Lavin, M. F. and S. Kozlov (2007). "ATM activation and DNA damage response." Cell Cycle **6**(8): 931-942.
- Lee, D. H., Y. Pan, et al. (2010). "A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination." Nat Struct Mol Biol **17**(3): 365-372.
- Li, H., Y. Wang, et al. (2008). "Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase II α in cell cycle progression." J Biol Chem **283**(10): 6209-6221.
- Li, S., N. S. Ting, et al. (2000). "Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response." Nature **406**(6792): 210-215.
- Li, X. and W. D. Heyer (2008). "Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance." Cell Res **18**(1): 99-113.
- Lieber, M. R. (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." J Biol Chem **283**(1): 1-5.

Referencias

- Limbo, O., C. Chahwan, et al. (2007). "Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination." Mol Cell **28**(1): 134-146.
- Lin, S. Y., K. Li, et al. (2004). "Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6484-6489.
- Liu, F. and W. H. Lee (2006). "CtIP activates its own and cyclin D1 promoters via the E2F/RB pathway during G1/S progression." Mol Cell Biol **26**(8): 3124-3134.
- Liu, L. F. and J. C. Wang (1987). "Supercoiling of the DNA template during transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7024-7027.
- Liu, T. and J. Huang (2016). "DNA End Resection: Facts and Mechanisms." Genomics Proteomics Bioinformatics.
- Lord, C. J. and A. Ashworth (2012). "The DNA damage response and cancer therapy." Nature **481**(7381): 287-294.
- Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, et al. (2005). "BRCA1 participates in DNA decatenation." Nat Struct Mol Biol **12**(7): 589-593.
- Luijsterburg, M. S. and H. van Attikum (2011). "Chromatin and the DNA damage response: the cancer connection." Mol Oncol **5**(4): 349-367.
- Luijsterburg, M. S. and H. van Attikum (2012). "Close encounters of the RNF8th kind: when chromatin meets DNA repair." Curr Opin Cell Biol **24**(3): 439-447.
- Luo, K., J. Yuan, et al. (2009). "Topoisomerase IIalpha controls the decatenation checkpoint." Nat Cell Biol **11**(2): 204-210.
- Lydeard, J. R., B. A. Schulman, et al. (2013). "Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases." EMBO Rep **14**(12): 1050-1061.
- Lloyd, J., J. R. Chapman, et al. (2009). "A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage." Cell **139**(1): 100-111.
- Ma, Y., U. Pannicke, et al. (2005). "The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis." J Biol Chem **280**(40): 33839-33846.
- Mahaney, B. L., K. Meek, et al. (2009). "Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining." Biochem J **417**(3): 639-650.
- Makharashvili, N. and T. T. Paull (2015). "CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism." DNA Repair (Amst) **32**: 75-81.
- Makharashvili, N., A. T. Tubbs, et al. (2014). "Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection." Mol Cell **54**(6): 1022-1033.
- Manthei, K. A. and J. L. Keck (2013). "The BLM dissolvasome in DNA replication and repair." Cell Mol Life Sci **70**(21): 4067-4084.
- McClendon, A. K. and N. Osheroff (2007). "DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer." Mutat Res **623**(1-2): 83-97.
- McClendon, A. K., A. C. Rodriguez, et al. (2005). "Human topoisomerase IIalpha rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks." J Biol Chem **280**(47): 39337-39345.
- McDonald, J. P. and R. Rothstein (1994). "Unrepaired heteroduplex DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is decreased in RAD1 RAD52-independent recombination." Genetics **137**(2): 393-405.
- Meloni, A. R., E. J. Smith, et al. (1999). "A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9574-9579.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.

- Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2009). "DNA end resection: many nucleases make light work." DNA Repair (Amst) **8**(9): 983-995.
- Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2011). "DNA end resection--unraveling the tail." DNA Repair (Amst) **10**(3): 344-348.
- Mladenov, E., S. Magin, et al. (2016). "DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation." Semin Cancer Biol **37-38**: 51-64.
- Molloy, D. P., P. M. Barral, et al. (2001). "Structural determinants outside the PXDLS sequence affect the interaction of adenovirus E1A, C-terminal interacting protein and Drosophila repressors with C-terminal binding protein." Biochim Biophys Acta **1546**(1): 55-70.
- Moreau, S., E. A. Morgan, et al. (2001). "Overlapping functions of the Saccharomyces cerevisiae Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism." Genetics **159**(4): 1423-1433.
- Moshous, D., I. Callebaut, et al. (2001). "Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency." Cell **105**(2): 177-186.
- Moynahan, M. E., J. W. Chiu, et al. (1999). "Brca1 controls homology-directed DNA repair." Mol Cell **4**(4): 511-518.
- Nagaraju, G., A. Hartlerode, et al. (2009). "XRCC2 and XRCC3 regulate the balance between short- and long-tract gene conversions between sister chromatids." Mol Cell Biol **29**(15): 4283-4294.
- Nakamura, K., T. Kogame, et al. (2010). "Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair." PLoS Genet **6**(1): e1000828.
- Nam, E. A. and D. Cortez (2011). "ATR signalling: more than meeting at the fork." Biochem J **436**(3): 527-536.
- Neale, M. J., J. Pan, et al. (2005). "Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks." Nature **436**(7053): 1053-1057.
- Nelson, A. C. and J. T. Holt (2010). "Impact of RING and BRCT domain mutations on BRCA1 protein stability, localization and recruitment to DNA damage." Radiat Res **174**(1): 1-13.
- Nimonkar, A. V., J. Genschel, et al. (2011). "BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair." Genes Dev **25**(4): 350-362.
- Nitiss, J. L. (2009). "Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy." Nat Rev Cancer **9**(5): 338-350.
- O'Driscoll, M. and P. A. Jeggo (2006). "The role of double-strand break repair - insights from human genetics." Nat Rev Genet **7**(1): 45-54.
- Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, et al. (2009). "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship." Cell Mol Life Sci **66**(6): 1039-1056.
- Parvin, J. D. (2009). "The BRCA1-dependent ubiquitin ligase, gamma-tubulin, and centrosomes." Environ Mol Mutagen **50**(8): 649-653.
- Paudyal, S. C. and Z. You (2016). "Sharpening the ends for repair: mechanisms and regulation of DNA resection." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **48**(7): 647-657.
- Paull, T. T. and M. Gellert (1998). "The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks." Mol Cell **1**(7): 969-979.
- Peterson, S. E., Y. Li, et al. (2011). "Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair." J Cell Biol **194**(5): 705-720.
- Peterson, S. E., Y. Li, et al. (2013). "Activation of DSB processing requires phosphorylation of CtIP by ATR." Mol Cell **49**(4): 657-667.

Referencias

- Plank, J. L., J. Wu, et al. (2006). "Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11118-11123.
- Polato, F., E. Callen, et al. (2014). "CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1." J Exp Med **211**(6): 1027-1036.
- Pollard, J. M. and R. A. Gatti (2009). "Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(5): 1323-1331.
- Pommier, Y. (2012). DNA Topoisomerases and Cancer. Springer-Verlag New York, Springer New York.
- Pommier, Y. (2013). "Drugging topoisomerases: lessons and challenges." ACS Chem Biol **8**(1): 82-95.
- Pommier, Y. and J. Cherfils (2005). "Interfacial inhibition of macromolecular interactions: nature's paradigm for drug discovery." Trends Pharmacol Sci **26**(3): 138-145.
- Pommier, Y., S. Y. Huang, et al. (2014). "Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2)." DNA Repair (Amst) **19**: 114-129.
- Pommier, Y., E. Kiselev, et al. (2015). "Interfacial inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **25**(18): 3961-3965.
- Prado, F. and A. Aguilera (2003). "Control of cross-over by single-strand DNA resection." Trends Genet **19**(8): 428-431.
- Prakash, R., Y. Zhang, et al. (2015). "Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(4): a016600.
- Puget, N., M. Knowlton, et al. (2005). "Molecular analysis of sister chromatid recombination in mammalian cells." DNA Repair (Amst) **4**(2): 149-161.
- Qi, X., S. Hou, et al. (2011). "Phosphorylation and stabilization of topoisomerase IIalpha protein by p38gamma mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons." J Biol Chem **286**(41): 35883-35890.
- Quennet, V., A. Beucher, et al. (2011). "CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1." Nucleic Acids Res **39**(6): 2144-2152.
- Qvist, P., P. Huertas, et al. (2011). "CtIP Mutations Cause Seckel and Jawad Syndromes." PLoS Genet **7**(10): e1002310.
- Raderschall, E., E. I. Golub, et al. (1999). "Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 1921-1926.
- Rass, U., S. A. Compton, et al. (2010). "Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein." Genes Dev **24**(14): 1559-1569.
- Reczek, C. R., M. Szabolcs, et al. (2013). "The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression." J Cell Biol **201**(5): 693-707.
- Roca, J., J. M. Berger, et al. (1996). "DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4057-4062.
- Rodriguez, M., X. Yu, et al. (2003). "Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains." J Biol Chem **278**(52): 52914-52918.
- Roset, R., A. Inagaki, et al. (2014). "The Rad50 hook domain regulates DNA damage signaling and tumorigenesis." Genes Dev **28**(5): 451-462.
- Roy, S., S. N. Andres, et al. (2012). "XRCC4's interaction with XLF is required for coding (but not signal) end joining." Nucleic Acids Res **40**(4): 1684-1694.
- Sakasai, R., K. Shinohe, et al. (2006). "Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases in hyperphosphorylation of replication protein A2 in response to replication-mediated DNA double-strand breaks." Genes Cells **11**(3): 237-246.

- San Filippo, J., P. Sung, et al. (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem **77**: 229-257.
- Sartori, A. A., C. Lukas, et al. (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." Nature **450**(7169): 509-514.
- Savage, K. I. and D. P. Harkin (2015). "BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability." FEBS J **282**(4): 630-646.
- Schaeper, U., J. M. Boyd, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10467-10471.
- Schaeper, U., T. Subramanian, et al. (1998). "Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif." J Biol Chem **273**(15): 8549-8552.
- Shakya, R., L. J. Reid, et al. (2011). "BRCA1 tumor suppression depends on BRCT phosphoprotein binding, but not its E3 ligase activity." Science **334**(6055): 525-528.
- Shao, R. G., C. X. Cao, et al. (1999). "Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes." EMBO J **18**(5): 1397-1406.
- Shi, Y., J. Sawada, et al. (2003). "Coordinated histone modifications mediated by a CtBP corepressor complex." Nature **422**(6933): 735-738.
- Shinohara, A., H. Ogawa, et al. (1993). "Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA." Nat Genet **4**(3): 239-243.
- Skoufias, D. A., F. B. Lacroix, et al. (2004). "Inhibition of DNA decatenation, but not DNA damage, arrests cells at metaphase." Mol Cell **15**(6): 977-990.
- Smith, G. C. and S. P. Jackson (1999). "The DNA-dependent protein kinase." Genes Dev **13**(8): 916-934.
- Sorensen, C. S., L. T. Hansen, et al. (2005). "The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair." Nat Cell Biol **7**(2): 195-201.
- Soria-Bretones, I., C. Saez, et al. (2013). "Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer." Cancer Med **2**(6): 774-783.
- Srinivasan, L. and M. L. Atchison (2004). "YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP." Genes Dev **18**(21): 2596-2601.
- Steger, M., O. Murina, et al. (2013). "Prolyl isomerase PIN1 regulates DNA double-strand break repair by counteracting DNA end resection." Mol Cell **50**(3): 333-343.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, et al. (2004). "ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation." Cancer Res **64**(7): 2390-2396.
- Sum, E. Y., B. Peng, et al. (2002). "The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity." J Biol Chem **277**(10): 7849-7856.
- Symington, L. S. (2016). "Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes." Crit Rev Biochem Mol Biol **51**(3): 195-212.
- Symington, L. S. and J. Gautier (2011). "Double-strand break end resection and repair pathway choice." Annu Rev Genet **45**: 247-271.
- Thompson, E. G., H. Fares, et al. (2012). "BRCA1 requirement for the fidelity of plasmid DNA double-strand break repair in cultured breast epithelial cells." Environ Mol Mutagen **53**(1): 32-43.
- Thorslund, T., A. Ripplinger, et al. (2015). "Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage." Nature **527**(7578): 389-393.

Referencias

- Ting, N. S. and W. H. Lee (2004). "The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 935-944.
- Tirkkonen, M., O. Johannsson, et al. (1997). "Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations." Cancer Res **57**(7): 1222-1227.
- Truong, L. N., Y. Li, et al. (2013). "Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(19): 7720-7725.
- Uringa, E. J., J. L. Youds, et al. (2011). "RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination." Nucleic Acids Res **39**(5): 1647-1655.
- Ute Schaeper, T. S., Louis Lim, Janice M. Boyd and G. Chinnadurai (1998). "Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif." J Biol Chem. **273**(15): 8549-8552.
- Vaze, M. B., A. Pellicoli, et al. (2002). "Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase." Mol Cell **10**(2): 373-385.
- Vilkki, S., V. Launonen, et al. (2002). "Screening for microsatellite instability target genes in colorectal cancers." J Med Genet **39**(11): 785-789.
- Walker, J. R., R. A. Corpina, et al. (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." Nature **412**(6847): 607-614.
- Wang, B. (2012). "BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail." Cell Biosci **2**(1): 6.
- Wang, B., S. Matsuoka, et al. (2007). "Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response." Science **316**(5828): 1194-1198.
- Wang, H., Y. Li, et al. (2014). "CtIP maintains stability at common fragile sites and inverted repeats by end resection-independent endonuclease activity." Mol Cell **54**(6): 1012-1021.
- Wang, H., L. Z. Shi, et al. (2013). "The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair." PLoS Genet **9**(2): e1003277.
- Wang, J., Q. Ding, et al. (2016). "Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors." Oncotarget **7**(7): 7701-7714.
- Wang, L. and D. A. Eastmond (2002). "Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merbarone and ICRF-187." Environ Mol Mutagen **39**(4): 348-356.
- Warbrick, E. (1998). "PCNA binding through a conserved motif." Bioessays **20**(3): 195-199.
- Watt, P. M. and I. D. Hickson (1994). "Structure and function of type II DNA topoisomerases." Biochem J **303** (Pt 3): 681-695.
- West, S. C. (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 435-445.
- Westmoreland, J., W. Ma, et al. (2009). "RAD50 is required for efficient initiation of resection and recombinational repair at random, gamma-induced double-strand break ends." PLoS Genet **5**(9): e1000656.
- Williams, G. J., S. P. Lees-Miller, et al. (2010). "Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **9**(12): 1299-1306.
- Williams, R. S., G. E. Dodson, et al. (2009). "Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair." Cell **139**(1): 87-99.
- Williams, R. S., G. Moncalian, et al. (2008). "Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair." Cell **135**(1): 97-109.

- Wong, A. K., P. A. Ormonde, et al. (1998). "Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein." *Oncogene* **17**(18): 2279-2285.
- Wu-Baer, F. and R. Baer (2001). "Effect of DNA damage on a BRCA1 complex." *Nature* **414**(6859): 36.
- Wu, G. and W. H. Lee (2006). "CtIP, a multivalent adaptor connecting transcriptional regulation, checkpoint control and tumor suppression." *Cell Cycle* **5**(15): 1592-1596.
- Wu, L. and I. D. Hickson (2003). "The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination." *Nature* **426**(6968): 870-874.
- Wyatt, H. D. and S. C. West (2014). "Holliday junction resolvases." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**(9): a023192.
- Yoo, S. and W. S. Dynan (1999). "Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein." *Nucleic Acids Res* **27**(24): 4679-4686.
- You, Z., L. Z. Shi, et al. (2009). "CtIP links DNA double-strand break sensing to resection." *Mol Cell* **36**(6): 954-969.
- Yu, X. and R. Baer (2000). "Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor." *J Biol Chem* **275**(24): 18541-18549.
- Yu, X. and J. Chen (2004). "DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9478-9486.
- Yu, X., C. C. Chini, et al. (2003). "The BRCT domain is a phospho-protein binding domain." *Science* **302**(5645): 639-642.
- Yu, X., S. Fu, et al. (2006). "BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP." *Genes Dev* **20**(13): 1721-1726.
- Yu, X., L. C. Wu, et al. (1998). "The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression." *J Biol Chem* **273**(39): 25388-25392.
- Yun, M. H. and K. Hiom (2009). "CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle." *Nature* **459**(7245): 460-463.
- Zakharyevich, K., Y. Ma, et al. (2010). "Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions." *Mol Cell* **40**(6): 1001-1015.
- Zeman, M. K. and K. A. Cimprich (2014). "Causes and consequences of replication stress." *Nat Cell Biol* **16**(1): 2-9.
- Zhang, F., J. Ma, et al. (2009). "PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response." *Curr Biol* **19**(6): 524-529.
- Zhang, H., H. Liu, et al. (2016). "A cell cycle-dependent BRCA1-UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice." *Nat Commun* **7**: 10201.
- Zheng, L., H. Pan, et al. (2000). "Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1." *Mol Cell* **6**(4): 757-768.
- Zheng, L., M. Zhou, et al. (2008). "Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates." *Mol Cell* **32**(3): 325-336.
- Zhou, Y., P. Caron, et al. (2014). "Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells." *Nucleic Acids Res* **42**(3): e19.
- Zierhut, C. and J. F. Diffley (2008). "Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response." *EMBO J* **27**(13): 1875-1885.
- Zimmermann, M., F. Lottersberger, et al. (2013). "53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection." *Science* **339**(6120): 700-704.

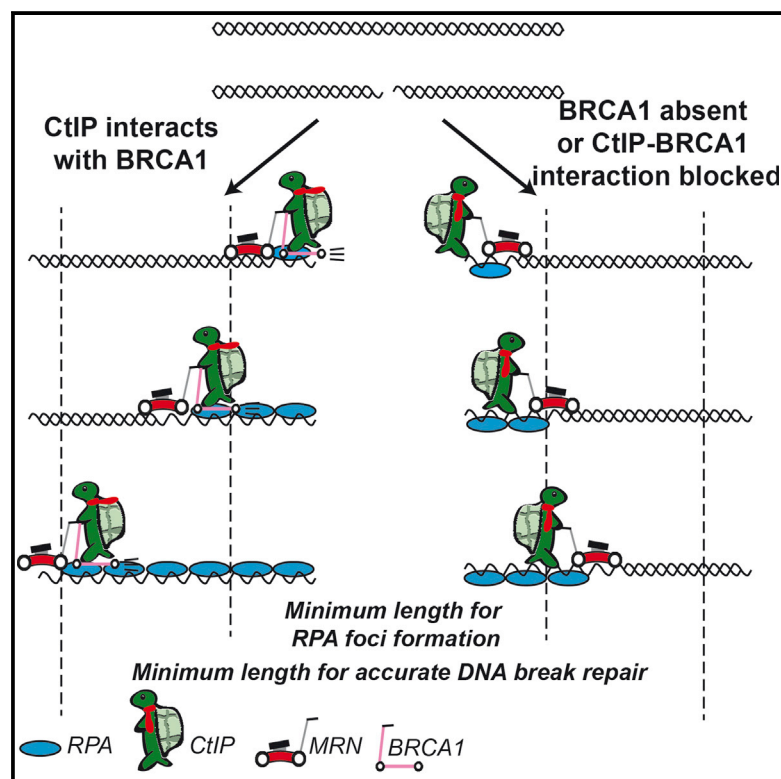
Referencias

Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-1548.

PUBLICACIONES

BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection

Graphical Abstract



Authors

Andrés Cruz-García, Ana López-Saavedra, Pablo Huertas

Correspondence

pablo.huertas@cabimer.es

In Brief

CtIP is a key factor regulating DNA-end resection, an early step in DNA repair that controls the choice of repair pathway. CtIP interacts with BRCA1, but the exact role of BRCA1 in DNA-end resection is unclear. Cruz-García et al. develop a high-resolution method to measure the extent of DNA resection following DNA breaks. They find that resection occurs in the absence of a BRCA1-CtIP interaction, but the rate of resection is slower, suggesting that BRCA1 modulates its speed.

Highlights

A high-resolution method is used to measure DNA-end resection

BRCA1 interaction with CtIP is not essential for resection

BRCA1 interaction with CtIP affects resection speed



BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection

Andrés Cruz-García,^{1,2} Ana López-Saavedra,^{1,2} and Pablo Huertas^{1,2,*}¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), 41092 Sevilla, Spain²Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, 41080, Sevilla, Spain*Correspondence: pablo.huertas@cabimer.es<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.076>This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

DNA-end resection is a highly regulated and critical step in the response and repair of DNA double-strand breaks. In higher eukaryotes, CtIP regulates resection by integrating cellular signals via its posttranslational modifications and protein-protein interactions, including cell-cycle-controlled interaction with BRCA1. The role of BRCA1 in DNA-end resection is not clear. Here, we develop an assay to study DNA resection in higher eukaryotes at high resolution. We demonstrate that the BRCA1-CtIP interaction, albeit not essential for resection, modulates the speed at which this process takes place.

INTRODUCTION

Repairing DNA double-strand breaks (DSBs) is essential to ensure cell and organismal survival (Aguilera and Gómez-González, 2008). In multicellular organisms, the complete absence of DSB repair produces severe phenotypes such as embryonic lethality, immune deficiency, and sterility (Aguilera and Gómez-González, 2008). While many different pathways contribute to repairing DSBs, these can be categorized into three groups according to their use of homology during the repair process (Huertas, 2010); use of long homologous sequences (homologous recombination [HR]), short homologous DNA tracks (microhomology-mediated end joining [MMEJ]), or no homology at all (nonhomologous end joining [NHEJ]). Coordinating all three pathways is extremely important for maintaining genome stability. The key event that controls the DSB repair pathway choice is DNA-end resection. This mechanism consists of a 5' to 3' degradation of one strand at each side of the break (Huertas, 2010). Since NHEJ is inhibited by DNA-end resection, the DNA end once resected is committed to being repaired by either HR or MMEJ (Huertas, 2010). In mammals, CtIP is so far the best known molecular switch that controls DNA-end resection and, therefore, DSB repair pathway choice (Escribano-Díaz et al., 2013; Huertas et al., 2008; Huertas and Jackson, 2009; Nakamura et al., 2010; Reczek et al., 2013; Sartori et al., 2007; Steger et al., 2013; Wang et al., 2013; Yun and Hiom, 2009). Among other modifications, CtIP is phosphorylated by cyclin-dependent kinases (CDKs) at many different residues, which serves to control its activity (Huertas et al., 2008; Huertas and Jackson, 2009), stability (Steger et al., 2013), or interaction with other factors

(Nakamura et al., 2010; Reczek et al., 2013; Wang et al., 2013; Yun and Hiom, 2009). BRCA1, a tumor suppressor gene involved in recombination (Huen et al., 2010; Moynahan et al., 1999), interacts physically with CtIP in a CDK phosphorylation-mediated manner (Yu and Chen, 2004). Indirect evidences suggest that BRCA1-CtIP interaction plays a role in DSB repair pathway choice by affecting DNA-end resection, thereby facilitating the removal of the 53BP1-RIF1 complex (Cao et al., 2009; Chapman et al., 2013; Escribano-Díaz et al., 2013). Although one report claimed that CtIP mutants that block its interaction with BRCA1 in DT40 cells hamper DNA-end resection (Yun and Hiom, 2009), additional studies in DT40 and mice showed opposite results (Nakamura et al., 2010; Reczek et al., 2013).

Here we clarify the role of CtIP-BRCA1 interaction on DNA resection by different approaches. First, using CtIP mutants that change the interaction with BRCA1, we could demonstrate that such an interaction is involved in proper cell survival and checkpoint activation upon DNA damage. Second, we developed a technique that allows resection to be measured at high resolution in irradiation or drug-treated mammalian cells and to calculate resection speed. Using this technique, we observed that although resection could take place in the absence of an interaction between CtIP and BRCA1 it was slowed down. Thus, the CtIP-BRCA1 complex is not essential for DNA-end resection, but it modulates its speed.

RESULTS AND DISCUSSION

CtIP Mutants that Modify Its Interaction with BRCA1

The CtIP-BRCA1 interaction in human cells is controlled by the CDK-mediated phosphorylation of CtIP at serine 327 (S327) (Chen et al., 2008; Yu and Chen, 2004; Yu et al., 2006). Mutations that convert this serine to alanine abolish the interaction and render cells sensitive to different DNA-damaging agents (Chen et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Reczek et al., 2013; Yu and Chen, 2004; Yu et al., 2006; Yun and Hiom, 2009). To study in more detail the role of the CtIP-BRCA1 complex on DNA-end resection and DNA repair, we used a green fluorescent protein (GFP)-tagged version of the CtIP-S327A mutant and a tagged-version of CtIP that constitutively interacts with BRCA1 by substituting S327 with aspartic acid, which mimics constitutive phosphorylation (CtIP-S327D allele; Figure 1A). First, we checked that the S327A and S327D mutants really modify the interaction with BRCA1. Indeed, the CtIP-S327A mutant blocked such an interaction, while the CtIP-S327D version reconstituted the interaction (Figure 1B). As the interaction of CtIP with BRCA1,

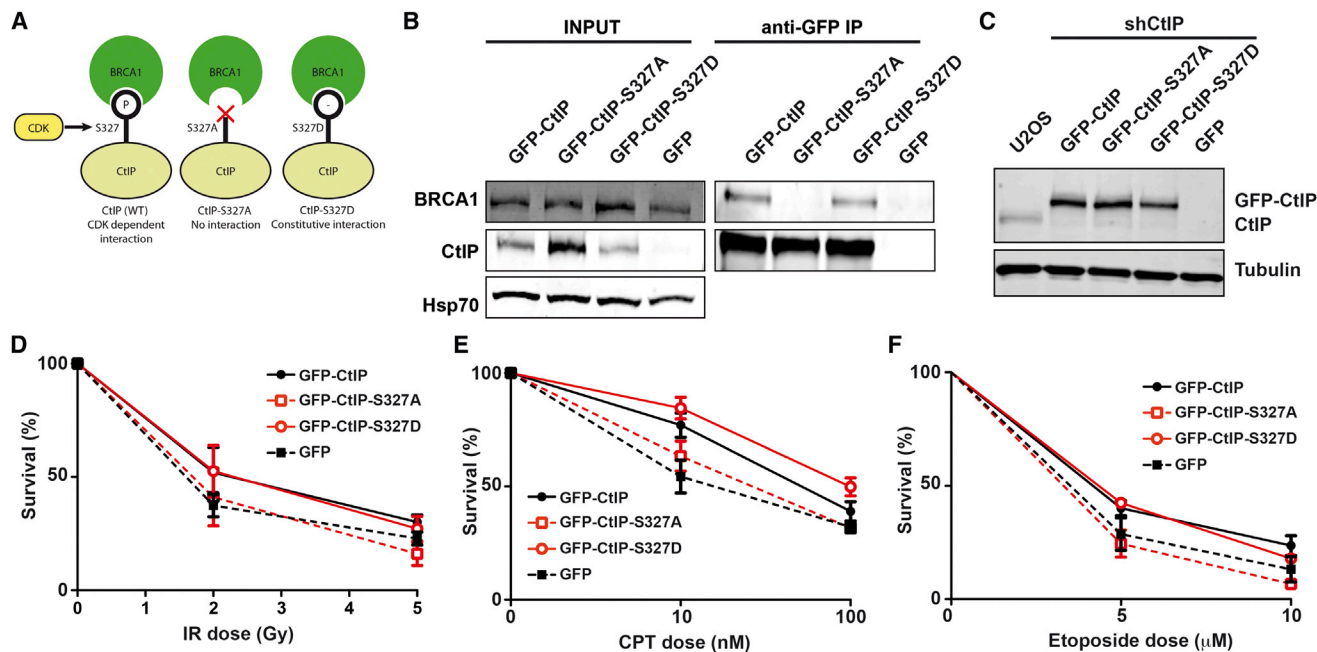


Figure 1. CtIP Mutations that Control Its Interaction with BRCA1

(A) Schematic representation of CtIP mutations and their effect on the interaction with BRCA1.

(B) Interaction of different CtIP mutants with BRCA1. GFP-CtIP and FLAG-BRCA1 were coimmunoprecipitated as described in the [Experimental Procedures](#) section. Protein samples were resolved in SDS-PAGE and blotted with the indicated antibodies.

(C) Expression of GFP-CtIP fusions upon downregulation of endogenous CtIP in U2OS cells. A sample from U2OS cells is shown for endogenous level of CtIP. (D–F) Sensitivity to IR (D), CPT (E), or ETOP (F) of U2OS cells harboring the indicated CtIP mutations. The mean and SD of three independent experiments are plotted.

See also [Figure S1](#).

HR, and DNA-end resection are cell-cycle-regulated processes, we checked that not significant changes in cell-cycle distribution were observed in CtIP-S327A and CtIP-S327D backgrounds ([Figure S1](#)).

Blocking the CtIP-BRCA1 interaction render cells sensitive to several DNA-damaging agents, especially inhibitors of topoisomerases such as camptothecin (CPT) and etoposide (ETOP) ([Chen et al., 2008](#); [Nakamura et al., 2010](#); [Reczek et al., 2013](#); [Yu and Chen, 2004](#); [Yu et al., 2006](#); [Yun and Hiom, 2009](#)). To confirm that this sensitivity is due to the lack of interaction, we performed clonogenic assays using U2OS cells stably transfected with different GFP-tagged versions of CtIP and depleted for endogenous CtIP ([Figure 1C](#)). We used ionizing radiation (IR) and ETOP, which damages the DNA in all phases of the cell cycle, and CPT, which only causes DSBs in the S phase coupled to replication. In agreement with previous results, CtIP-S327A mutants were as sensitive to IR, ETOP, and CPT as cells depleted for CtIP ([Figures 1D–1F](#)). Moreover, we conclude that the sensitivity to DNA damage is a direct consequence of the lack of interaction, as it was reverted to wild-type levels when CtIP constitutively interacts with BRCA1 ([Figures 1D–1F](#)).

CtIP and DNA Processing

Most reports on the CtIP-BRCA1 interaction agree that it is involved in DNA repair ([Chen et al., 2008](#); [Nakamura et al.,](#)

[2010](#); [Reczek et al., 2013](#); [Yu and Chen, 2004](#); [Yu et al., 2006](#); [Yun and Hiom, 2009](#)). However, it is less clear if this interaction is required for DNA-end resection ([Nakamura et al., 2010](#); [Reczek et al., 2013](#); [Yun and Hiom, 2009](#)).

Resected DNA is immediately coated by the single-stranded DNA (ssDNA)-protecting complex RPA. We first analyzed the appearance of RPA foci 1 hr after the DNA was challenged with a damaging agent of IR, CPT, or ETOP. Neither GFP-CtIP-S327A nor GFP-CtIP-S327D mutations had any apparent effect on RPA-foci formation after IR- or CPT-induced damage, in stark contrast with control cells expressing GFP ([Figures 2A and 2B](#)). Moreover, BRCA1 depletion also had little to no effect on RPA-foci formation ([Figure 2A and B](#)). Thus, we conclude that neither the BRCA1 nor the CtIP-BRCA1 interaction is essential for DNA-end resection on cells treated with IR or CPT. Coherent results were obtained when phosphorylation at serine 4 and serine 8 of RPA was used as a readout of DNA-end resection ([Figure S2](#)), but a mild not statistically significant reduction of phospho RPA was observed in CtIP-S327A after IR. However, a mild but clear decrease in RPA-foci was observed both in the CtIP-S327A and BRCA1 depletion when ETOP was used ([Figure 2C](#)). In agreement, the phospho RPA versus RPA ratio was decreased in CtIP-S327A to a similar extent as the GFP control ([Figure S2](#)). As ETOP traps topoisomerase II covalently bound to the 5' end of the break, whereas CPT does the same to topoisomerase I at the 3' end, we suspected that BRCA1 and the CtIP-BRCA1

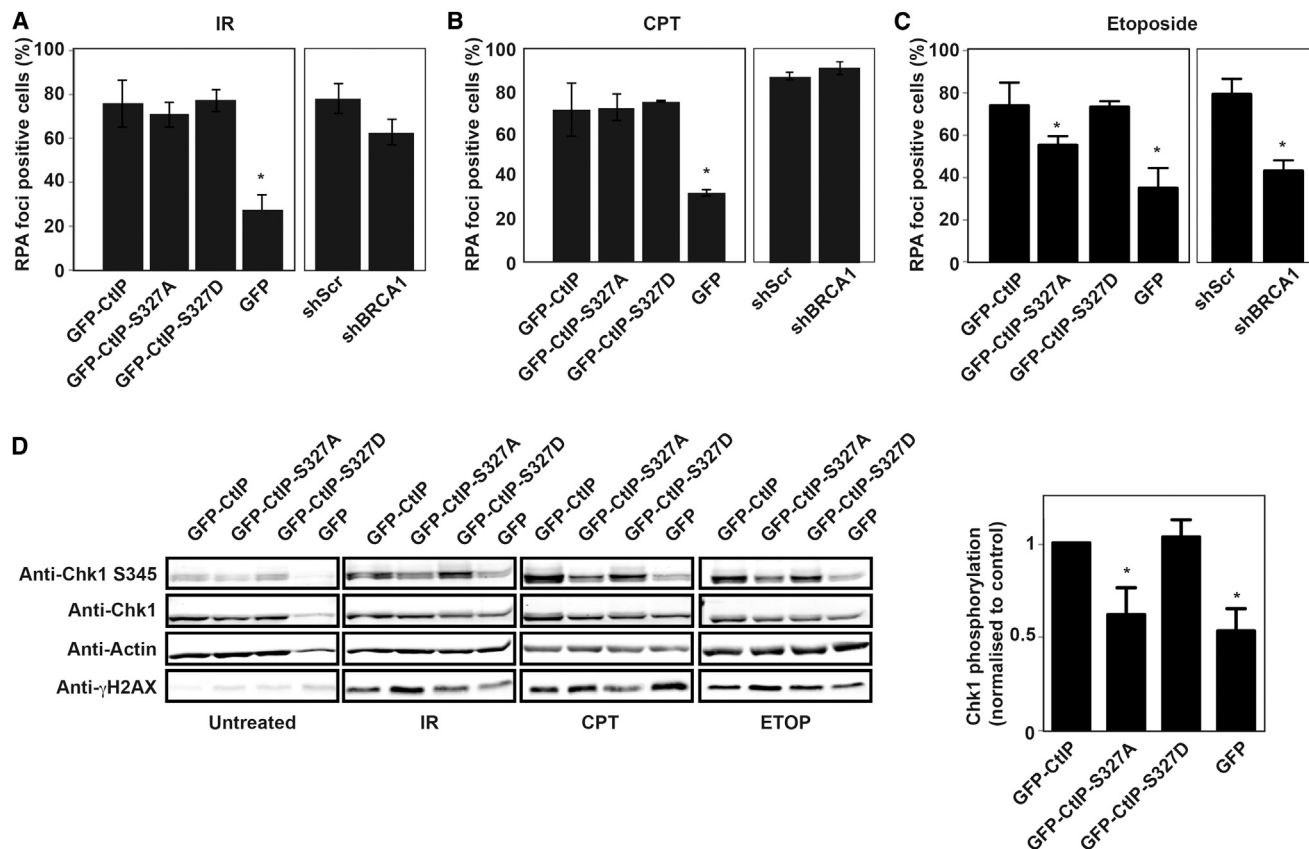


Figure 2. RPA Foci Formation in U2OS Cells Stably Transfected with CtIP S327 Mutants

(A–C) Percentage of γ H2AX-positive cells with visible RPA-foci in different CtIP or BRCA1 background 1 hr after treatment with 10 Gy of IR (A), 1 μ M of CPT (B), or 10 μ M ETOP (C). The mean and SD of three independent experiments are plotted. Statistical significance was calculated as described in the [Experimental Procedures](#) section. See also [Figure S2](#).

(D) ATR activity, as measured by Chk1 phosphorylation at S345, in cells harboring CtIP variants after the indicated genotoxic treatments. Protein samples were taken 1 hr after the treatment, collected as indicated in the [Experimental Procedures](#) section, and blotted with the indicated antibodies. A representative western blot (left) and quantification for Chk1 phosphorylation (right) are shown. Statistical significance was calculated as described in the [Experimental Procedures](#) section.

interaction are required to release proteins covalently bound to the 5' end of the break. This situation resembles what happens during meiosis, in which the topoisomerase II-like enzyme Spo11 creates DSBs on the DNA ([Neale et al., 2005](#)). In budding yeast, drug-induced or IR-induced breaks are resected in the absence of the CtIP functional ortholog Sae2 due to the activity of exonucleases such as Exo1 ([Moreau et al., 2001](#)). However, the removal of Spo11 adducts in meiosis is completely dependent on Sae2 ([Neale et al., 2005](#)).

As an alternative readout for DNA-end processing, we decided to analyze the activation of the ATR branch of the DNA damage response. Resected DNA acts as a platform for the binding of the checkpoint complex ATRIP-ATR, which is essential for triggering the checkpoint ([Zou and Elledge, 2003](#)). In fact, the amount of ATRIP bound to DNA responds to the amount of RPA-coated ssDNA ([Zou and Elledge, 2003](#)). We then analyzed the activation of the ATR branch of the checkpoint by measuring the phosphorylation of Chk1 ([Figure 2D](#)). We observed that cells bearing the CtIP-S327A mutant, but not the CtIP-S327D, had a mild reduc-

tion in Chk1 activation, in agreement with a reduced length of resected ssDNA.

Based on these conflicting observations about the putative role of CtIP-BRCA1 interaction in DNA resection, we contemplated two alternative scenarios: either the CtIP-BRCA1 complex has a second role in DNA repair and ATR activation not related with resection or the lack of interaction between CtIP and BRCA1 has a role on DNA-end resection too subtle to be observed by RPA foci accumulation.

Single-Molecule Analysis of Resection Tracks

RPA-foci formation is a low-resolution technique to measure DNA-end resection that does not give information about the length of the resected DNA track ([Figure 3A](#)). In yeast, resection could be quantified at higher resolution ([Clerici et al., 2006](#); [Westmoreland et al., 2009](#); [Zierhut and Diffley, 2008](#)), but such approaches are difficult to apply in vertebrate cells. Only recently, a PCR-based assay has been developed for human cells; however, it is limited to the analysis of resection at sites created by

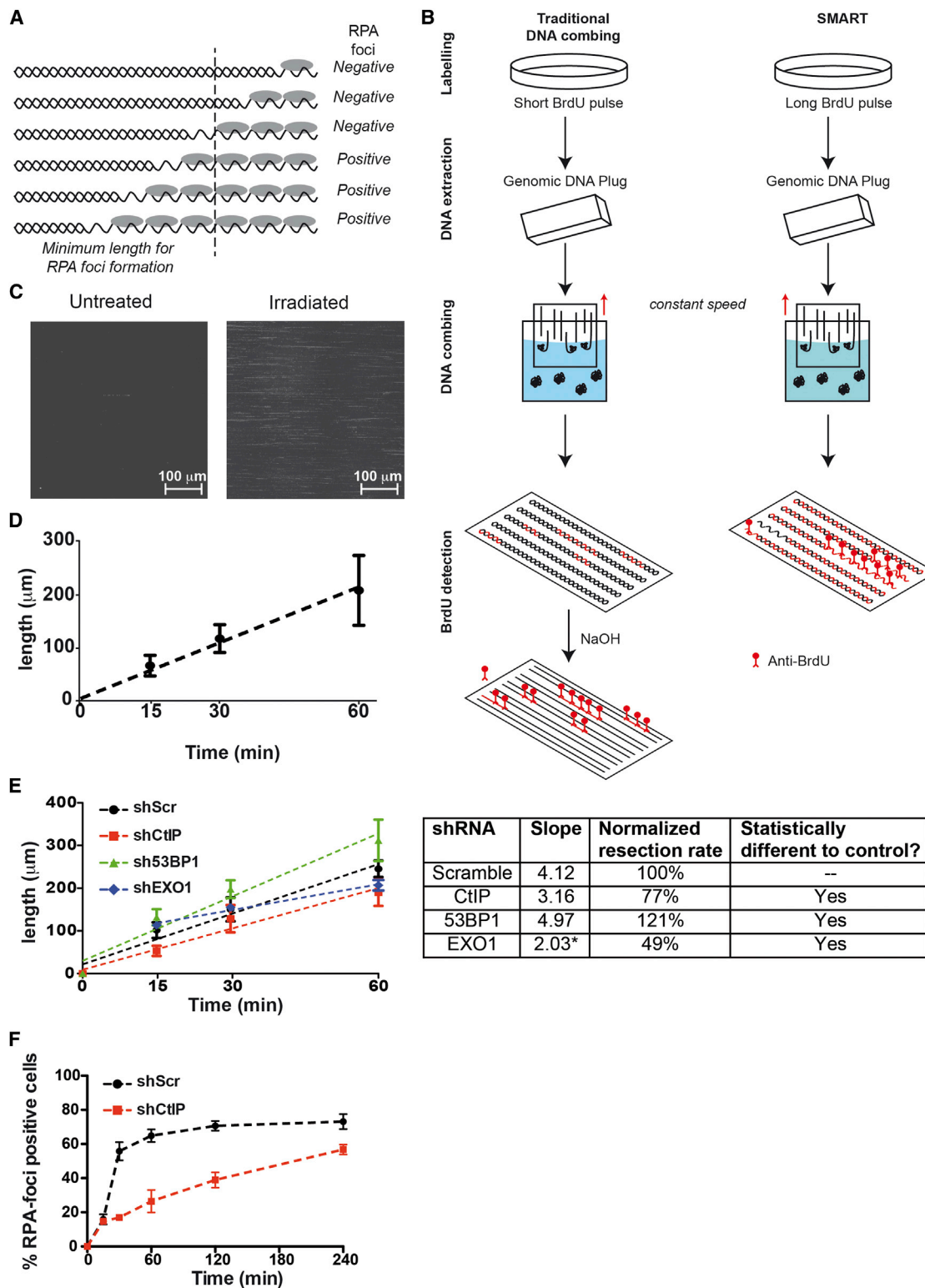


Figure 3. Single-Molecule Analysis of Resection Tracks

(A) Schematic representation of the limitation of RPA-foci scoring as a measurement of DNA-end resection. The two possible categories, e.g., RPA foci-positive or -negative cells, do not discriminate between resected DNA of different lengths.

(B) Graphic representation of the similarities and differences of the DNA combing (left) and the SMART (right) techniques to study replication or resection speed, respectively. In both cases, DNA was labeled with BrdU (indicated in red), isolated in plugs to minimize DNA shearing, stretched on a coverslip at constant speed, (legend continued on next page)

endonucleases at specific sites of the genome (Zhou et al., 2014).

To analyze in more detail the putative role of CtIP-BRCA1 complex in resection, we have developed a technique for measuring the length of resected DNA at the level of single molecules: single-molecule analysis of resection tracks (SMARTs). This method can be easily extrapolated to any model cellular system from bacteria to human cells and can be used to analyze resection created by any damaging agent anywhere in the genome.

We based the SMART method on the DNA-combing technique (Herrick and Bensimon, 1999) (Figure 3B, left). This approach uses thymidine analogs, such as bromodeoxyuridine (BrdU), to determine the speed of replication. Briefly, a short pulse of a thymidine analog is followed by a gentle DNA purification. DNA molecules are stretched on a coverslip at a fixed speed, forming parallel fibers. Newly replicated DNA is then detected by immunofluorescence. However, anti-BrdU antibodies recognize an epitope that is usually hidden inside the DNA. Therefore, DNA has to be first denatured to expose the BrdU epitope, and then the coverslips are incubated with an anti-BrdU antibody. At the end, the newly synthesized DNA can be visualized as individual tracks, the length of which can be measured (Herrick and Bensimon, 1999).

BrdU has been previously used to study DNA resection at low resolution by cellular immunofluorescence (Raderschall et al., 1999). For this approach, a long BrdU pulse (20 to 24 hr) is required to allow one strand of every DNA molecule to be labeled. Upon DSB formation, DNA resection over BrdU-labeled DNA exposes the epitope recognized by the antibody and can readily be observed under the microscope without denaturation. This technique, similar as RPA-foci formation, is unable to measure how fast resection is taking place. We combined this approach with a modified DNA combing technique to visualize individual tracks of resected DNA (Figure 3B, right, SMART). Cells were exposed to BrdU for 24 hr, treated or mock treated with IR, and incubated 1 hr to allow DNA resection to take place. We isolated and stretched DNA and immunodetected BrdU in native conditions (Figure 3B, right). As observed in Figure 3C, almost no fibers were detected with the antibody from DNA from cells not treated with IR, indicating that the amount of ssDNA on unperturbed conditions is minimal. In contrast, irradiated samples showed multiple long tracks of BrdU-containing ssDNA. Extensive observation of several fields demonstrates that the number of fibers observed in untreated conditions was less than 1% of those visualized upon irradiation (Figure S3A). Moreover, those tracks

observed in control cells were substantially shorter (Figure S3A). We reasoned that these short ssDNA tracks were either created during replication or reflect resection of endogenously aroused breaks. In contrast, irradiation creates abundant and long resection tracks. To validate the SMART technique, we made two predictions: first, if the ssDNAs are the product of an active process, such as DNA resection, they should grow at a specific rate, and second, ssDNAs should be affected by downregulation of proteins involved in the regulation and/or process of resection. To test the former idea, we performed the same experiment taking samples at several time points after irradiation from U2OS cells (Figure 3D). We measured the length of at least 200 single resection tracks at each time point per experiment. At each sample, we observed many different lengths of resected DNA (see Figure S3B and Table S1 for individual fibers quantification of representative experiments). We think this reflects different times of resection initiation, resection over different chromatin templates, etc. Similar heterogeneity of resection speed has been previously reported in budding yeast (Zierhut and Diffley, 2008). Thus, we calculate the medians of the measured resected tracks length at each time point as the representative value and then plot the average of the medians of three independent experiments. Strikingly, we observed that the lengths of those tracks grew following a straight line, suggesting a fixed speed of DNA resection. Moreover, a lack of CtIP not only reduced the number of fibers observed, but reduced DNA resection speed by 23% as compared with a control (Figure 3E). Thus, with the SMART technique, we can distinguish between two types of effects during resection: initiation and speed. Whereas the number of resection fibers will be an indication of resection initiation, the slope of the curve calculated with those breaks that are indeed resected will represent resection speed. Considering the physical characteristic of ssDNA on solution (Chi et al., 2013), we could estimate that the resection rate in the shRNA scramble control is about 0.2 kb/hr. This is 20 times slower than the resection calculated for HO breaks in budding yeast (Fishman-Lobell et al., 1992; Vaze et al., 2002). However, it has been shown that only 10% of the breaks actually reach such speed, but the majority is resected at a slower pace (Zierhut and Diffley, 2008). Indeed, such heterogeneity it is also observed with the SMART technique, as not all breaks are equally resected (Table S1). Moreover, in our case, the breaks are not the “clean” HO induced, but “ragged” IR created, which could also explain some of the difference.

We observed that CtIP depletion has a strong effect in resection initiation, as previously described, but also affects resection

and detected using an anti-BrdU antibody. Whereas a denaturation step (NaOH) is required to expose the BrdU epitope in the traditional combing technique, in the SMART technique resection directly exposes the epitope.

(C) A representative image of DNA fibers visualized with the anti-BrdU antibody with the SMART technology from cells untreated (left) or treated with 10 Gy of irradiation (right). See also Figure S3A.

(D) Representation of the mean of the medians of the length of 200 resected fibers at each time point in U2OS cells treated with shRNA control with their linear correlation ($R^2 = 0.998$). The mean and SDs of three independent experiments are plotted. See also Figure S3B.

(E) The same as in (D) but in cells expressing an shRNA against CtIP, 53BP1, EXO1 or a control shRNA (shScr). shCtIP: $R^2 = 0.90$. sh53BP1: $R^2 = 0.92$. shEXO1*: $R^2 = 0.94$. shScr: $R^2 = 0.98$. The absolute resection speed, calculated as the slope of the line, is indicated. The normalized resection rate, calculated normalizing the slope of each curve with the slope of shScr, is also shown. Statistical difference between slopes was calculated as described in the Methods section. *In the case of shEXO1 harboring cells, which followed a biphasic graph, the initial time point (0 min) was omitted for the linear regression. See also Figure S4.

(F) Percentage of γ H2AX-positive cells with visible RPA-foci at different times after irradiation in cells transduced with shRNA against CtIP (shCtIP) or control (shScr). The mean and SD of four independent experiments are plotted.

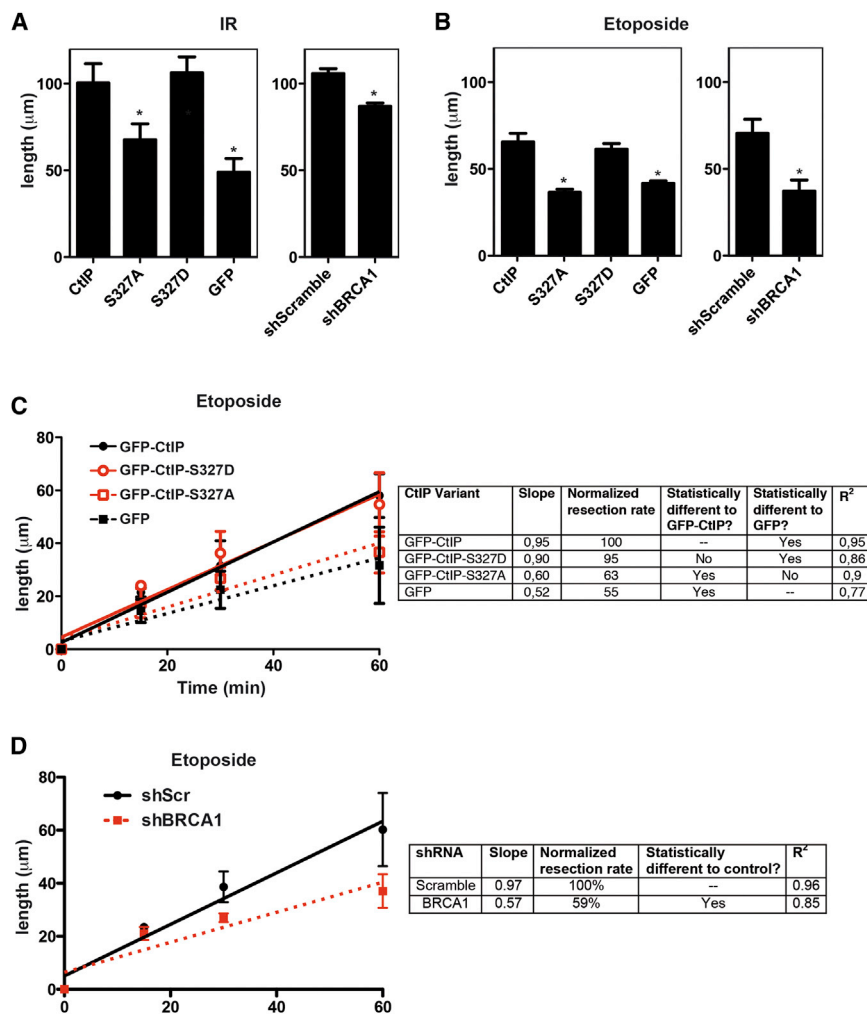


Figure 4. The Interaction between CtIP and BRCA1 Accelerates DNA-End Resection

(A and B) SMART of U2OS cells harboring the indicated CtIP mutants or depleted for BRCA1 1 hr after IR (A) or ETOP (B) treatment. The mean and SDs of three independent experiments are shown. Statistical significance was calculated as described in the [Experimental Procedures](#) section. (C) SMART was performed in U2OS cells expressing the indicated CtIP variants at different time points after addition of ETOP. The mean of three different experiments is plotted. Absolute (slope) and normalized resection rate, calculated as indicated in [Figure 3E](#), are shown. The statistical difference of the slopes compared with either the GFP-CtIP or GFP cell lines was calculated as described in the [Experimental Procedures](#) section.

(D) Same as (B), but in cells depleted of BRCA1 and control cells.

speed. Surprisingly, the effect on resection speed was mild compared with the strong effect that CtIP depletion causes in RPA foci formation 1 hr after DNA damage ([Huertas and Jackson, 2009](#); [Sartori et al., 2007](#)). One interpretation of this apparent contradiction is that in CtIP-depleted cells this mild resection speed defect is enough to shorten resected DNA tracks to avoid visualization of RPA foci by microscopy. We reasoned that, in that case, at later time points the number of cells with RPA foci in cells depleted of CtIP should approach normal levels. Indeed, when we analyzed the formation of RPA foci in control and CtIP-depleted cells at different time points, we realized that the large difference observed at early time points diminished with time, as the number of RPA foci-positive cells reach a plateau in control cells but keep increasing in shCtIP harboring cells. Thus, the SMART technique allowed us to visualize resection tracks in conditions in which RPA foci are not observed, i.e., 1 hr after DNA damage induction. The long-range resection machinery, i.e., EXO1 and BLM ([Gravel et al., 2008](#); [Huertas, 2010](#)), might cause this resection observed in CtIP-depleted cells. This strongly resembles the data observed in budding yeast, in which in the absence of Sae2, Exo1 is able

to resect the DNA, albeit at a slower pace ([Clerici et al., 2006](#); [Moreau et al., 2001](#)).

In stark contrast, depletion of 53BP1 accelerates resection by over 20% ([Figure 3E](#); see [Figure S4](#) for depletion levels). This result agrees with the complex 53BP1-RIF1 blocking DNA-end resection ([Cao et al., 2009](#); [Chapman et al., 2013](#); [Di Virgilio et al., 2013](#); [Escribano-Diaz et al., 2013](#)). Moreover, our results suggest that 53BP1, which is recruited to damaged chromatin in all cell-cycle phases and spreads over kilobases, not only impedes resection in G1 but in S and G2 also slows down resection. Interestingly, whereas

the length of resected DNA in both CtIP and 53BP1 depletion fitted with a linear correlation, when we reduce the amount of EXO1, we observed a different picture. In this case, considering the whole kinetics, the linear correlation was poor (R^2 below 0.7). In fact, it seemed that the initial resection (up to 15 min) in EXO1-depleted cells was similar to control cells, but after that, point resection slows down to 50% ([Figure 3E](#); see [Figure S4](#) for depletion levels). Indeed, considering only time points between 15 and 120 min, the fitness to a linear correlation improved ($R^2 = 0.94$). This observation agrees with EXO1 being involved in a second phase of DNA-end resection and being dispensable for initiation ([Gravel et al., 2008](#); [Huertas, 2010](#)).

Thus, we propose that this technique can be applied to measure the length of single-molecule resection tracks and to calculate resection rate. In contrast, RPA foci formation will reflect the contribution of a protein to both initiation and resection speed.

Resection Is Slower in CtIP-S327A Mutants

We used the SMART technique to analyze the speed of resection in different CtIP backgrounds ([Figures 4A](#) and [4B](#)) after IR or ETOP treatment. First, we measured the length of resected

DNA in the same conditions we used to study RPA-foci formation, i.e., 1 hr following irradiation or the addition of the drug (Figures 2A and 2C). We observed that cells harboring CtIP-S327D resected as much as those bearing wild-type CtIP in both cases. In contrast, impairment of the CtIP-BRCA1 interaction (via the CtIP-S327A mutants) or BRCA1 depletion resulted in shorter resected tracks after both treatments. No difference was observed in the number of resected tracks, indicating that such an interaction is dispensable for resection initiation. Thus, we conclude that, although the CtIP-BRCA1 interaction is not essential for DNA-end resection (Figure 2), it affects the length of resected DNA. This could be explained by a reduction in resection speed, a delay in resection initiation, or an early stop in resection. This is especially important in ETOP-treated cells, in which the timing of topoisomerase II removal could influence the length of resected DNA. Therefore, we performed a kinetic study of resection in cells treated with ETOP (Figures 4C and 4D). We observed that resection speed is indeed reduced when CtIP cannot interact with BRCA1 or BRCA1 is absent to a similar extent as that observed in CtIP-depleted cells. In contrast, a constitutive interaction between CtIP and BRCA1 completely restored resection speed. Thus, we conclude that CtIP interaction with BRCA1 affects resection speed and that this effect is more prominent when the 5' end of the DNA is blocked by a topoisomerase II-DNA adduct.

Considering all of our data collectively, we suggest that CtIP and the rest of the resection machinery are able to resect DNA breaks in the absence of BRCA1. However, BRCA1 action upon CtIP facilitates resection. This is likely due to the role that BRCA1 plays in removing RIF1-53BP1 complexes (Chapman et al., 2013; Escibano-Díaz et al., 2013). Indeed, CtIP-S327A mutants accumulate RIF1 foci in S and G2 phases of the cell cycle (Escibano-Díaz et al., 2013), and depletion of 53BP1 accelerates resection (Figure 3E). The subtle effects on DNA-end resection might explain some of the conflicting data in the literature based on RPA foci formation (Chapman et al., 2013; Escibano-Díaz et al., 2013; Nakamura et al., 2010; Reczek et al., 2013; Yun and Hiom, 2009). Resected DNA is essential for HR. However, long resected tracks are not required to engage the homologous sequence involved in this type of repair. That might explain why HR is not impaired in CtIP-S327A mutants (Nakamura et al., 2010). However, the length of resected DNA will impact checkpoint activation (Figure 2D) and will also affect the type of HR that will take place (Chandramouly et al., 2013; Huertas, 2010), thereby affecting in cell viability upon DNA damage induction. Thus, either the actual shortening of resected DNA or this mild checkpoint defect could account for the sensitivity to DNA-damaging agents observed in the CtIP-S327A mutant, although we cannot exclude an additional role for the CtIP-BRCA1 complex in DSB repair.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture, Lentiviral Infection, and Cell Survival

U2OS or HEK293 cells stably expressing GFP-CtIP variants were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 100 units/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.5 mg/ml G418 (GIBCO). Lentiviral particles were obtained as previously described (Gomez-

Cabello et al., 2013) using the plasmids listed in Table S2. Cell survival assays were performed as describe previously (Huertas and Jackson, 2009).

Immunofluorescence Microscopy

U2OS cells expressing GFP-CtIP fusions were infected with lentivirus harboring an shRNA targeted against CtIP. After 48 hr, cells were treated with 1 μ M CPT, 10 μ M ETOP, 10 Gy of IR, or mock treated, incubated 1 hr for foci formation, and then collected. Coverslips were treated for 5 min on ice with pre-extraction buffer (25 mM HEPES [pH 7.4], 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose, and 0.5% Triton X-100) and then fixed with 2% paraformaldehyde (w/v) in PBS for 15 min, washed three times with PBS, and blocked for at least 1 hr with 5% fetal bovine serum (FBS) diluted in PBS. Cells were incubated with the adequate primary antibodies (Table S3), diluted in 5% FBS in PBS for 2 hr at room temperature, washed with PBS, and then incubated with secondary antibodies (Table S4) diluted in 5% FBS in PBS for 1 hr at room temperature. Cells were then washed twice with PBS, and coverslips were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole and analyzed using a Nikon NI-E microscope.

Immunoblotting

Extracts were prepared in Laemmli buffer (4% SDS, 20% glycerol, 120 mM Tris-HCl [pH 6.8]), and proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride (Millipore) followed by immunoblotting. Western blot analysis was carried out using the antibodies listed in Tables S3 and S4. Results were visualized using an Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor). To quantify Chk1 phosphorylation, protein abundance was measured using the Li-Cor software, and the ratio between phosphorylated Chk1 and total Chk1 was calculated. Those ratios were then normalized with respect to control cells expressing full-length CtIP.

Immunoprecipitation

HEK293T cells stably expressing GFP-CtIP variants were cotransfected with HALO-BARD1 and SFB-BRCA1 expression vectors (a gift from Ko Sato, St. Marianna University Graduate School of Medicine) and shCtIP (Sigma-Aldrich). At 48 hr after transfection, cells were harvested in a lysis buffer of 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% de Triton X-100, 1 \times protease inhibitors (Escibano-Díaz et al., 2013), 1 \times phosphatase inhibitor cocktail 1 (Sigma). Protein extract (1 mg) was incubated with 20 μ l of packed anti-GFP_M magnetic beads (Chromotek) at 4°C. Beads were then washed three times with lysis buffer, and precipitate was eluted in Laemmli buffer.

SMART

U2OS cells, either wild-type or stably expressing GFP-CtIP variants or depleted of the indicated proteins, were grown in the presence of 10 μ M BrdU (GE Healthcare) for 24 hr. Cultures were then irradiated (10 Gy) and harvested at the indicated time points. DNA combing was performed as previously described with modifications (Michalet et al., 1997). Briefly, cells were embedded in low-melting agarose (Bio-Rad) followed by DNA extraction. To stretch the DNA fibers, silanized coverslips (Genomic Vision) were dipped into the DNA solution for 15 min and pulled out at a constant speed (250 μ m/s). Coverslips were baked for 2 hr at 60°C and incubated directly without denaturation with an anti-BrdU mouse monoclonal (Table S3). After washing with PBS, coverslips were incubated with the secondary antibody (Table S4). Finally, coverslips were mounted with ProLong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and stored at -20°C. DNA fibers were observed with Nikon NI-E microscope and PLAN FLOUR40 \times /0.75 PHL DLL objective. The images were recorded and processed with NIS ELEMENTS Nikon software. For each experiment, a total of 200 DNA fibers was analyzed, and the length of DNA fibers was measured with Adobe Photoshop CS4 Extended version 11.0 (Adobe Systems).

For resection speed, SMART results at different time points were plotted. After doing a linear correlation, the resection rate was calculated as the slope of the line. To compare between treatments, slopes were normalized with respect to control cells expressing full-length CtIP.

Statistical Analysis

Statistical significance was determined with a paired t student test using the PRISM software (Graphpad Software) for all data sets, with the exception of

the slope comparison shown in Figures 3E, 4C, and 4D. In that particular case, the slope comparison was performed as described in Chapter 18 of *Biostatistical Analysis* (Zar, 1984).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes four figures and four tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.076>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.C.-G. performed all of the experiments described. A.L.-S. helped with the analysis by SMART of BRCA1 depletion. The project and SMART method were conceived, designed, and developed by P.H. with the help of A.C.-G. All authors contributed to the discussion of the results. P.H. wrote the paper with the feedback of A.C.-G.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Barroso and Andrés Aguilera for technical advice, Ko Sato for sharing reagents, Veronica Raker for style corrections, and Felix Prado, Sonia Jimeno, and Cristina Cepeda for critical reading of the manuscript. This work was funded by an R+D+I grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2010-14877). A.C.-G. is funded by a PhD fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). A.L.-S. is the recipient of a predoctoral training fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI fellowship).

Received: March 18, 2014

Revised: July 10, 2014

Accepted: August 27, 2014

Published: October 9, 2014

REFERENCES

- Aguilera, A., and Gómez-González, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* 9, 204–217.
- Cao, L., Xu, X., Bunting, S.F., Liu, J., Wang, R.H., Cao, L.L., Wu, J.J., Peng, T.N., Chen, J., Nussenzweig, A., et al. (2009). A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. *Mol. Cell* 35, 534–541.
- Chandramouly, G., Kwok, A., Huang, B., Willis, N.A., Xie, A., and Scully, R. (2013). BRCA1 and CtIP suppress long-tract gene conversion between sister chromatids. *Nat Commun* 4, 2404.
- Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol. Cell* 49, 858–871.
- Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y., and Wu, X. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 283, 7713–7720.
- Chi, Q., Wang, G., and Jiang, J. (2013). The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory. *Physica A* 392, 1072–1079.
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling. *EMBO Rep.* 7, 212–218.
- Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A.D., Feldhahn, N., Resch, W., Oliveira, T.Y., Chait, B.T., et al. (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science* 339, 711–715.
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkáč, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol. Cell* 49, 872–883.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., and Haber, J.E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1292–1303.
- Gomez-Cabello, D., Jimeno, S., Fernández-Ávila, M.J., and Huertas, P. (2013). New tools to study DNA double-strand break repair pathway choice. *PLoS ONE* 8, e77206.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev.* 22, 2767–2772.
- Herrick, J., and Bensimon, A. (1999). Single molecule analysis of DNA replication. *Biochimie* 81, 859–871.
- Huen, M.S., Sy, S.M., and Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 138–148.
- Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 11–16.
- Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 284, 9558–9565.
- Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689–692.
- Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., and Bensimon, A. (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 277, 1518–1523.
- Moreau, S., Morgan, E.A., and Symington, L.S. (2001). Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics* 159, 1423–1433.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* 4, 511–518.
- Nakamura, K., Kogame, T., Oshiumi, H., Shinohara, A., Sumitomo, Y., Agama, K., Pommier, Y., Tsutsui, K.M., Tsutsui, K., Hartsuiker, E., et al. (2010). Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair. *PLoS Genet.* 6, e1000828.
- Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* 436, 1053–1057.
- Raderschall, E., Golub, E.I., and Haaf, T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1921–1926.
- Reczek, C.R., Szabolcs, M., Stark, J.M., Ludwig, T., and Baer, R. (2013). The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. *J. Cell Biol.* 201, 693–707.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509–514.
- Steger, M., Murina, O., Hühn, D., Ferretti, L.P., Walsler, R., Hänggi, K., Lafranchi, L., Neugebauer, C., Paliwal, S., Janscak, P., et al. (2013). Prolyl isomerase PIN1 regulates DNA double-strand break repair by counteracting DNA end resection. *Mol. Cell* 50, 333–343.
- Vaze, M.B., Pelliccioli, A., Lee, S.E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M., and Haber, J.E. (2002). Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol. Cell* 10, 373–385.
- Wang, H., Shi, L.Z., Wong, C.C., Han, X., Hwang, P.Y., Truong, L.N., Zhu, Q., Shao, Z., Chen, D.J., Berns, M.W., et al. (2013). The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet.* 9, e1003277.
- Westmoreland, J., Ma, W., Yan, Y., Van Hulle, K., Malkova, A., and Resnick, M.A. (2009). RAD50 is required for efficient initiation of resection and recombinational repair at random, gamma-induced double-strand break ends. *PLoS Genet.* 5, e1000656.

- Yu, X., and Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9478–9486.
- Yu, X., Fu, S., Lai, M., Baer, R., and Chen, J. (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev.* 20, 1721–1726.
- Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460–463.
- Zar, J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*, Second Edition (Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall).
- Zhou, Y., Caron, P., Legube, G., and Paull, T.T. (2014). Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res.* 42, e19.
- Zierhut, C., and Diffley, J.F. (2008). Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J.* 27, 1875–1885.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.

Neddylation inhibits CtIP-mediated resection and regulates DNA double strand break repair pathway choice

Sonia Jimeno^{1,2,†}, María Jesús Fernández-Ávila^{1,†}, Andrés Cruz-García^{1,2},
Cristina Cepeda-García¹, Daniel Gómez-Cabello¹ and Pablo Huertas^{1,2,*}

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), 41092 Sevilla, Spain and

²Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, 41080 Sevilla, Spain

Received July 18, 2014; Revised December 09, 2014; Accepted December 11, 2014

ABSTRACT

DNA double strand breaks are the most cytotoxic lesions that can occur on the DNA. They can be repaired by different mechanisms and optimal survival requires a tight control between them. Here we uncover protein deneddylation as a major controller of repair pathway choice. Neddylation inhibition changes the normal repair profile toward an increase on homologous recombination. Indeed, RNF111/UBE2M-mediated neddylation acts as an inhibitor of BRCA1 and CtIP-mediated DNA end resection, a key process in repair pathway choice. By controlling the length of ssDNA produced during DNA resection, protein neddylation not only affects the choice between NHEJ and homologous recombination but also controls the balance between different recombination subpathways. Thus, protein neddylation status has a great impact in the way cells respond to DNA breaks.

INTRODUCTION

DNA is constantly challenged by physical and chemical threats that compromise its structure and function (1). Those alterations are known as DNA lesions and have to be eliminated in a process called DNA repair. Faithful restoration of the DNA molecule ensures that genomes remain stable enough during the lifetime of an organism to avoid compromising viability. To facilitate the repair of DNA, several molecular machineries have to be coordinated with the rest of the cellular metabolism. This is particularly true when repairing DNA molecules in which both strands have been broken, the so-called DNA double strand breaks (DSBs). So, upon DSB appearance a complex process known as the DNA damage response (DDR) is activated in order to sense and repair the breaks, but also to coordinate cell cycle pro-

gression, transcription, cellular metabolism, etc. (2,3). The DDR is a fast response that relies mainly in the alterations of the profiles of post-translational modifications of many different proteins, such as phosphorylation, neddylation, ubiquitylation or sumoylation (2,4).

In strictly DNA repair terms, DSBs can be repaired by a variety of pathways. Broadly, they can be divided considering the amount of homology and DNA end processing that are required during the repair process (5). Non-homologous end-joining (NHEJ) is the fast and simple religation of two DNA ends that involve no processing of the break and no homology (6). However, the ends can be processed through a mechanism known as DNA end resection, a 5' to 3' nucleolytic degradation of one strand of the broken DNA end (5). Such a process produces single-stranded DNA (ssDNA) 3' overhang tails. This DNA processing can expose short (3–5 bp long) homologous sequences that can anneal facilitating the repair in a process called microhomology mediated end-joining (MMEJ; (7)). Also, DNA end resection is essential for a more complex type of repair of DSBs called homologous recombination (HR), in which long homologous sequences are used. There are different subtypes of HR repair (for review see (8)), depending if the homologous sequences are in the same molecule and in direct orientation (single strand annealing, SSA); the 3' overhang is used to prime a replication that copies the whole chromosomal template (break-induced replication, BIR); the newly synthesized DNA is displaced from the template and reanneals to seal the break (synthesis-dependent strand annealing, SDSA); or a proper Holliday junction is formed (DSB recombination, DSBR). Thus, a broken DNA molecule can basically be repaired by six different repair mechanisms that have significantly different outcomes (1,5–8): NHEJ is fast, but the lack of a proofreading activity that ensures that the two pieces of DNA joint were originally adjacent makes it a mechanism prone to cause chromosomal rearrangements; MMEJ shares the same problems as NHEJ, plus it always

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 954 467 667; Fax: +34 954 461 664; Email: pablo.huertas@cabimer.es

†These authors contributed equally to the paper as first authors.

causes deletions at the side of the break; SSA causes the disappearance of one of the repeats and the intervening region; BIR results in a loss of heterozygosity. SDSA and DSBR also contribute to chromosomal rearrangements when homologous sequences different to the sister chromatid are used. Thus, the regulation between all repair pathways is essential to minimize genomic instability.

The first control point for DNA repair pathway choice is the processing of the breaks. DNA end resection inhibits NHEJ and allows all the other pathways (5). So, DNA end resection is considered a primary point of DSB repair pathway choice. In eukaryotes, DNA end resection happens in two phases: a slow initial phase, catalyzed by the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex in mammals (5), followed by a second and fast phase catalyzed by either the exonuclease Exo1 or the helicase Bloom Syndrome Protein (BLM). To initiate the process of DNA end resection, a cell cycle activation step is required in the form of the phosphorylation of the accessory protein CtIP (9,10).

Protein neddylation consists in the conjugation of the small peptide NEDD8 to protein lysines (11) in a process analog to the binding of ubiquitin or SUMO during ubiquitylation and sumoylation, respectively. Neddylation is accomplished by the subsequent action of three enzymatic activities, E1, E2 and E3 (11). First, the NEDD8 peptide is conjugated to its E1 (a dimer of UBA1 and NAE1) in an adenosine triphosphate-dependent manner to form a high-energy intermediate. Then, NEDD8 is transferred to an E2 enzyme (either UBE2M or UBE2F). The E2 will conjugate next NEDD8 to the target substrate with the help of an E3. At least three E3 enzymes, RBX1, RBX2 and RNF111, are involved in protein neddylation (12,13). Finally, the NEDD8 peptide can be removed from proteins by the activity of deneddylases. In the cell, there are two main deneddylases: a large complex known as the COP9 signalosome (CSN) and the solo acting enzyme NEDP1 (also known as SENP8) (14,15). The main substrates of protein neddylation are a family of proteins known as cullins (16), but other have been described (13,17–18). As for ubiquitylation and sumoylation, neddylation of cullins and other proteins have been involved in the DDR (13,17,19–20). Local neddylation of proteins at the vicinity of broken DNA has been shown to happen with a very fast kinetic (13,17). Moreover, DDR activation seems to be dependent on the neddylation of several histones and ubiquitin ligases RNF8 and RNF168, both essential for checkpoint activation. In addition, blocking the neddylation of Cullin 2 leads to a delayed DDR (20) and inactivation of Cullin 4 associates with a defective DNA repair (20). As for neddylation, deneddylation has also been linked with the DDR. Indeed, the COP9 signalosome (CSN) is an ATM substrate (21) and NEDP1 is responsible for elimination of RNF168 neddylation (17). Despite this relationship, little is known about the impact of protein neddylation on DNA resection and the choice between different DSB repair mechanisms.

In order to better characterize the regulatory network that controls the choice between DSB repair pathways, we took advantage of our recently published SeeSaw Reporter (SSR) that measures the balance between NHEJ and HR (22). Using a collection of small molecule inhibitors, we discovered that protein neddylation controls the choice be-

tween different repair pathways. We found that such control is dependent on the NEDD8 E2 UBE2M and E3 RNF111. RNF111/UBE2M-dependent protein neddylation has been shown to occur rapidly and locally after DNA damage (13,17). Our data show that such modification inhibits CtIP-mediated DNA end resection, suggesting that a second wave of protein deneddylation is required to activate HR. Mechanistically, we found that CtIP and its partner BRCA1 constitutively interact with neddylated proteins, and the overall neddylation status in the cell controls the interaction between them. Finally, we demonstrate that protein neddylation does not only control the choice between HR and NHEJ, but also affects the balance between different HR subpathways, specially the error-prone SSA. Thus, neddylation is a key regulatory process in the maintenance of genomic stability.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, lentiviral infection, transfection and cell survival

U2OS were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 2-mM L-Glutamine (Sigma-Aldrich), 100-units/ml penicillin and 100- μ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.5-mg/ml G418 (Gibco). Lentiviral particles were obtained as previously described (22). Cell survival assays were performed as described previously (10). Concentration of the different inhibitors used is shown in Supplementary Table S1. Information about the shRNA and siRNA used in this paper can be found in the Supplementary information. Transfection of HA-NEDD8 (Addgene) was performed using Fugene HD (Promega), following the manufacturer instructions.

Gene conversion, SSA, NHEJ and recombination/NHEJ balance analysis

U2OS cells bearing a single copy integration of the reporters DR-GFP (Gene conversion; (23)), SA-GFP (SSA; (24)), EJ5 (NHEJ; (24)) or SSR (NHEJ/recombination balance; (22)) were used to analyze the different DSB repair pathways. In all cases, 4000 cells were plated in 96-well plates. One day after seeding, they were infected with a lentivirus harboring an I-SceI and labeled with Blue Fluorescent Protein (BFP) (25) using an M.O.I (multiplicity of infection) of 5. Six hours after infection the same volume of fresh medium was added. For the SSR screening the small molecule inhibitors were added at this point (see Supplementary information for concentrations). Cells were grown during 48 h, fixed with 4% paraformaldehyde, stained with Hoechst and washed with phosphate buffered saline (PBS) prior visualization with a fluorescent microscope for blue, green and, in the case of the SSR, red fluorescence. The repair frequency was calculated as the percentage of blue cells expressing Green Fluorescent Protein (GFP) for the DR-GFP (Gene conversion), SA-GFP (SSA), EJ2 (NHEJ) and EJ5 (MMEJ) reporters. For the HR/NHEJ balance, the ratio between green and red cells in each condition was calculated as published (22). To facilitate the comparison between experiments, this ratio was normalized with a control

treated with dimethyl sulfoxide (DMSO). Those conditions that skew the balance toward an increase in NHEJ repair result in fold increase below 1. On the contrary, a net increase of this ratio (values above 1) represents an imbalance of the SSR toward HR. Data represent a minimum of three sets of duplicated experiments.

Immunofluorescence microscopy

U2OS cells depleted for CtIP, RNF111 or UBE2M and/or were treated with MLN4924 or DMSO for 1 h as indicated in each case (see Supplementary Tables S2 and S3 for siRNAs and shRNAs used in this study). Then, cells were treated with ionizing radiation (IR; 10 Gy) or mock treated, incubated 1 h for foci formation and then collected. For Replication Protein A (RPA) foci, coverslips were treated for 5 min on ice with pre-extraction buffer (25-mM Hepes, pH 7.4, 50-mM NaCl, 1-mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 3-mM MgCl₂, 300-mM sucrose and 0.5% Triton X-100), then fixed with 4% paraformaldehyde (w/v) in PBS for 15 min. For RIF1 foci the treatment was carried out at room temperature, the coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde (w/v) in PBS for 15 min, washed three times with PBS and incubated with PBS+0.25% Triton-X100 for 15 min. Then, coverslips were washed three times with PBS and blocked for at least 1 h with 5% fetal bovine serum (FBS) diluted in PBS. Cells were incubated for 8 h at 4°C with antibodies against RPA32 or RIF1 (see Supplementary information) diluted in 5% FBS in PBS, washed twice with PBS and then incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody (listed in Supplementary information) diluted in 5% FBS in PBS. Coverslips were then washed twice with PBS, mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and analyzed using a Nikon NI-E microscope.

RPA foci formation was scored as the percentage of cells that have RPA foci from the total number of cells. See Supplementary Figure S1 for an example of cells positive and negative for RPA foci. The number of RIF1 foci per cell was calculated using the software Metamorph as the number of dots present in the nucleus (defined by DAPI) on those cells that show H2AX staining.

Immunoblotting

Extracts were prepared in Laemmli buffer (4% sodium dodecyl sulphate (SDS), 20% glycerol, 120-mM Tris-HCl, pH 6.8) and proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to Polyvinylidene fluoride (PVDF; Millipore) followed by immunoblotting. Western blot analysis was carried out using the antibodies listed in the Supplementary information. Results were visualized and quantified using an Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor).

Immunoprecipitation

U2OS cells were harvested in lysis buffer (50-mM Tris-HCl, pH 7.4, 100-mM NaCl, 1-mM EDTA, 0.2% de Triton X-100, 1X protease inhibitors (Roche), 1X phosphatase

inhibitor cocktail 1 (Sigma), NEM 3125 mg/ml (Calbiochem)). Protein extract (1 mg) was incubated at 4°C with 10 µl of anti-NEDD8 antibody (for NEDD8 immunoprecipitation) or with 10 µl of a 1:1 combination of two BRCA1 antibodies (BRCA1 immunoprecipitation; see Supplementary information for details) and with magnetic protein A Dynabeads (Novex). Beads were then washed three times with lysis buffer, and the precipitate was eluted in 25 µl of Laemmli buffer.

Single molecule analysis of resection tracks

Single molecule analysis of resection tracks (SMART) was performed as previously described (26). U2OS cells, either treated with MNL4924 or DMSO, were grown in the presence of 10-µM bromodeoxyuridine (BrdU; GE Healthcare) for 24 h. Cultures were then irradiated (10 Gy), incubated 1 h and then harvested and embedded in low-melting agarose (Bio-Rad) followed by DNA extraction. To stretch the DNA fibers, silanized coverslips (Genomic Vision) were dipped into the DNA solution for 15 min and pulled out at a constant speed (250 µm/s). Coverslips were baked for 2 h at 60°C and incubated directly without denaturation with an anti-BrdU mouse monoclonal (Supplementary Table S4). After washing with PBS, coverslips were incubated with the secondary antibody (Supplementary Table S5). Finally, coverslips were mounted with ProLong® Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and stored at -20°C. DNA fibers were observed with Nikon NI-E microscope and PLAN FLOUR40×/0.75 PHL DLL objective. The images were recorded and processed with NIS ELEMENTS Nikon software. For each experiment, at least 200 DNA fibers were analyzed, and the length of DNA fibers was measured with Adobe Photoshop CS4 Extended version 11.0 (Adobe Systems Incorporated).

Statistical analysis

Statistical significance was determined with a paired *t* student test using the PRISM software (Graphpad Software, Inc.). Statistically significant difference was labeled with one, two or three asterisks if $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$, respectively. A Mann-Whitney test was used to detect statistically significant differences between the populations of resected DNA end detected by SMART.

RESULTS

Screening of small inhibitors that alter the NHEJ/HR ratio

The balance between NHEJ and HR is essential for optimal DNA repair. We have previously designed a reporter to search for factors that alter such balance (SSR; Figure 1A; (22)). Briefly, upon creating a DSB using the nuclease I-SceI, the reporter can be repaired by either NHEJ, rendering an active GFP gene, or by a subtype of HR known as SSA, rendering an active RFP gene. So, the balance between NHEJ and HR can be calculated as the ratio between green and red cells. To look for processes that might affect the choice between DSB repair pathways, we analyzed the effect of a short list of small molecules in the SSR system (Figure 1B). As seen in the figure, we found

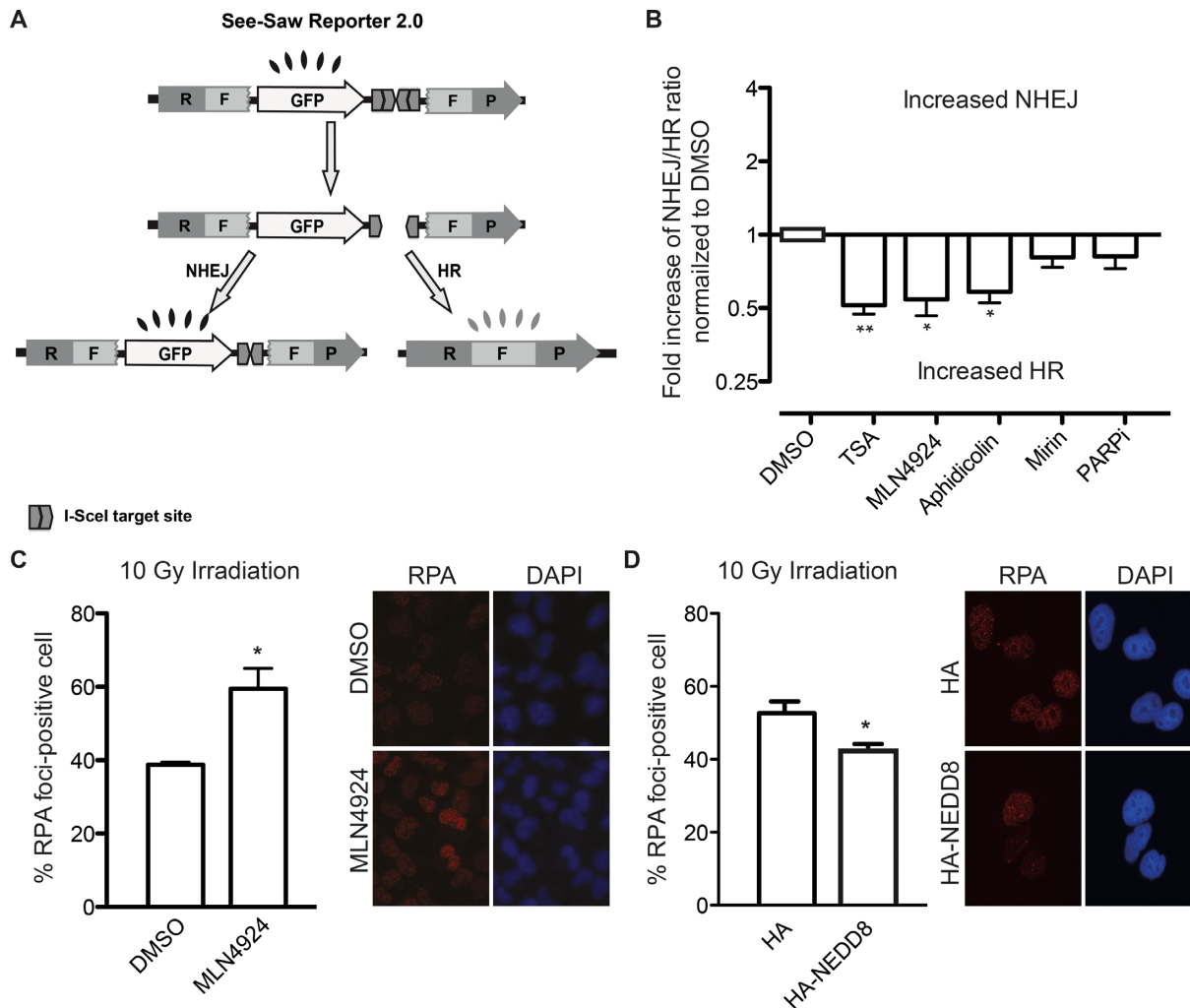


Figure 1. Protein neddylation inhibits CtIP-mediated DNA-end resection and HR. (A) Schematic representation of the SeeSaw 2.0 reporter. A GFP gene is flanked by two truncated parts of RFP gene (RF and FP) sharing 302 bp of homologous sequence. Two I-SceI-target sites were cloned at the 3' end of the GFP gene in opposite orientation. After generation of a DSB by I-SceI expression, the damage may be resolved by NHEJ, thus cells will express the GFP protein, or using the homologous sequence by HR, creating a functional RFP gene. (B) Effect of different inhibitors in the SSR 2.0. To measure the deviation from the balance between NHEJ and HR, the ratio between green versus red cells in each condition was calculated. To facilitate the comparison between experiments, this ratio was normalized with control cells treated with DMSO. Those conditions that skew the balance toward an increase NHEJ result in fold increase above 1. On the contrary, a net increase of this ratio (values below 1) represents an imbalance of the SSR toward HR. Data represent a minimum of three sets of duplicated experiments. (C) DNA-end resection efficiency measured as the percentage of cells positive for RPA foci. Cells expressing a control shRNA (shScr) or an shRNA against CtIP (shCtIP) were pretreated with 0.2 μ M of MLN4924 (MLN) or DMSO for 1 h, then irradiated (10 Gy) and incubated for an additional hour in the presence of the inhibitor. Bars represent the average and standard deviation of three independent experiments. A representative image of each case is shown. (D) As in (C), but cells transfected with a plasmid bearing an HA-NEDD8 gene or HA as a control. Asterisk represent statistical significance as described in the Methods section.

that TSA, aphidicolin and the use of the neddylation inhibitor MLN4924 skewed the balance toward an increase in HR. Neither Mirin (a MRE11 inhibitor) nor an inhibitor of PARP rendered any effect in this reporter system. Such changes in the SSR ratio do reflect a complex reality in terms of DSB repair pathway choice. In fact, such observations might be explained either by an increase in SSA, a reduction in NHEJ or a combination of both phenomena. It can even reflect a net increase in both pathways but more accentuated for SSA or a decrease in both mechanisms but stronger in NHEJ.

The unbalance toward HR upon neddylation inhibition was surprising. Neddylation, as sumoylation and ubiquity-

lation, has been reported at the sites of breaks (4,13,17,19). However, contrary to the increase in HR observed by neddylation inhibition (Figure 1B), we have previously shown that blocking conjugation of SUMO or ubiquitin skews the NHEJ/HR balance in the opposite direction (22). Thus, we decided to analyze in more detail the role of protein neddylation in the choice between DSB repair pathways.

Neddylation controls CtIP-mediated DNA end resection

Considering that cell cycle is a major control point for DSB repair, we discarded that the effect observed upon the use of the MLN4924 was due to change in cell cycle profile (Supplementary Figure S2). Only long treatments

with MLN4924 changed cell cycle distribution. Thus, we restricted our experiments to short treatments with the inhibitor, unless otherwise specified.

We decided to test if protein neddylation has an impact on DNA end resection, the major control point between NHEJ and HR (5). We observed that the preincubation of cells with MLN4924 increased the number of cells with RPA foci induced by IR (Figure 1C). Thus, this hyper-resection phenotype suggested that protein neddylation acts as an inhibitor of DNA end resection. In agreement, overexpression of NEDD8 rendered the opposite results, i.e. reduced resection as measured by RPA foci (Figure 1D). As seen in Supplementary Figure S3A, a general increase of protein neddylation is observed in such conditions. Both, the increase in RPA foci formation and the increase in general protein neddylation are limited. Thus, although in agreement with our model NEDD8 overexpression skewed the balance toward a mild increase in NHEJ, it was not statistically significant (Supplementary Figure S4).

Such an increase in resected DNA observed by neddylation inhibition was due to a hyperactivation of the canonical pathway, as it disappeared when cells were depleted of CtIP (Figure 2A; for an example of CtIP depletion see Supplementary Figure S3B). Indeed, depletion of endogenous CtIP without expressing any other form of CtIP (Figure 2A, cells transfected with GFP) showed a similar percentage of RPA-foci positive cells regardless of the addition of MLN4924 or the vehicle DMSO. Such effect was clearly dependent on CtIP as was complemented by the expression of a GFP-CtIP transgene, which cannot be targeted by the shRNA (Figure 2A). These data strengthen the idea that protein neddylation might inhibit HR by controlling CtIP-mediated resection.

To analyze the impact of the CtIP-mediated hyper-resection observed upon protein neddylation inhibition, we tested the viability of cells treated with MLN4924 in cells depleted of CtIP or control cells. As seen in Figure 2B, and in agreement with published reports (19), cells were sensitive to chronic treatments with MLN4924 compared with DMSO-treated cells in the absence of any exogenous DNA damage. However, if those cells were also depleted of CtIP, a mild but statistically significant increase in survival was observed (Figure 2B). Thus, neddylation inhibition toxicity was partially due to CtIP-dependent hyper-resection of endogenously aroused DNA breaks. Moreover, CtIP-depleted cells, but not control cells, were less sensitive to ionizing irradiation after a short treatment with MLN4924 (Figure 2C). Thus, our data suggested that the impairment on DNA resection caused by reduction of CtIP levels was partially corrected by the hyper-resection phenotype of neddylation inhibition (Figure 2C).

This observation that protein neddylation negatively regulates CtIP-mediated DNA end resection might explain why MLN4924 treatment skewed the choice between HR and NHEJ toward the former. To prove that the unbalance between HR and NHEJ observed upon neddylation inhibition was caused by excessive CtIP-mediated resection, we measured the balance between both repair pathways using the SSR in cells either mock treated with DMSO or treated with different doses of MLN4924 in combination with or without CtIP depletion. As seen in Figure 2D, shC-

tIP depletion prevents the hyper-recombination phenotype of MLN4924 addition, albeit only partially at higher doses.

CtIP and BRCA1 interaction is controlled by neddylation

In order to understand the molecular mechanism controlling the inhibition of DNA end resection through protein neddylation, we immunoprecipitated neddylated proteins using an anti-NEDD8 antibody. Then, we blotted for proteins that are important for DNA end resection and MLN4924 toxicity such as CtIP and BRCA1. Strikingly, we observed that both CtIP and BRCA1 were co-immunoprecipitated with an anti-NEDD8 antibody but not with a non-related control IgG (Figure 3A). However, when we blotted the same membranes with an anti-NEDD8 neither of those protein bands reacted with the antibody (data not shown). To be sure we were observing an interaction with neddylated proteins, we repeated the immunoprecipitation (IP) upon treatment with MLN4924, and we observed a reduction of the appearance of both CtIP and BRCA1 (Figure 3B; Anti-NEDD8 IP, and 3C). Thus, we conclude that neither CtIP nor BRCA1 is neddylated, or they are neddylated to such a low extent that we could not detect it. However, both of them separately or as a complex interact with neddylated proteins. Considering that protein neddylation is a potent inhibitor of DNA end resection, we decided to analyze the interaction of CtIP and BRCA1 with neddylated proteins after DNA damage. We observed that both CtIP and BRCA1 were readily immunoprecipitated with the NEDD8 antibody in untreated cells, but in both cases the amount immunoprecipitated was reduced after DNA damage (Figure 3D and E). CtIP and BRCA1 physically interact (27) and such interaction facilitates DNA end resection by eliminating RIF1 from the sites of DNA breaks (28,29). In fact, we have recently shown that BRCA1 interaction with CtIP controls the extent of resection at DSBs (26). Indeed, when we immunoprecipitated BRCA1, we observed that the amount of co-immunoprecipitated CtIP increased when protein neddylation was inhibited (Figure 3B and F). More importantly, when neddylation was hampered a sharp decrease in the number of RIF1 foci per cell after irradiation was clearly observed (Figure 3G). Supporting such results, overexpression of NEDD8 caused a mild, but statistically significant, increase of the average number of RIF1 foci per cell (Figure 3H). Thus, our results fit with the idea that some neddylated protein inhibits CtIP and BRCA1 interaction and, therefore, reduces DNA end-resection processivity by hampering the removal of RIF1 from the sites of the break. Moreover, such inhibition is eliminated by the appearance of DNA damage.

The NEDD8 E2 UBE2M and E3 RNF111 block DNA end processing

Our data suggest that protein neddylation is a potent inhibitor of DNA end processing. Previously it has been shown that RNF111, an E3 ligase of the STUbL type, is involved in the DDR by facilitating neddylation and ubiquitylation of several targets (13,30). We analyzed the role of RNF111 in DNA end resection. As for neddylation inhibition with MLN4924 (Figures 1C and 3G), DNA resection was increased upon depletion of RNF111 as observed

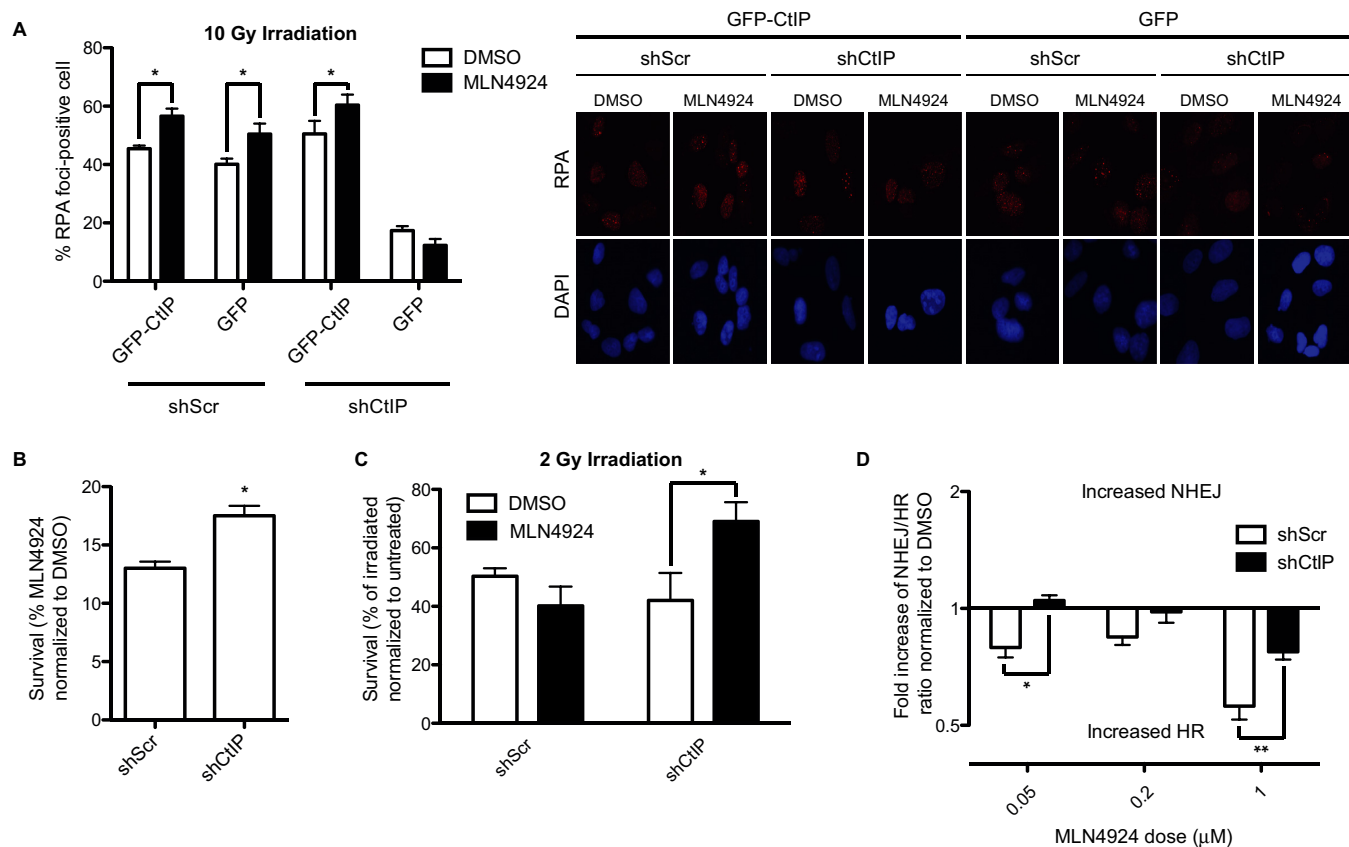


Figure 2. MLN4924 phenotypes in HR/NHEJ balance and DNA resection depend on CtIP. (A) Cells containing an shRNA against CtIP or a control shRNA (shScr) were transfected with an shRNA resistant GFP-CtIP fusion. One hour after MLN4924 or DMSO addition, cells were irradiated and an additional hour later the amount of cells showing RPA foci was scored. Other details are the same as in Figure 1C. (B) Cells expressing an shRNA against CtIP or control were treated for 12 days with MLN4924 0,1 μM or DMSO. The number of colonies formed in the presence of MLN4924 was normalized with the number of colonies in the DMSO control and plotted. Bars represent the average and standard deviation of three independent experiments. (C) Cells expressing the indicated shRNAs were irradiated with 2 Gy, with and without 1-h preincubation with 0.2 μM of MLN4924 or DMSO, then incubated 2 h with the inhibitor and then for 12 days in fresh medium. The number of colonies formed normalized with a control not irradiated is shown. Bars represent the average and standard deviation of three independent experiments. (D) The ratio between HR and NHEJ was calculated with the SSR system in cells expressing the indicated shRNAs and treated with different doses of MLN4924 as indicated. Details are the same as in (B). Statistical significance was calculated with a 2-way ANOVA.

by an increase in RPA foci formation (Figure 4A; for an example of RNF111 depletion see Supplementary Figure S3C). The same results were observed with two different siRNA against RNF111 (Figure 4A). This was accompanied by a reduction in RIF1 foci (Figure 4B). As a consequence, and again in a similar way to MLN4924 addition, the balance between NHEJ and HR was skewed toward an increase in HR using the SSR reporter (Figure 4C). In order to exclude a role of RNF111-mediated ubiquitylation (30) in those phenotypes, we depleted UBE2M, the E2 enzyme that collaborates with RNF111 specifically in protein neddylation (13,20). In agreement with the role of RNF111 in DNA end resection and DSB repair pathway choice being dependent on its neddylation role, we observed an unbalance of DSB repair pathways toward HR (Figure 4D; see Supplementary Figure S3D for depletion of UBE2M). Similar results were observed with two different siRNA targeted against UBE2M. Such unbalance was caused by an increase in RPA foci and a reduction in RIF1 foci (Figure 4E and F). Thus, our results agree with an inhibitory function of RNF111/UBE2M-dependent neddylation at the sites of

breaks over CtIP-mediated resection and HR. Indeed, co-immunoprecipitation of CtIP with BRCA1 was increased in the absence of UBE2M (Figure 4G), suggesting that such a role occurs, at least partially, at the level of BRCA1–CtIP interaction.

Protein neddylation regulates DSB repair pathway choice by affecting the length of resected DNA

Our data suggest that protein neddylation has a major role controlling DNA end resection, hence controlling the appearance of ssDNA. Thus, it might regulate DSB repair pathway choice. To analyze this idea, we tested different DSB repair pathways upon protein neddylation inhibition with MLN4924. First, we used the previously published EJ5 reporter (24) to analyze NHEJ. In this reporter, an active GFP gene is formed when cells repair an I-SceI-induced DSB. As expected, NHEJ was inhibited due to an increase in DNA end resection (Figure 5A). The hyper-resection we observed by an increase on RPA foci can be due to two, not mutually exclusive, scenarios: an increase in the number of

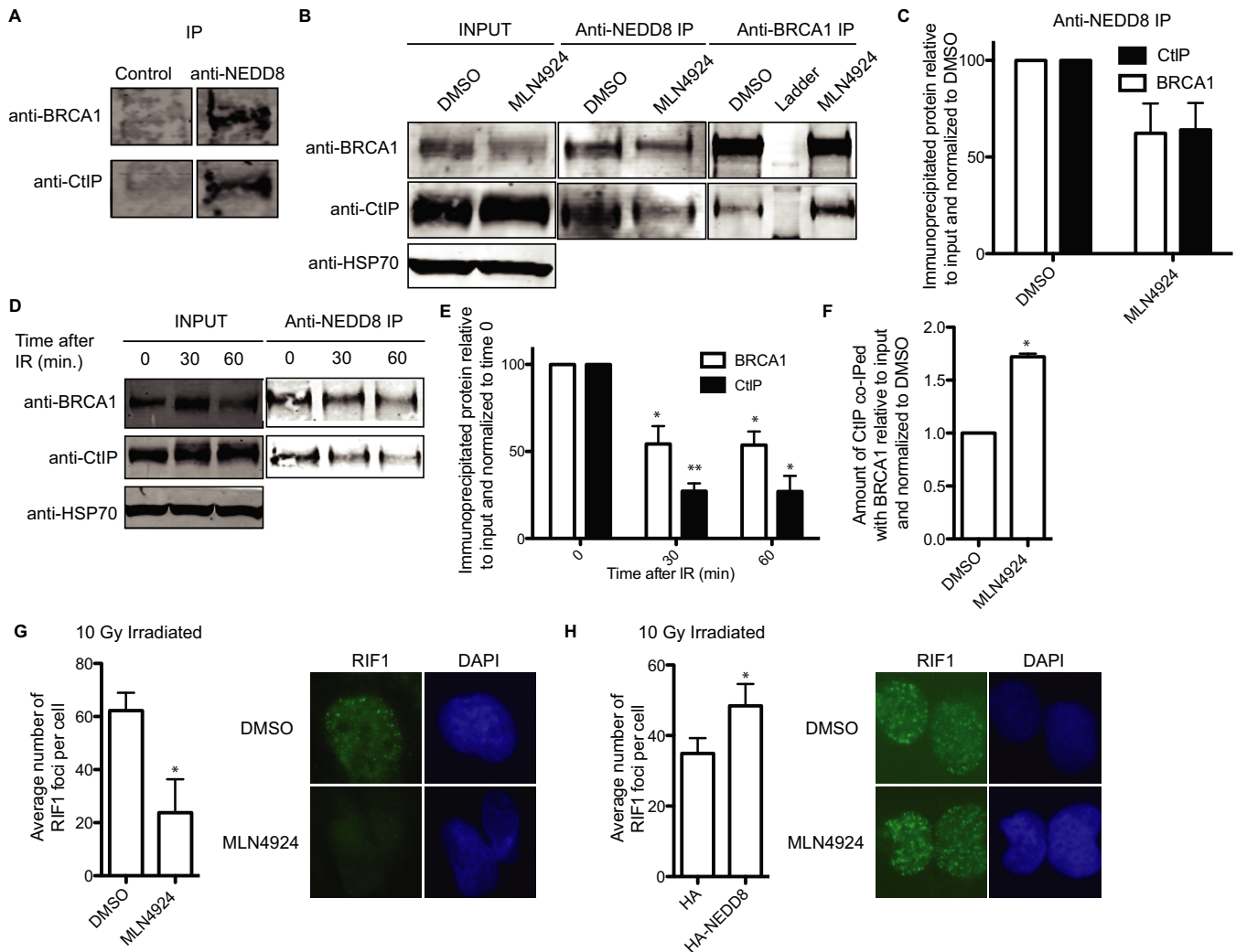


Figure 3. CtIP and BRCA1 complex formation is controlled by their interaction with neddylation. (A) CtIP and BRCA1 interact with neddylation. Protein extracts were divided into two and immunoprecipitated with an anti-NEDD8 antibody or a non-related IgG as a control and blotted with the indicated antibodies. A representative experiment is shown. (B) Protein samples from cells pre-treated with MLN2449 or DMSO were immunoprecipitated with either an anti-NEDD8 antibody or mix of two anti-BRCA1 antibodies and blotted with anti-CtIP or anti-BRCA1. A representative western blot is shown. (C) The amount of immunoprecipitated protein with anti-NEDD8 antibody from (B) was relativized to the input and then normalized to DMSO, taken as 100%. The average and standard deviation from three independent experiments is shown. (D) Cells were irradiated with 10 Gy and protein samples collected at the indicated time points. After immunoprecipitation with an anti-NEDD8 antibody, samples were blotted for CtIP and BRCA1. A representative western blot is shown. (E) Quantification of panel (D). The quantification of the amount of immunoprecipitated protein relative to the input and normalized to time 0 from three independent experiments is shown. (F) Quantification of BRCA1 IP from panel (B). Details are the same as in (C). (G) Average number of RIF1 foci per cells. Cells pre-treated with either DMSO or MLN4924 were immunostained with a RIF1 antibody. The graph represents the average and standard deviation of the number of foci per cell from three independent experiments. A representative image of each case is shown. (H) Same as (G), but cells transfected with HA-NEDD8 or an empty plasmid. The average of six independent experiments is shown.

breaks that are resected (for example due to resection taken place in G1) and/or an increase in the length of resected DNA. Whereas in the first case all homology-driven DNA-repair mechanisms will be favored, in the second case hyper-resection will stimulate those pathways that require longer resection, such as SSA, but would block some HR subpathways if resection reaches outside the homologous stretch of DNA (see the Discussion section for details; Figure 6B). Thus, we tested different HR pathways. As the SSR system used to initiate this study compares NHEJ with SSA, we first used the SA-GFP reporter that measures SSA (24). As expected, we observed that neddylation inhibition increases

this particular repair pathway (Figure 5B). This increase in SSA and reduction in NHEJ explain the unbalance observed with MLN4924 addition with the SSR. Strikingly, not all HR subpathways were affected equally by neddylation inhibition. Indeed, gene conversion was diminished when the DR-GFP reporter (23) was used (Figure 5C). Hence, we hypothesized that neddylation is controlling the extent of resection and not the amount of breaks that are resected, favoring SSA over other HR subpathways. To prove it, we performed a SMART assay, that measures the length of resected DNA at the level of individual fibers (26), with cells treated with MLN4924 or DMSO. Although resec-

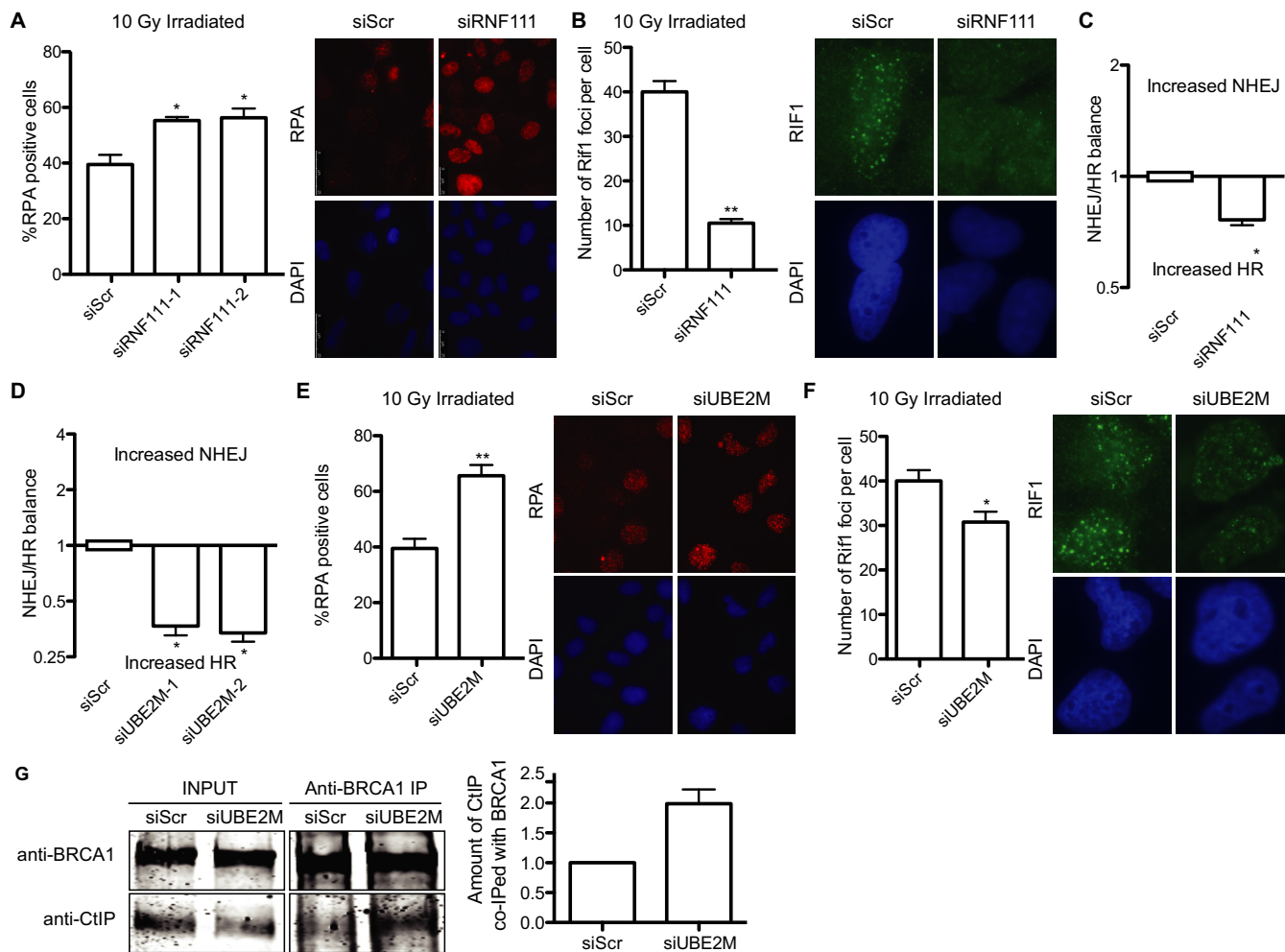


Figure 4. Role of RNF111/UBE2M in DNA end resection and DSB repair pathway choice. (A) Cells depleted for RNF111 or control cells were analyzed for RPA foci formation as described in Figure 1C. A representative immunofluorescence is shown. (B) Same as in (A), but cells were analyzed for RIF1 foci as described in the Materials and Methods section. (C) The balance between HR and NHEJ was calculated with the SSR system in cells transfected with siRNAs against the indicated genes or control siRNA (siScr). Other details are the same as in Figure 1B. (D) Same as in (C), but cells depleted for UBE2M. (E) Same as in (A), but cells depleted for UBE2M. (F) As in (B), but cells depleted for UBE2M. (G) Protein samples from cells previously downregulated for UBE2M were immunoprecipitated with a mix of two anti-BRCA1 antibodies and blotted with anti-CtIP or anti-BRCA1. A representative western blot and the quantification from five independent experiments, made as described in Figure 3, are shown.

tion is an asynchronous process in the population, thus the length of resected DNA is heterogeneous, we observed that treatment with MLN4924 statistically changes the shape of the population (Figure 5D), and resected DNA tracks tend to be longer. In fact, we observed that neddylation inhibition causes a 20% increase in the median length of resected DNA (Figure 5E). Thus we conclude that protein neddylation controls the extent of resection and impacts in the repair mechanism that will be used to repair the break, but not only at the decision between NHEJ and HR but also at the choice between different homology-mediated repair pathways.

DISCUSSION

Here, we have tested several small molecule inhibitors used in clinical trials and related with the DDR for their impact in the choice between NHEJ and HR. We observed that protein deacetylation has a great impact in repair path-

way choice (Figure 1B). TSA skewed the balance toward HR. Affecting NHEJ, HR or both, something we could not discriminate with this genetic tool, could cause this unbalance. TSA inhibits specifically class I and II HDACs, such as HDAC1 and HDAC2, both of them previously related with DNA repair (31). Moreover, TSA has been previously shown to alter chromatin structure in a way that facilitates ATR activation (32). Thus, we propose that TSA effect on DSB repair pathway choice might be due to this altered chromatin structure that facilitates DNA end resection, hence increasing SSA and reducing NHEJ.

Another small molecule that alters the relative ratio between HR and NHEJ was the replication inhibitor aphidicolin (Figure 1B). Aphidicolin inhibits the DNA polymerase and, as a consequence, cells accumulate in S-phase. In agreement with HR being restricted to S and G2 phases of the cell cycle (5), such accumulation in S-phase renders a net increase of HR over NHEJ, as shown in Figure 1B.

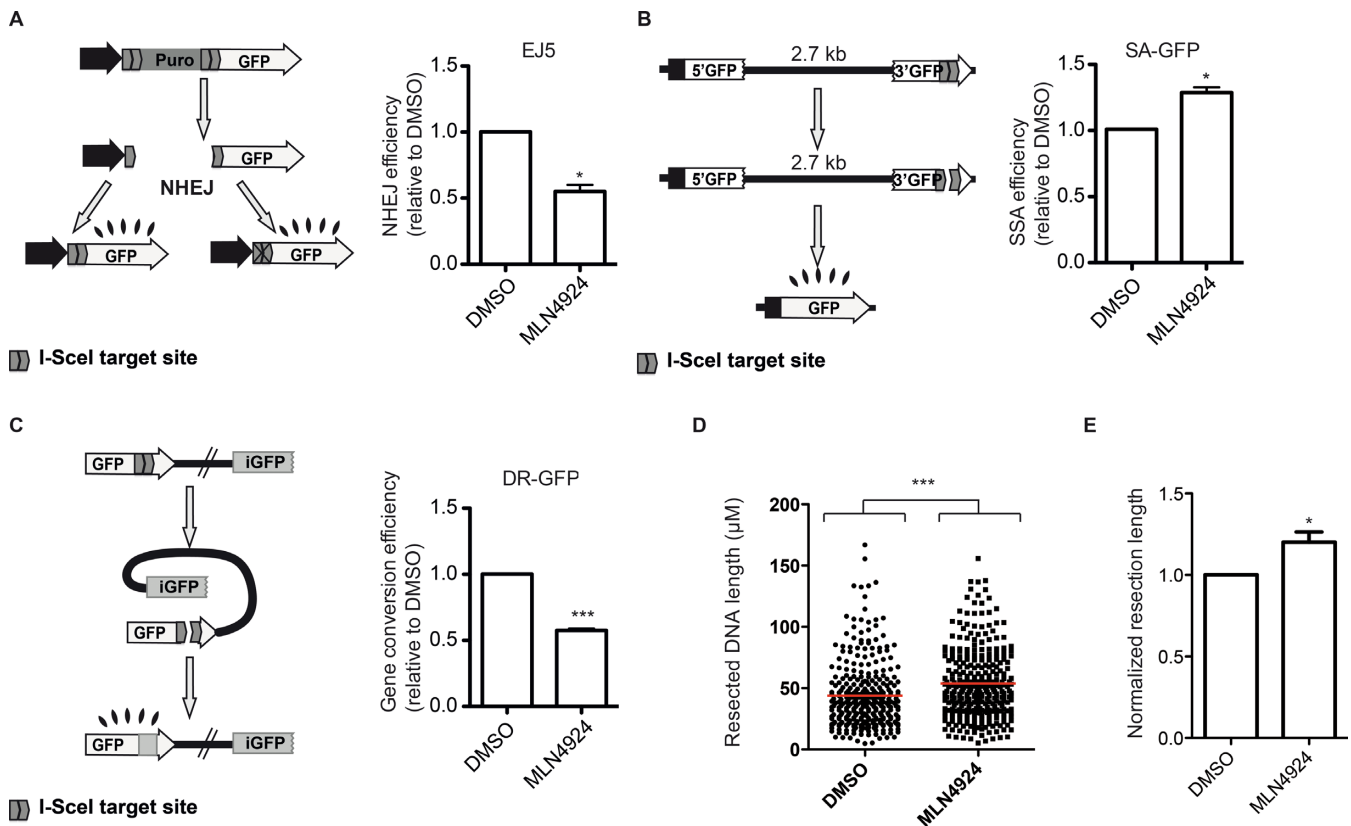


Figure 5. Effect of inhibition of protein neddylation in different DSB repair pathways. (A) In the EJ5 reporter (left), I-SceI-induced DSB can be repaired by NHEJ recreating an active GFP gene, containing or not a functional I-SceI target site. The percentage of green cells was calculated as described in the Materials and Methods section in cells pretreated with MLN4924 or DMSO. This percentage was normalized with the DMSO-treated cells value and plotted. Bars represent the average and standard deviation of three independent experiments. (B) Same as (A), but using the SA-GFP. Such a reporter is formed by two truncated copies of the GFP that, upon SSA, can restore an active GFP gene with the deletion of one of the repeats and the intervening region. Other details are the same as in (A). (C) The DR-GFP reporter is formed by two non-functional copies of the GFP. Gene conversion induced by an I-SceI-mediated DSB restores an active GFP gene. The efficiency of gene conversion was calculated as described in (A) for NHEJ. (D) Single molecule analysis of resection tracks (SMART) of cells treated with DMSO or MLN4924. The length of individual fibers is shown as a scatter plot. A Mann-Whitney test was performed to analyze the statistical difference of both populations. (E) The median length of resected DNA was normalized to DMSO. The average of four independent experiments is shown.

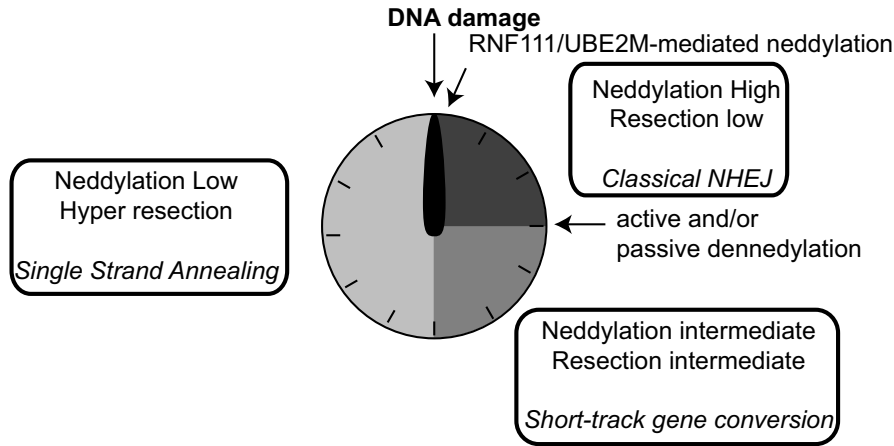
We also tested an inhibitor of PARP due to its established relationship with DSB repair. PARP1 inhibition blocks single strand break repair. Those unrepaired breaks are carried out to the next S-phase where they are converted to DSBs, and HR has been proved essential to repair them (33). Moreover, PARP1 and PARP2 have been directly involved in NHEJ and HR choice (2). In addition, the newest member of the PARP family, PARP3, plays a role in DNA repair by HR and it has been shown to control DNA end resection (34). However, when we used a dose of PARP inhibitor that reduces the activity of all three PARP proteins, we did not see any effect in the SSR system. This might be due to a complex crosstalk between positive and negative effect of different PARP proteins in repair pathway choice.

Previously, others and we have shown that MRE11 is a major regulator of DSB repair pathway, probably due to its role in DNA end resection (2,5,22,35). MRE11 has different catalytic activities, such as 3'-5' and 5'-3' exonuclease and endonuclease. We used Mirin, a known inhibitor of the exonucleolytic activity of MRE11 (36). As there is no effect of Mirin on the SSR, we conclude that the exonuclease activity of Mre11 is not required for DNA end processing, in

agreement with other reports that propose that resection by the MRN complex is based on the release of short ssDNA oligos produced by Mre11 endonuclease activity (35,37).

Ubiquitylation and sumoylation of proteins have a major role in the DDR and DSB repair (4) and we have shown that they mainly facilitate HR to take place (22). So, we tested the effect of another ubiquitin-like protein modifier, NEDD8, in DSB pathway choice. For that we used a neddylation inhibitor MLN4924 (38) and observed that exerted an effect similar to TSA (Figure 1B). Namely, neddylation inhibition, and contrary to blocking conjugation of Ubiquitin and SUMO (22), skewed the balance toward homology-mediated repair. Indeed, protein neddylation seems to be a potent inhibitor of DNA-end resection and HR. In agreement with our results, impairment of neddylation by MLN4924 treatment or depletion of the NEDD8 E2 ligase UBE2M has been shown to increase RAD51 foci (20). There have been some reports involving protein neddylation in the DDR (13,17,19–20). All of them showed a role of protein neddylation at the sites of breaks (13,17). Different histones (H2A, H4) and DDR-related Ubiquitin ligases (RNF8, RNF168) seem to be neddylated

A



B

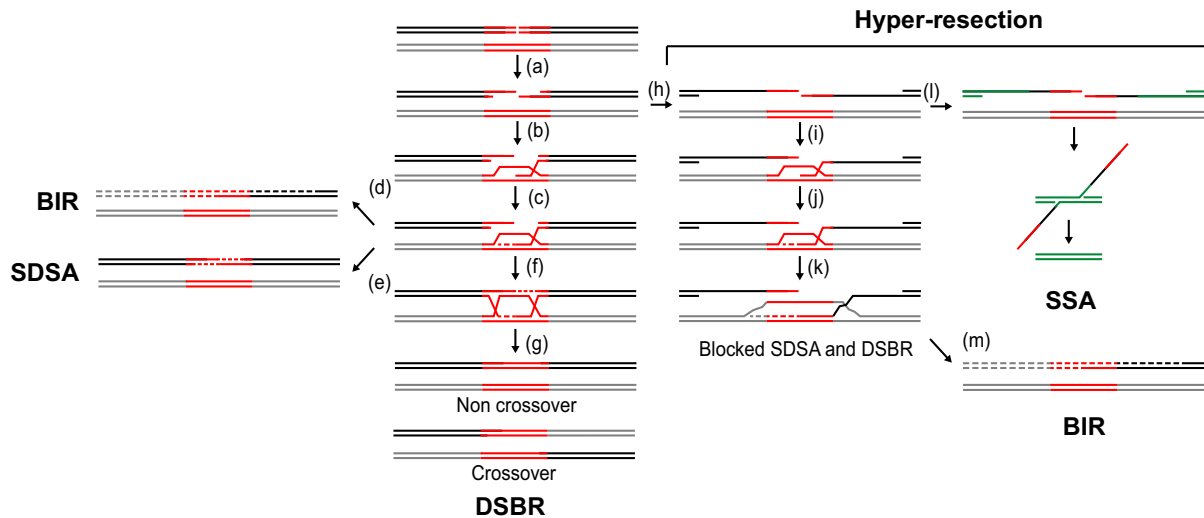


Figure 6. The extent of resection influences the outcome of recombination. **(A)** Neddylated protein acts as a molecular timer for DNA end resection and repair pathway choice. First, high local protein neddylated due to RNF111 activity inhibits resection favoring NHEJ. After that, NEDP1 and CSN activation reduce protein neddylated, allowing some resection to take place. Most breaks will be repaired by short-track gene conversion. Finally, local protein neddylated is sufficiently reduced to allow hyper-resection, favoring repair such as SSA that requires long tracks of resected DNA. **(B)** A broken DNA that is going to be engaged in recombination is resected (a) before the 3' OH overhang is used to invade (b) a homologous region (red lines) located elsewhere (gray lines). DNA synthesis (dashed lines) will use the homologous DNA as a template (c) and it could continue until the end of the chromosome (d; BIR), the newly synthesized DNA can reanneal (e; SDSA recombination subpathway) or it can be ligated with the resected DNA to form two Holliday Junctions (f; DSBR recombination subpathway). Depending on how such structures are resolved, recombination will lead or not to crossovers (g). However, hyper-resection (right) could lead to the exposure of ssDNA regions that are no longer homologous (h; black versus gray lines). In such scenario, although DNA invasion (i) and DNA synthesis (j-k) might happen, a non-homologous DNA would be used as a template for DNA synthesis (k; gray dashed lines). Thus, the newly synthesized DNA can no longer reanneal with the acceptor DNA (black solid line), effectively blocking SDSA and HJ formation. If additional repeated sequences are located nearby (green lines), the break can be sealed using additional recombination pathways such as SSA (l). An alternative would be that DNA synthesis continues until the end of the chromosome (m; BIR).

and such neddylation is required for proper DDR activation. Moreover, neddylation of specific cullins also impacts on the response to DNA damage (20). Our data suggest that one or several unknown proteins neddylated in a UBE2M-dependent manner limit the length of resected DNA by blocking the interaction between CtIP and BRCA1 (Figures 3 and 4G), effectively hampering RIF1 removal from damaged chromatin (Figure 3). This hypothesis agrees with the idea that CtIP–BRCA1 interaction modulates the extent and rate of DNA-end resection (26). We have not been able to observe neddylation of either CtIP or BRCA1, thus we propose that some unknown factor is affecting their interaction when is conjugated to NEDD8. One likely candidate is RNF168 that is known to be neddylated (17); its recruitment to damaged DNA is neddylation dependent (13) and controls BRCA1 retention at sites of DSBs (39). However, we cannot discard the contribution of other neddylated factors, including Cullins. Indeed, a relationship between CUL7 and CtIP has been recently shown in terms of pathology, as specific mutations in either gene are associated with primordial dwarfism with similar phenotypes (40,41). Although our data support that neddylation inhibits CtIP-mediated resection, we cannot discard that some of the observed phenotypes depend also on putative roles of neddylation in other steps of HR, such as the BLM/EXO1-dependent long-range resection, the strand annealing reaction, etc.

Previously reported neddylation at the sites of damaged DNA is dependent on the activity of RNF111 (13,17). RNF111 activity increases upon DNA damage and acts locally in the vicinity of the breaks. RNF111 and NEDD8 are recruited fast to the sites of breaks, with a peak at 10 min after DNA damage induction (13). After that, its accumulation fades slowly with time. Thus, local protein neddylation is indeed a quick response that fits with a role with a fast DNA repair such as NHEJ. Although we cannot exclude a role of the ubiquitylation function of RNF111 in the phenotypes observed, the fact that similar effects are observed with UBE2M depletion leads us to propose that the neddylation activity of RNF111/UBE2M is involved in DNA resection, hence HR, locally (Figure 4). Qualitatively RNF111 and UBE2M depletion showed similar phenotypes (Figure 4), but the differences in magnitude might suggest that both RNF111 and UBE2M have additional and independent roles controlling DNA end resection, something we cannot discard. In agreement with the general neddylation status controlling DNA end processing, overexpression of NEDD8 by itself reduces DNA end resection (Figure 1D). So, we propose that protein neddylation might regulate DSB repair acting as a molecular timer (Figure 6A). Early after DSB appearance, RNF111 accumulation would hamper DNA end resection favoring NHEJ. Later, neddylated proteins will lose NEDD8 due to passive and active mechanisms. On the one hand, RNF111 will be excluded from damaged chromatin (13). On the other hand, the action of the CSN complex and NEDP1 might actively contribute to protein deneddylation. In agreement with this model, it has been shown that both deneddylase activities are activated as a response to DNA damage. First, two subunits of the main deneddylase activity, the COP9 signalosome (CSN), are known to be an ATM substrate (21). Also,

RNF168 is first neddylated after DNA damage, but this neddylation is transient and starts to drop after 30 min due to the action of the deneddylase NEDP1 (17).

This neddylation-dependent molecular timer will regulate the type of DSB repair that will take place by controlling the extent of DNA end resection (Figures 5D and 6). This agrees with neddylation modulating CtIP–BRCA1 interaction that we have shown controls the length of resected DNA (26). First, the accumulation of RNF111-mediated neddylation will favor classical NHEJ. Some of those breaks will not be suitable for NHEJ, probably due to modification of the DNA ends and will remain unrepaired longer. As soon as protein neddylation starts to disappear, probably by both RNF111 eviction and CSN and NEDP1 activation, some resection of the break will take place. This limited processing will ‘clean’ the DNA ends and might activate short track MMEJ. Even then some breaks might stay unrepaired. Further protein deneddylation of proteins will facilitate CtIP and BRCA1 interaction, increasing resection processivity by facilitating RIF1 removal and the length of resected DNA. The exposed ssDNA will be engaged in HR.

During recombination with an ectopic sequence, as in the recombination measured by the DR-GFP reporter, it is essential that resection is limited within the homolog region (Figure 6B). Only then, non-mutagenic subtypes of recombination such as DSBR and SDSA can take place (Figure 6B, a–g). However, in the complete absence of protein neddylation, as with MLN4924 treatment, hyper-resection will occur, i.e. resected DNA will be longer (Figure 6B, h). Then, both DSBR and SDSA are effectively blocked (Figure 6B, i–k). This explains our observation that short track gene conversion with the DR-GFP reporter is reduced upon inhibition of protein neddylation (Figure 5C). In agreement, RNF111 and UBE2M depletion have also been shown to reduce gene conversion on the DR-GFP reporter despite the later increasing RAD51 foci formation (13,20). Thus, hyper-resection caused by lack of protein neddylation will reduce not only NHEJ but also short-track gene conversion, and will switch the repair profile toward pathways that are favored by long resected tracks such as SSA (Figure 6B, l). Additionally, BIR might happen independently of the extent of resected DNA (Figure 6B, d and m). In any case, hyper-resection favors mutagenic recombination pathways and might potentially lead to deletions or loss of heterozygosity.

In principle, this limitation in the extent of resected DNA required for gene conversion will not apply to recombination with the sister chromatid, as the donor and acceptor molecules are completely identical. However, even in this case hyper-resection will reduce the chances of the newly synthesized DNA to catch up with the resected 5′ end to form an HJ (42). Moreover, it will increase the probability of uncovering repeated sequences that can be the substrate for an SSA-type of recombination. Thus, complete deneddylation, such as the one obtained with MLN4924 addition, albeit not completely blocking gene-conversion when the sister chromatid is used as a template, will facilitate the mutagenic SSA subpathway even in this condition. Hence, we propose that protein neddylation controls DSB repair pathway choice, the decision not only between NHEJ and HR but also between different recombination subpathways.

Accordingly with previous results and our observations, we propose that a wave of protein neddylation and deneddylation controls the timing of DNA end resection, thus establishing a temporal organization between different repair types.

This relationship between protein neddylation and DSB repair can explain the potent anticancer activity showed by MLN4924 in pre-clinical studies (38). Moreover, considering that HR is defective in many human tumors, it is worth to speculate that MLN4924 will be especially successful in treating those cancers. In them, MLN4924 will channel endogenous DNA breaks toward the impaired HR repair. Thus, we speculate that HR-deficient tumors might be hypersensitive to MLN4924. However, this will apply only to those cancer cells defective in HR steps that take place after DNA end resection. On the contrary, our data suggest that cells impaired in DNA end resection, such as depleted for CtIP, are resistant to MLN4924 treatment (Figure 2B). Interestingly, a reduction of MLN4924 toxicity has also been observed when other proteins involved in DNA end resection such as BLM or BRCA1 are depleted (43,44). In addition, our data suggest that in resection-deficient backgrounds MLN4924 protects cells from irradiation (Figure 2C). Thus, we postulate that MLN4924 treatment in tumors with reduced amounts of resection proteins such as CtIP and BRCA1 will reduce the efficiency of radiotherapy. As both proteins are known to be downregulated in certain tumors (45,46), it will be important to know the genetic contribution of different recombination genes to specific tumors to evaluate the potential effect of MLN4924 as an anticancer drug.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Yossi Shiloh, Michal Meir and Yael Ziv for critical reading of the manuscript.

Authors' Contribution: M.J.F.A. and D.G.C. performed the screening with the inhibitors with the SSR system. S.J. and M.J.F.A. did the rest of the experimental work with the help of CCG for the immunoprecipitation and ACG for the resection. P.H. conceived, designed and developed the project with the help of S.J. All authors contributed to the discussion of the results. P.H. wrote the paper, with the feedback of the rest of the authors.

FUNDING

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [SAF2010-14877]; European Research Council (ERC) Starting Grant [DSBRECA]. Funding for open access charge: ERC Starting Grant [DSBRECA].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 204–217.
2. Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell*, **40**, 179–204.
3. Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**, 1071–1078.
4. Jackson, S.P. and Durocher, D. (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol. Cell*, **49**, 795–807.
5. Huertas, P. (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 11–16.
6. Lieber, M.R. (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.*, **283**, 1–5.
7. McVey, M. and Lee, S.E. (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.*, **24**, 529–538.
8. Heyer, W.D., Ehmsen, K.T. and Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, **44**, 113–139.
9. Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A. and Jackson, S.P. (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature*, **455**, 689–692.
10. Huertas, P. and Jackson, S.P. (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9558–9565.
11. Rabut, G. and Peter, M. (2008) Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.*, **9**, 969–976.
12. Huang, D.T., Ayrault, O., Hunt, H.W., Taheriboy, A.M., Duda, D.M., Scott, D.C., Borg, L.A., Neale, G., Murray, P.J., Roussel, M.F. *et al.* (2009) E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol. Cell*, **33**, 483–495.
13. Ma, T., Chen, Y., Zhang, F., Yang, C.Y., Wang, S. and Yu, X. (2013) RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol. Cell*, **49**, 897–907.
14. Hanns, R. and Dubiel, W. (2011) COP9 signalosome function in the DDR. *FEBS Lett.*, **585**, 2845–2852.
15. Mendoza, H.M., Shen, L.N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B. and Hay, R.T. (2003) NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25637–25643.
16. Duda, D.M., Scott, D.C., Calabrese, M.F., Zimmerman, E.S., Zheng, N. and Schulman, B.A. (2011) Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 257–264.
17. Li, T., Guan, J., Huang, Z., Hu, X. and Zheng, X. (2014) RNF168-mediated H2A neddylation antagonizes its ubiquitination and regulates DNA damage repair. *J. Cell Sci.*, **127**, 2238–2248.
18. Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T. and Lane, D.P. (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, **118**, 83–97.
19. Yang, D., Tan, M., Wang, G. and Sun, Y. (2012) The p21-dependent radiosensitization of human breast cancer cells by MLN4924, an investigational inhibitor of NEDD8 activating enzyme. *PLoS one*, **7**, e34079.
20. Cukras, S., Morffy, N., Ohn, T. and Kee, Y. (2014) Inactivating UBE2M impacts the DNA damage response and genome integrity involving multiple Cullin ligases. *PLoS one*, **9**, e101844.
21. Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R. III, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y. *et al.* (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, **316**, 1160–1166.
22. Gomez-Cabello, D., Jimeno, S., Fernandez-Avila, M.J. and Huertas, P. (2013) New tools to study DNA double-strand break repair pathway choice. *PLoS one*, **8**, e77206.
23. Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N. and Jasin, M. (2001) Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.*, **15**, 3237–3242.
24. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. and Stark, J.M. (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.*, **4**, e1000110.
25. Certo, M.T., Ryu, B.Y., Annis, J.E., Garibov, M., Jarjour, J., Rawlings, D.J. and Scharenberg, A.M. (2011) Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat. Methods*, **8**, 671–676.
26. Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A. and Huertas, P. (2014) BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep*, **9**, 451–459.

27. Yu, X. and Chen, J. (2004) DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9478–9486.
28. Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D. and Boulton, S.J. (2013) RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol. Cell*, **49**, 858–871.
29. Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D. *et al.* (2013) A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol. Cell*, **49**, 872–883.
30. Poulsen, S.L., Hansen, R.K., Wagner, S.A., van Cuijk, L., van Belle, G.J., Streicher, W., Wikstrom, M., Choudhary, C., Houtsmuller, A.B., Marteijn, J.A. *et al.* (2013) RNF111/Arkadia is a SUMO-targeted ubiquitin ligase that facilitates the DNA damage response. *J. Cell Biol.*, **201**, 797–807.
31. Miller, K.M., Tjeertes, J.V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S. and Jackson, S.P. (2010) Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1144–1151.
32. Murga, M., Jaco, I., Fan, Y., Soria, R., Martinez-Pastor, B., Cuadrado, M., Yang, S.M., Blasco, M.A., Skoultchi, A.I. and Fernandez-Capetillo, O. (2007) Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J. Cell Biol.*, **178**, 1101–1108.
33. Lord, C.J. and Ashworth, A. (2008) Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**, 363–369.
34. Beck, C., Boehler, C., Barbat, J.G., Bonnet, M.E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L.R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B.S. *et al.* (2014) PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5616–5632.
35. Jazayeri, A., Balestrini, A., Garner, E., Haber, J.E. and Costanzo, V. (2008) Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J.*, **27**, 1953–1962.
36. Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R.M., Modi, A.P., Lee, J.H., Nicolette, M.L., Kopelovich, L., Jasin, M., Baer, R., Paull, T.T. *et al.* (2008) A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 119–125.
37. Cannavo, E. and Cejka, P. (2014) Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, **514**, 122–125.
38. Soucy, T.A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin, J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S. *et al.* (2009) An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, **458**, 732–736.
39. Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J. *et al.* (2009) RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*, **136**, 435–446.
40. Shaheen, R., Faqeh, E., Ansari, S., Abdel-Salam, G., Al-Hassnan, Z.N., Al-Shidi, T., Alomar, R., Sogaty, S. and Alkuraya, F.S. (2014) Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome Res.*, **24**, 291–299.
41. Qvist, P., Huertas, P., Jimeno, S., Nyegaard, M., Hassan, M.J., Jackson, S.P. and Borglum, A.D. (2011) CtIP mutations cause Seckel and Jawad syndromes. *PLoS Genet.*, **7**, e1002310.
42. Prado, F. and Aguilera, A. (2003) Control of cross-over by single-strand DNA resection. *Trends Genet.*, **19**, 428–431.
43. Blank, J.L., Liu, X.J., Cosmopoulos, K., Bouck, D.C., Garcia, K., Bernard, H., Tayber, O., Hather, G., Liu, R., Narayanan, U. *et al.* (2013) Novel DNA damage checkpoints mediating cell death induced by the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924. *Cancer Res.*, **73**, 225–234.
44. Liao, H., Liu, X.J., Blank, J.L., Bouck, D.C., Bernard, H., Garcia, K. and Lightcap, E.S. (2011) Quantitative proteomic analysis of cellular protein modulation upon inhibition of the NEDD8-activating enzyme by MLN4924. *Mol. Cell. Proteomic.*, **10**, M111 009183.
45. Narod, S.A. and Foulkes, W.D. (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 665–676.
46. Soria-Bretones, I., Saez, C., Ruiz-Borrego, M., Japon, M.A. and Huertas, P. (2013) Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer. *Cancer Med.*, **2**, 774–783.

The COP9 signalosome is vital for timely repair of DNA double-strand breaks

Michal Meir¹, Yaron Galanty^{1,*}, Lior Kashani¹, Michael Blank¹, Rami Khosravi¹, María Jesús Fernández-Ávila², Andrés Cruz-García², Ayelet Star¹, Lea Shochot¹, Yann Thomas³, Lisa J. Garrett⁴, Daniel A. Chamovitz⁵, David M. Bodine⁴, Thimo Kurz³, Pablo Huertas², Yael Ziv^{1,*} and Yosef Shiloh^{1,*}

¹The David and Inez Myers Laboratory for Cancer Research, Department of Human Molecular Genetics and Biochemistry, Sackler School of Medicine, George S. Wise Faculty of Life sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, 69978 Israel, ²Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) and Department of Genetics, University of Sevilla, Sevilla, 41092, Spain, ³MRC Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, DD1 5EH, Scotland, UK, ⁴Genetics and Molecular Biology Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 20892, USA and ⁵Department of Molecular Biology and Ecology of Plants, George S. Wise Faculty of Life sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, 69978, Israel

Received February 13, 2015; Revised March 16, 2015; Accepted March 17, 2015

ABSTRACT

The DNA damage response is vigorously activated by DNA double-strand breaks (DSBs). The chief mobilizer of the DSB response is the ATM protein kinase. We discovered that the COP9 signalosome (CSN) is a crucial player in the DSB response and an ATM target. CSN is a protein complex that regulates the activity of cullin ring ubiquitin ligase (CRL) complexes by removing the ubiquitin-like protein, NEDD8, from their cullin scaffold. We find that the CSN is physically recruited to DSB sites in a neddylation-dependent manner, and is required for timely repair of DSBs, affecting the balance between the two major DSB repair pathways—nonhomologous end-joining and homologous recombination repair (HRR). The CSN is essential for the processivity of deep end-resection—the initial step in HRR. Cullin 4a (CUL4A) is recruited to DSB sites in a CSN- and neddylation-dependent manner, suggesting that CSN partners with CRL4 in this pathway. Furthermore, we found that ATM-mediated phosphorylation of CSN subunit 3 on S410 is critical for proper DSB repair, and that loss of this phosphorylation site alone is sufficient

to cause a DDR deficiency phenotype in the mouse. This novel branch of the DSB response thus significantly affects genome stability.

INTRODUCTION

The DNA damage response (DDR) constitutes a central axis in the maintenance of genome stability (1–3). The DDR is an extensive signaling network, based on a core of dedicated damage response proteins that is assisted by a multitude of other proteins, which are temporarily recruited from various pathways to serve the DDR. The DDR is activated most vigorously by DNA double-strand breaks (DSBs). The DSB response activates DNA repair mechanisms and special cell cycle checkpoints, thereby modulating numerous cellular circuits while the damage is repaired (1,3). Its early phase is marked by the recruitment of a heterogeneous group of proteins to DSB sites, collectively dubbed ‘sensors’ or ‘mediators’. These proteins coalesce into highly ordered structures, visible as nuclear foci at the break sites (4), whose activity leads to chromatin reorganization and transcription arrest at the sites of DNA damage and sets the scene for DSB repair (5). This activity is regulated by extensive protein post-translational modifications, such as phosphorylation and ubiquitylation, which

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +972 3 6409760; Fax: +972 3 6407471; Email: yossih@post.tau.ac.il
Correspondence may also be addressed to Yael Ziv. Tel: +972 3 6408584; Fax: +972 3 6407471; Email: yaelz@post.tau.ac.il
Correspondence may also be addressed to Yaron Galanty. Tel: +44 1223 331725; Fax: +44 1223 334089; Email: y.galanty@gurdon.cam.ac.uk
Present addresses:

Yaron Galanty, The Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute and Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, CB2 1QN, UK.

Michael Blank, Laboratory of Molecular & Cellular Cancer Biology, Faculty of Medicine in the Galilee, Bar-Ilan University, 8 Henrietta Szold St., Safed, Israel.
Rami Khosravi, Compugen, Ltd, 72 Pinchas Rosen St., Tel Aviv, Israel.

occur on the sensors/mediators as well as on chromatin proteins including core histones (4–8). DSB repair is carried out under the precise regulation of several repair mechanisms, divided into two branches: classical nonhomologous end-joining (NHEJ) and its sub-pathways, and homologous recombination repair (HRR) (3). Briefly, NHEJ is based on direct ligation of DSB ends following their initial processing; it takes place throughout the cell cycle via several different mechanisms, and is considered mutagenic. HRR, on the other hand, is error-free; it is based on recombination between the damaged DNA molecule and an undamaged sister molecule, and can hence occur only at the late S or G2 phases of the cell cycle. Maintaining the balance between these two repair pathways, which can potentially compete for repair of the same lesion, is important for efficient and timely DSB repair (9).

The chief mobilizer of the DSB response is the homeostatic, multi-functional protein kinase ATM, whose activity is markedly enhanced following DSB induction (10,11). Activated ATM phosphorylates numerous effectors in the various branches of the DDR, mobilizing this intricate network in a concerted manner (10–14). ATM is a serine-threonine protein kinase with a PI3-kinase signature. It is a member of the PI3 kinase-related protein kinase (PIKK) family. This family includes, among others, the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs), which is a key player in the NHEJ branch of DSB repair and probably also in other genotoxic stress responses (15,16), and ATR, which responds primarily to stalled replication forks (17,18). The three protein kinases, which often collaborate in maintaining genome stability, preferably phosphorylate Ser or Thr residues followed by Gln (S/TQ motif).

Here, we report a novel, vital role for the COP9 signalosome (CSN) in the early phase of the DSB response, affecting the choice between DSB repair pathways. CSN is a eukaryotic, evolutionarily conserved protein complex that is located both in the nucleus and cytoplasm. It plays critical developmental roles in animals and plants by impacting many signaling pathways (19–21). Not surprisingly, loss of CSN subunits in the mouse is embryonic lethal (22,23). CSN is composed of eight subunits (CSN1–8) that act as a holoenzyme, with Zn²⁺-dependent isopeptidase activity residing in subunit 5 (CSN5) (24). This activity removes a covalently conjugated ubiquitin-like protein, NEDD8, from cullin proteins. Members of the cullin family (eight in mammals) (25) serve as scaffolds in cullin RING ubiquitin ligases (CRLs)—highly modular protein complexes that constitute the largest group of ubiquitin E3 ligases (26–28). CRLs are defined primarily by the nature of their cullin scaffold and their numerous exchanging substrate receptor modules. The continuous exchange of the substrate receptors allows CRLs to act dynamically in different contexts by affecting the turnover of various substrate proteins (28). Part of the fine-tuned regulation of CRL activity is due to cycles of NEDD8 conjugation onto a conserved lysine residue at the carboxy terminal domains of the corresponding cullins, and its removal. Neddylated cullins mark active CRLs and deneddylation of their cullins reduces their activity (28,29). Importantly, a large fraction of CRLs appears to be physically associated with CSN. CSN regulates CRL activity both by deneddylation of the corresponding cullins

and by sterically affecting their interaction with the corresponding E2 enzymes on one hand, and with their substrates on the other (29–31). Cullin neddylation also interferes with the association of the CSN-bound CRL to the protein CAND1, which regulates substrate receptor exchange (29,32–34). Thus, CSN's constant fine-tuning of the architecture and activity of CRLs in numerous aspects of cellular life make it a critical player in the same circuits. Resolution of CSN's structure has recently shown that it lays inactive until it encounters its substrates—neddylated cullins—which render it active (24).

CSN was previously shown to be involved in nucleotide excision repair—a DNA repair pathway which specifically handles bulky DNA lesions such as those caused by UV radiation (35). This involvement is based on CSN-mediated regulation of CRL complexes that contain cullin 4 (CRL4), which take part in the initial recognition and subsequent repair of UV-induced pyrimidine dimers (30,35–40).

Here, we reveal that CSN is a novel player in the vast signaling network that is activated by DSBs. We demonstrate that CSN is required for timely DSB repair and regulates the critical choice between DSB repair pathways. Specifically, CSN is required for the processivity of DNA deep end-resection, an initial, key step in HRR. Thus, upon induction of DSBs, a portion of cellular CSN is recruited both physically and functionally to serve the DSB response. Furthermore, our data suggest that CSN's functional partner in the DSB response is CRL4. We also establish that CSN is an ATM target and that the ATM-mediated phosphorylation on Serine 410 of its subunit, CSN3, is critical for its function in the DDR. Remarkably, elimination of this phosphorylation alone is sufficient to cause an organismal and cellular phenotype in the mouse. Thus, our results suggest that CSN is a new key regulator of the DSB response.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

Human U2-OS, HEK-293, and CAL51 cells were cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. U2-OS cells stably expressing ectopic GFP-CSN3 were grown in the same medium supplemented with 0.5 mg/ml G418. MEFs were isolated from mouse embryos on day E12.5–13.5 and cultured in HAM F-10 medium with 20% fetal bovine serum at 37°C in 3% O₂ and 5% CO₂ atmosphere in culture dishes pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Chemicals, antibodies and immunoblotting

DharmaFECT1 transfection reagent was obtained from Dharmacon (GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA). BrdU and Neocarzinostatin (NCS) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The ATM inhibitor, KU60019 (41) and the DNA-PK inhibitor, NU7441 (42) were obtained from Tcris Bioscience (Bristol, UK). Anti-53BP1 mouse monoclonal antibody was a generous gift from T. Halazonetis, anti-53BP1 polyclonal antibody was obtained from Novus Biologicals, LLC (Littleton CO, USA), anti-pS139-H2AX (γ H2AX) polyclonal antibody and polyclonal antibodies against CSN subunits 1, 3 and

5 were obtained from Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA), anti-RNF168, anti-H2A, anti-pS139-H2AX monoclonal antibody and anti-BRCA1 antibodies were obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany), anti-H4 was obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA), anti-HSC70 monoclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), and anti-Cullin 1 antibody was obtained from Invitrogen Corporation (Camarillo, CA, USA). Anti-mouse and anti-rabbit IgG, Alexa 488/568/633 were purchased from Molecular Probes (Leiden, Netherlands), and HRP-conjugated anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA). Anti-Cullin 4A was produced in the Kurz laboratory. The phospho-specific antibody against pS410 of CSN3 was produced by Bethyl Laboratories, Inc. Immunoblotting was carried out as previously described (43).

Immunoprecipitation

Cells expressing GFP-tagged proteins were lysed in HBSS (340 mM sucrose, 15 mM Tris-Cl pH 7.5, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 10 mM dithiothreitol) in the presence of protease and phosphatase inhibitors. After 10 min on ice the nuclear fraction was separated by centrifugation at 650 g for 3 min at 4°C. Nuclei were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 15 mM NaCl, 1% Igepal, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5% sodium deoxycholate) in the presence of protease and phosphatase inhibitors. GFP-trap reagent (ChromoTek GmbH Martinsried, Germany) was used to immunoprecipitate the GFP-tagged protein. The immune complexes were subsequently subjected to immunoblotting analysis. Immunoprecipitation of endogenous proteins from whole cell extracts was carried out using RIPA buffer to lyse the cells and was followed by five consecutive washes with this buffer.

RNA Interference

OnTarget Plus SMARTpool siRNAs targeting CSN subunits were obtained from Dharmacon: CSN3 (L-01149400), CSN1 (L-01227200) and CUL4A (L-012610). CSN5 siRNA was custom designed by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA) in order to target the following sequence: AGA AGU ACU UUA CCU GAA A. U2-OS cells were cultured to 30–50% confluence and transfected with siRNA using DharmaFECT1 following manufacturer instructions.

Clonogenic survival assay

CAL51-derived cells and MEFs were plated in triplicate at densities of 100–3000 cells per 60 mm plate and incubated for 24 h before exposure to various doses of NCS. After 2 weeks in culture, cell colonies were fixed and stained with 0.2% crystal violet in 50% ethanol. Colonies containing at least 50 cells were counted under a dissection microscope.

Immunostaining

Detection of 53BP1, γ H2AX and Rad51, nuclear foci by immunofluorescence staining was performed as described

previously (43). Nuclear foci were quantified using the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). 200–300 cells were counted per time point.

DSB repair pathways assay

The NHEJ/HRR balance assay was carried out as previously described (44), using U2-OS cells harboring a single copy of the SeeSaw 2.0 Reporter. Briefly, 5000 cells were plated on a 96-well plate. The cells were transfected with siRNAs using RNAiMAX (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and 2 days later were infected with a lentiviral vector expressing BFP-tagged I-SceI (45), at multiplicity of infection 5, and fresh medium was added 24 h later. Forty-eight hours later, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and washed with phosphate buffered saline (PBS) prior to scoring under a fluorescent microscope for blue, green and red fluorescence. NHEJ/HRR balance was calculated according to the ratio of green versus red cells, and this ratio was normalized against a control (irrelevant) siRNA. Statistical significance was determined using the paired sample *t* test.

DNA end-resection

SMART (Single Molecule Analysis of Resection Tracks) was performed as previously described (46). Briefly, U2-OS cells transfected with either siRNA against CSN1 or a control siRNA were cultured in the presence of 10 μ M bromodeoxyuridine (BrdU) for 24 h, irradiated with 10 Gy of IR and harvested 1 h later. Cells were embedded in low-melting agarose and in-gel DNA extraction followed. To stretch the DNA fibers, silanized coverslips (Genomic Vision, Bagnaux, France) were dipped into the DNA solution for 15 min and pulled out at constant speed (250 μ m/s). Coverslips were baked for 2 h at 60°C and incubated without denaturation with an anti-BrdU mouse monoclonal antibody. After washing with PBS, coverslips were incubated with ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and stored at –20°C. DNA fibers were observed using a Nikon NI-E microscope under a PLAN FLOUR40 \times /0.75 PHL DLL objective. The images were recorded and processed using NIS ELEMENTS Nikon software. For each experiment, at least 200 DNA fibers were analyzed, and the length of DNA fibers was measured using Adobe Photoshop CS4 Extended version 11.0 (Adobe Systems Incorporated). Statistical significance in these experiments was determined with the paired Student's *t*-test using the PRISM software (Graphpad Software Inc.).

Induction of localized DNA damage

In order to detect recruitment of ectopic, GFP-tagged proteins to laser-induced DNA damage in live cells, U2-OS cells were plated on glass bottom dishes (MatTek) and pre-sensitized with 5 μ M BrdU for 48 h at 37°C. The dishes were transferred into a microscope top-stage incubator equipped with a control system for gas mixture and humidity (Okolab, Ottaviani, Italy). DNA damage was induced on a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems,

Wetzlar, Germany) using a 405 nm Diode laser focused through an HC PL APO 63 \times , 1.4-numerical aperture oil immersion objective (8% laser power, scan speed 650 ms, 40 scans). Images were acquired using the same system. In order to detect recruitment of endogenous proteins to laser-induced sites of DNA damage by immunostaining, two-photon based micro-irradiation of DNA was performed using a focused 800 nm laser beam in LSM 510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Spectral-Physics Mai-Tai (Deep-See) multi-photon laser system focused through a 63 \times 1.25NA oil immersion objective (8.5% laser power, scan speed 256 ms, 40 scans at zoom \times 1). Imaging of the immunostained cells was subsequently carried out using a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Generation of the *Csn3* S410A knock-in mouse

Targeting vectors were generated in *Escherichia coli* via the Recombineering technique using BAC DNA. A bacterial artificial chromosome (BAC) clone spanning the *Cops3* genomic locus (bMQ 302C20) was obtained from the 129S7/AB2.2 BAC clone library (the Sanger Institute), and served for subcloning. Further reagents and protocols were obtained from the National Institutes of Health, NCI-Frederick (see <http://recombineering.ncifcrf.gov> for details). Homologous recombination was carried out in SW102 bacteria as previously described (47). In short, a point mutation leading to the S410A substitution (TCA \rightarrow GCA) was first introduced into the BAC clone using gal K selection. The targeting cassette was subsequently retrieved via gap repair into the pBS-derived vector, pL253. Insertion of a floxed neo cassette (red and green box) followed. For each retrieval or insertion step, mini targeting arms of 250–500 bp containing the preferred restriction sites were prepared using PCR. The targeting construct was linearized and introduced into 129/Sv male ES cells, which were subsequently doubly selected in medium containing 200 μ g/ml G418 and 0.2 μ M flauridine. Positive clones were analyzed by Southern blotting using 5' and 3' probes (Supplementary Figure S7A) to distinguish between the mutant and wild-type alleles. Targeted ES cells were microinjected into 129/Sv blastocysts. Embryos were transferred to pseudopregnant foster mothers. Founder animals were identified by Southern blotting analysis of tail DNA using the 5' and 3' probes. Further genotyping was carried out using PCR (Supplementary Figure S7B).

RESULTS

CSN is an ATM target in response to induction of DNA damage

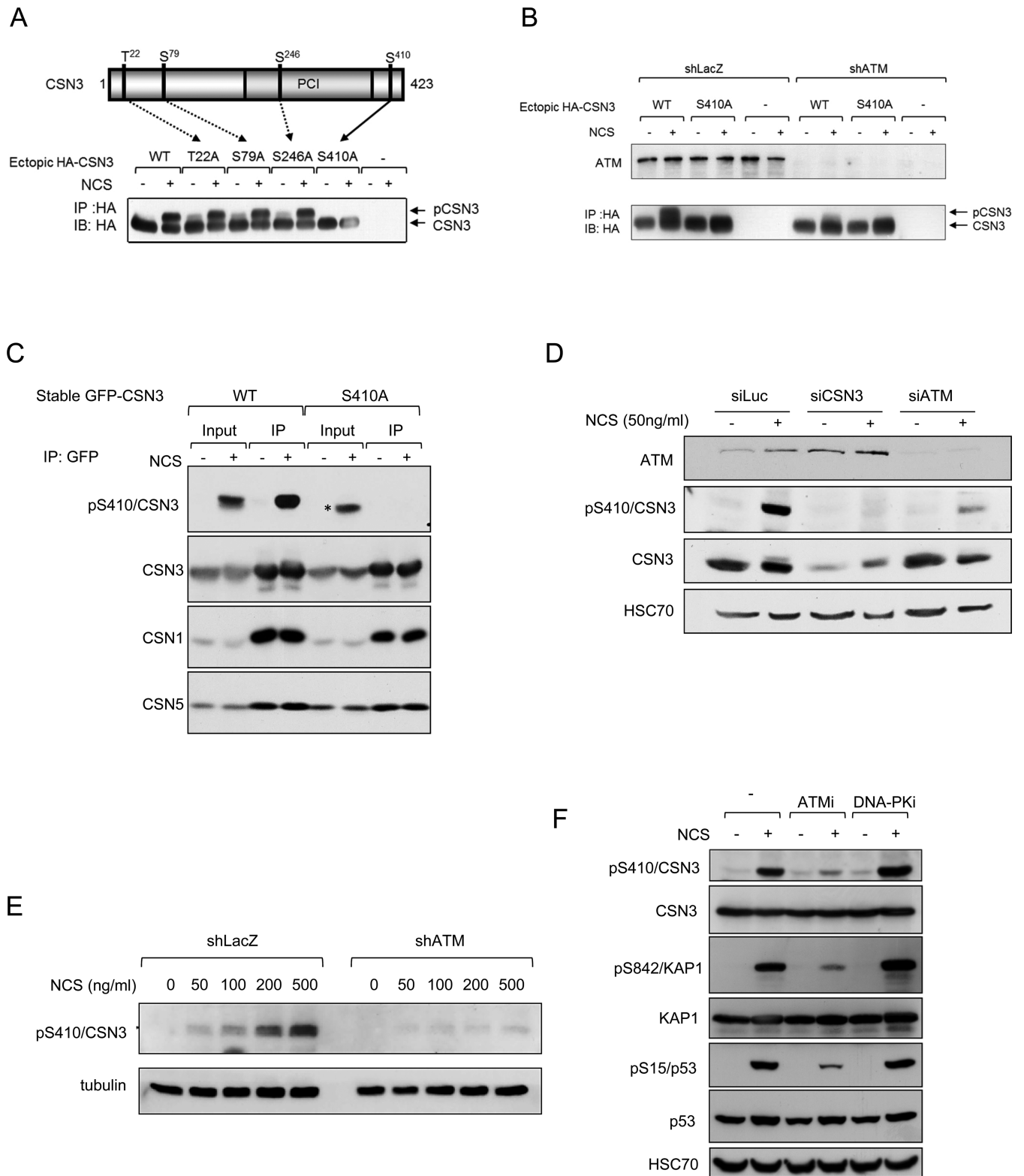
Early studies of the ATM protein in our lab included a search for ATM-interacting proteins using the two-hybrid assay. A bait spanning ATM residues 1184–1583, which contain a leucine zipper—a protein-protein interaction motif—identified CSN subunit 8 (CSN8) as prey (Supplementary Figure S1A). Co-immunoprecipitation of endogenous ATM and CSN8 supported the notion of a physical interaction between them (Supplementary Figure S1B), raising the possibility of functional interaction between ATM and CSN and possibly rendering CSN an ATM target.

In order to search for DNA damage-induced phosphorylation of CSN subunits in cells, we expressed these subunits in HEK293 cells as ectopic HA-tagged proteins, and treated the cells with the radiomimetic drug neocarzinostatin (NCS) concurrently with a protein phospho-labeling pulse. This experiment revealed marked enhancement of phospho-labeling of CSN subunit 3 (CSN3) following NCS treatment (Supplementary Figure S1C). We further noticed that in response to DNA damage induction, a portion of CSN3 exhibited altered electrophoretic migration ('gel shift') (Figure 1A and B). Since this band-shift was largely abolished upon knockdown of ATM (Figure 1B), we assumed that it represented ATM-mediated phosphorylation of CSN3 in cells. In order to map the phosphorylation site, we expressed mutant versions of CSN3 in cells. In each mutant, one of its four S/TQ sequences—potential ATM target sites—was abolished by Ser \rightarrow Ala substitutions. Only the S410A substitution eliminated the band-shift (Figure 1A), suggesting that the presumed phosphorylation occurred on Ser410. A polyclonal phospho-specific antibody raised to detect this assumed phosphorylation reacted strongly with ectopic wild-type CSN3 expressed following NCS treatment, but not with an S410A mutant version of this protein (Figure 1C). This result indicated that phosphorylation of CSN3 on Ser410 occurred in cells in response to DNA damage and was detected by the antibody. The antibody also detected the phosphorylation of endogenous CSN3, which was ATM- and dose-dependent (Figure 1D–G), and DNA-PK independent (Figure 1F); it peaked within 30 min of damage induction and subsided several hours later—a time course typical of many ATM-mediated protein phosphorylations (Figure 1G). These results established that Ser410 of CSN3 is an ATM target in response to DSB induction and suggested a role for CSN in the ATM-mediated DSB response.

CSN is required for regulation of DSB repair

We further examined the role of CSN in the DSB response by measuring the cellular sensitivity of cells depleted of CSN subunits CSN1 or CSN3, to the cytotoxic effect of NCS, using RNAi. Deficiency of DDR players that disrupts DSB repair or interferes with the fine balance between DSB repair pathways usually results in cellular hypersensitivity to DSB-inducing agents. This defective phenotype is typically measured by clonogenic survival assays. Since CSN functions as a holoenzyme (24), loss of specific subunits is expected to compromise its integrity and activity. We observed that depletion of CSN1 led to concomitant depletion of two other CSN subunits, CSN3 and CSN5, as did CSN3 depletion with regard to CSN1 and CSN5 (Supplementary Figure S2). Knockdown of the catalytic subunit, CSN5, did not lead to either CSN1 or CSN3 depletion (Supplementary Figure S2), but presumably rendered CSN inactive. Depletion of either CSN1 or CSN3 increased cellular sensitivity to radiomimetic treatment (Figure 2A and B), suggesting that down-regulation of CSN affected DSB repair.

Several assays have been developed in order to assess individually the efficiency of the two main pathways of DSB repair, NHEJ and HRR, in cultured cell lines. A recently established assay measures the ratio between these two path-



G

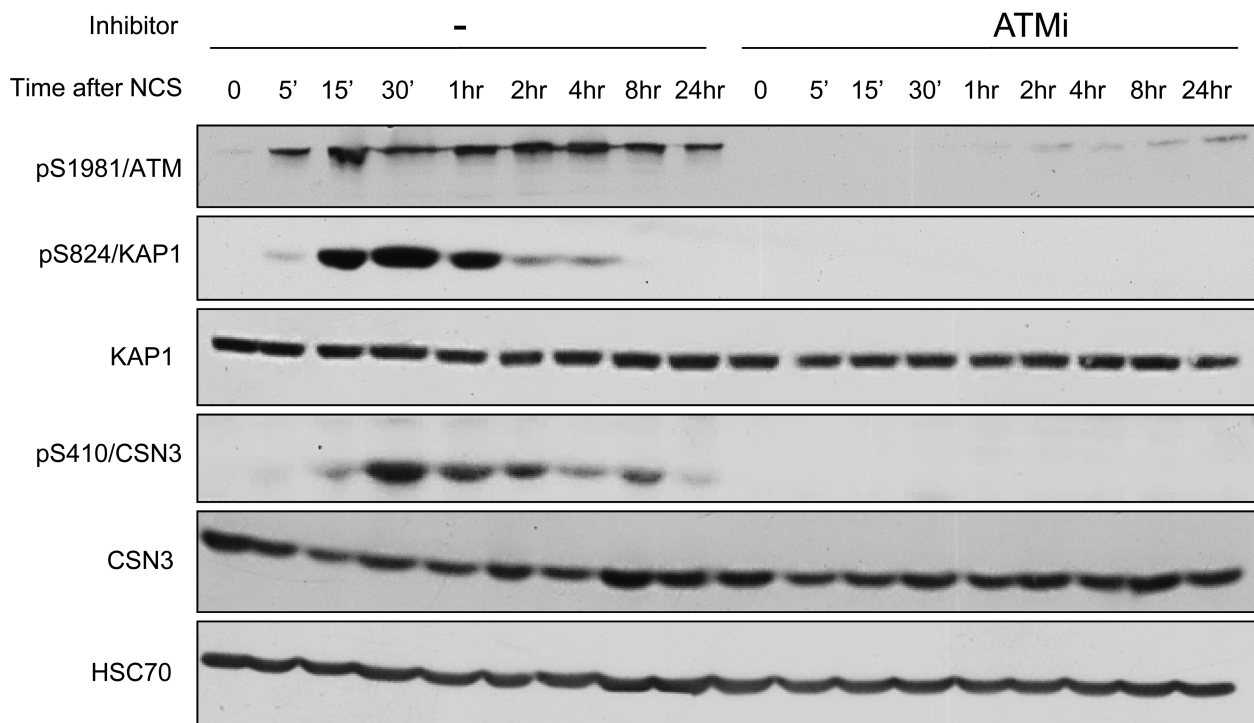


Figure 1. CSN3 is an ATM substrate in the DNA damage response. (A) Mapping of the phosphorylation site on CSN3. Potential ATM targets in this protein (serine or threonine residues followed by glutamine) were mutated in recombinant HA-tagged CSN3, and the various versions of the protein were expressed in HEK293 cells. The band-shift observed after DNA damage induction (500 ng/ml of NCS for 30 min) was specifically abolished by the S410A substitution, indicating that the corresponding modification occurred on S410. (B) Phosphorylation of S410 of CSN3 in response to DNA damage induction is ATM-dependent. The experiment described in (A) was repeated in HEK293 cells that stably expressed shRNA against ATM. Note the considerable reduction in CSN3's band-shift in cells depleted of ATM. (C) Detection of CSN3 phosphorylation in cells using a specific anti-phospho antibody. GFP-tagged CSN3 in wild-type and mutant (S410A) versions was ectopically expressed in U2-OS cells. Following treatment with 50 ng/ml of NCS for 1 h, ectopic CSN3 was immunoprecipitated using an anti-GFP antibody, and the immune complexes were blotted with the indicated antibodies. The ectopic wild-type protein, but not the mutant, reacts with the antibody after induction of DNA damage. In cellular extracts, the anti-phospho antibody detects the phosphorylation of another protein in response to DNA damage (asterisk). Note that endogenous CSN1 and CSN5 are pulled down by ectopic CSN3. (D) Depletion of CSN3 or ATM markedly reduces the pS410-CSN3 phosphorylation signal. U2-OS cells transfected with the indicated siRNAs were treated 72 h later with 50 ng/ml of NCS for 30 min and processed for immunoblotting analysis. (E) CSN3 phosphorylation is dose- and ATM-dependent. HEK293 cells expressing irrelevant (LacZ) or ATM shRNA were treated for 1 h with various doses of NCS, followed by immunoblotting with the indicated antibodies. (F) CSN3 phosphorylation is not dependent on DNA-PK. U2-OS cells were treated with the indicated inhibitors 30 min prior to treatment with 50 ng/ml of NCS. Phosphorylation of the ATM substrate KAP-1 on S824 served to monitor ATM activity in response to DNA damage induction. ATMi: the ATM inhibitor, KU60019 (41), applied at 5 μ M concentration. DNA-PKi: the DNA-PK inhibitor, NU7441 (42) applied at 10 μ M concentration. (G) Time course of phosphorylation of endogenous CSN3 following treatment of U2-OS cells with 50 ng/ml of NCS.

ways (44). Abrogation of either repair pathway disturbs the finely regulated equilibrium between the two mechanisms, such that deficiencies in DDR players that abrogate HRR increase the NHEJ/HRR ratio, and vice versa. Deviation from the normal ratio between NHEJ and HRR can lead to defective DSB repair (44,48–50). To determine this ratio, we used U2-OS cells whose genome contains the SeeSaw Reporter (44) (SSR 2.0; Figure 2C), which harbors a cleavage site of the meganuclease I-SceI, that normally does not cleave human DNA. Following I-SceI-mediated cleavage in these cells, repair of the break by NHEJ leads to green GFP fluorescence whereas repair via HRR leads to red RFP fluorescence, and the ratio between the two is determined. The reporter is constructed such that direct, error-free ligation of the sticky ends formed by I-SceI is prevented. Figure 2D shows that down-regulation of either CSN1 or the catalytic subunit, CSN5, in these cells increased the NHEJ/HRR ratio similarly to the effect of CtIP down-regulation. CtIP is

an important regulator of the NHEJ:HRR balance as it regulates DNA end-resection—an essential step toward HRR (3,51). This effect is comparable to that obtained by the depletion of several other DDR players, such as those that mobilize major ubiquitin-driven DDR pathways (44). Importantly, this effect was not due to abrogation of cell cycle dynamics as a result of CSN depletion, as this depletion did not affect the cell cycle distribution (not shown).

HRR reduction could be attributed to reduced efficiency of a key step in this repair pathway—deep 5' to 3' resection at each DSB ends. This step promotes HRR while inhibiting NHEJ and is therefore highly regulated (52,53). In order to assess the effect of CSN depletion on end-resection processivity we used SMART (Single Molecule Analysis of Resection Tracks)—a recently developed, high-resolution assay that measures the extent of end-resection directly at the DNA level (54). Importantly, CSN1 depletion significantly reduced the length of resected DNA in IR-treated cells, to a

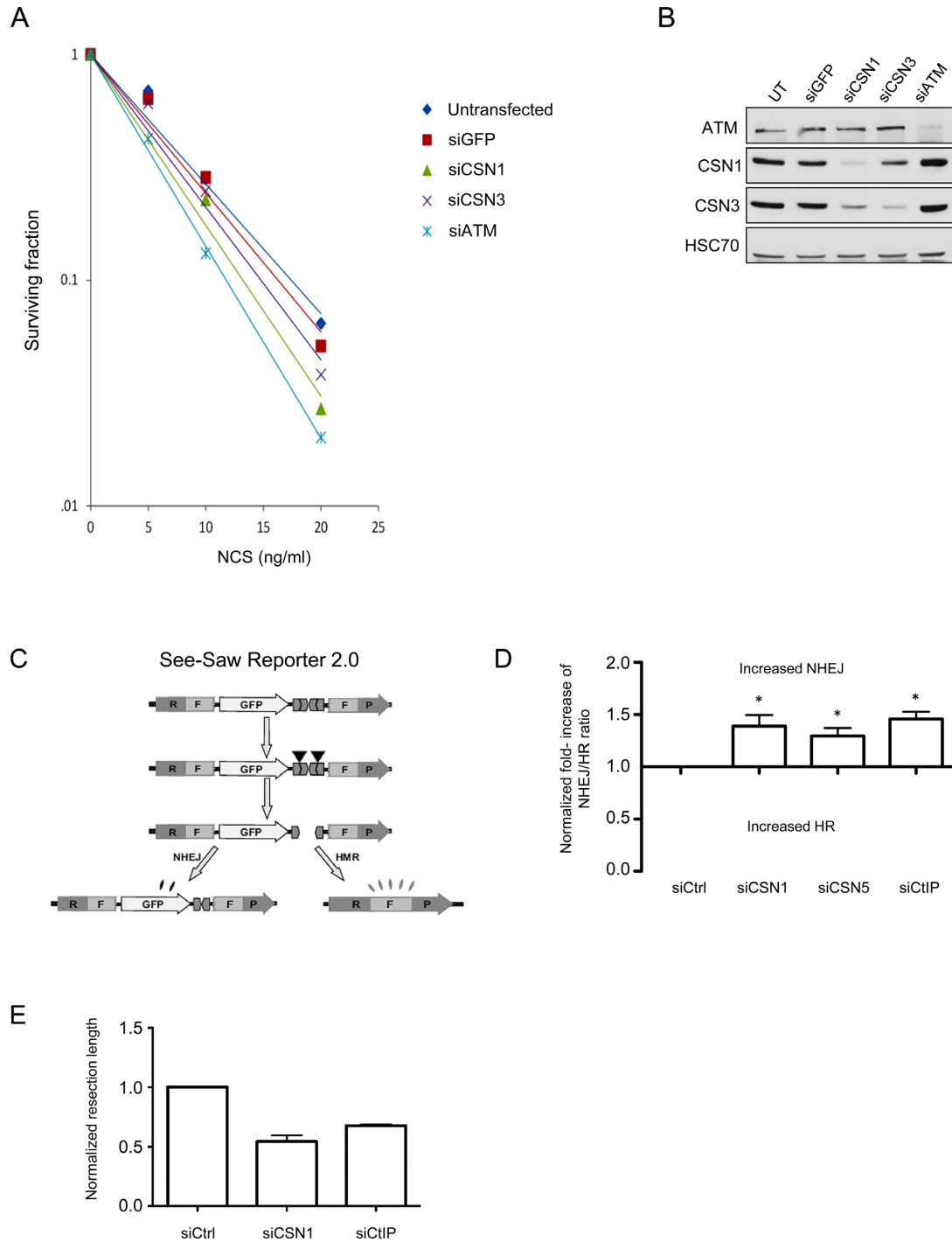


Figure 2. Depletion of CSN subunits affects the DNA damage response. (A) Clonogenic survival assay of CAL51 cells transfected with siCSN1 or siCSN3 for 72 h. The cells were treated with various concentrations of NCS. Cells transfected with siATM or siGFP served as controls. (B) Extent of protein depletion in the experiment depicted in (A). Note the reduction in CSN3 amounts in cells depleted of CSN1. (C) Schematic representation of the SeeSaw 2.0 reporters (44). A GFP ORF is flanked by two truncated parts of an RFP ORF (RF and FP) sharing 302 bp of homologous sequence. Two I-SceI-target sites in opposite orientation are present at the 3' end of the GFP ORF. After generation of a DSB by ectopic I-SceI endonuclease, it may be repaired via NHEJ, and the cells will retain GFP expression, or it may be repaired via HRR, creating a functional RFP ORF. (D) Effect of the indicated siRNAs in the SSR 2.0 assay. Two CSN subunits were knocked down: CSN1, whose depletion leads to reduction of other CSN subunits (Supplementary Figure S2), and CSN5, which harbors the catalytic site of CSN's deneddylation activity. The ratio of green to red cells in each condition was calculated and normalized for each siRNA against the effect of a scrambled siRNA. Increased NHEJ/HRR ratio over the baseline value of 1.0 represents an imbalance between the two DSB repair pathways toward NHEJ. The data represent four sets of triplicate experiments. Paired *t* test was used for statistical analysis. Asterisk indicates a *P* value of <0.05. (E) Single Molecule Analysis of Resection Tracks (SMART) analysis of cells depleted of CSN1 or the end-resection regulator, CtIP, and control cells. The length of individual fibers was measured as described in the 'Materials and Methods' section and the median of at least 250 fibers was calculated. The average of the medians and the standard deviation of three independent experiments are shown. Note the marked reduction in resection extent of CSN1-depleted cells compared to CtIP depletion (siControl-siCSN1: *P* = 0.0133; siControl-siCtIP: *P* = 0.0003).

greater extent than that observed in cells depleted of CtIP, a major regulator of this process (Figure 2E). We thus inferred that CSN is a critical regulator of proper HRR by influencing end-resection, thereby affecting the maintenance of the delicate balance between the major DSB repair pathways.

CSN is recruited to sites of DNA damage

The above data strongly suggested that CSN participates in processes that occur at DSB sites. A common characteristic of proteins that function at these sites is their temporary recruitment to areas of chromatin spanning DSBs (4). Often, only a portion of the cellular content of the protein is recruited, but even the relocalization of such a small portion can be demonstrated experimentally by targeting a narrow nuclear sector with a focused laser beam to induce localized, dense DNA damage, and subsequently imaging the protein recruitment to that sector. Using this system, we were able to observe recruitment of ectopic, stably expressed GFP-tagged CSN3 to such 'laser stripes' as early as 30 s after induction of DNA damage, culminating within several minutes (Figure 3). This recruited fraction was retained at the damaged sites for several hours (not shown). Since immunoprecipitation of ectopic CSN3 concomitantly pulls down endogenous CSN1 and CSN5 (Figure 1C), we assume that the recombinant protein is incorporated into the CSN complex, and therefore its recruitment to DSB sites represents the relocalization of the CSN holoenzyme to these sites.

The recruitment dynamics were largely similar for both the wild-type and the S410A-mutant proteins (Figure 3). Furthermore, the recruitment of wild-type CSN3 was not affected by the addition of an ATM inhibitor, suggesting that the ATM-mediated phosphorylation of CSN3 did not play a major role in this process. Importantly, however, pre-treatment of the cells with the small molecule, MLN4924—a selective inhibitor of the NEDD8-activating enzyme (NAE) that initiates the neddylation process (55)—abolished the recruitment of CSN3 but not of two other DDR players expressed as ectopic proteins: polynucleotide kinase phosphatase (PNKP) (Supplementary Figure S3), and the E3 ubiquitin ligase, RNF8 (not shown). This is a striking situation, in which the recruitment of a single DDR player to sites of DNA damage is differentially inhibited by a small molecule.

These results indicate that CSN belongs to the growing group of proteins that are summoned from their ordinary duties in other physiologic arenas to function in the DDR. In this case, CSN's involvement in the DDR is dependent on prior protein neddylation, suggesting that its role in the DDR might be associated with its activity as a deneddylase. Depletion of CSN1, which leads to depletion of other CSN subunits (Supplementary Figure S2), did not affect the recruitment of several major players in the early stage of the DSB response—specifically 53BP1, RNF168 and BRCA1 (Supplementary Figure S4)—indicating that CSN is not required for their recruitment to the damaged sites. CSN may therefore participate in a stage of the DSB response which is crucial for well-timed DSB repair, but not in the initial build-up of the protein hubs surrounding DSB sites.

Cullin 4A partners with CSN in the DSB response

Among the CRLs, CRL4 (which contains cullins 4A or 4B) has been reported to be involved in a variety of DNA transactions, such as transcription, replication and repair (56) and has been specifically shown to play a central role in the sensing and repairing of bulky DNA lesions caused by UV radiation, via the nucleotide excision repair (NER) pathway (30,35–38,56–57). We asked whether a functional link between CSN and CUL4A ubiquitin ligase exists in the context of the DSB response. We used an antibody specific for human CUL4A (Supplementary Figure S5) to follow the recruitment of endogenous CUL4A to laser stripes induced in human U2-OS cells. Endogenous CUL4A was rapidly recruited to sites of DNA damage (Figure 4A), and gradually dissipated over the next 30 min (Figure 4C). Notably, recruitment of CUL4A depended on the presence of both CSN3 (Figure 4A) and CSN1 (Supplementary Figure S6A), suggesting that this process requires a functional CSN. Moreover, pre-treatment of the cells with the neddylation inhibitor, MLN4924, markedly attenuated CUL4A's recruitment to sites of DNA damage (Figure 4C), without affecting the recruitment of two other major DDR players - 53BP1 (Figure 4C) and RNF168 (not shown). These results suggest that CUL4A accrual at sites of DNA damage requires active NEDD8 turnover, since it is impaired by inhibiting either protein neddylation or cullin deneddylation. Crucially, ATM inhibition did not interfere with CUL4A recruitment (Supplementary Figure S6B), indicating that, as with CSN recruitment, this process did not require phosphorylation of ATM targets.

ATM-mediated phosphorylation of CSN3 is required for timely DSB repair

Most DDR players are recruited from other processes and typically undergo PTMs that modulate their function or activity in order to prepare them for their temporary tasks in the DDR (6,8); ATM-dependent phosphorylation is a paramount example for such a PTM in the DSB response (11). The results above suggested that ATM-mediated phosphorylation of CSN3 may not play a critical role in its physical recruitment to sites of DNA damage. Is this phosphorylation necessary for CSN's function in the DDR? Our approach to studying the functional significance of this phosphorylation was based on abolishing the phosphorylation site in murine *Csn3* by knocking-in the corresponding mouse gene, *Cops3* such that it will produce a protein with an S410A substitution. An animal with a non-phosphorylatable *Csn3* exhibiting an organismal and cellular phenotype would be valuable for demonstrating the importance of this phosphorylation. The sequences of the human and murine ortholog proteins share 99% identity, and the amino acid sequence spanning Ser410 is identical in the two proteins. The *Cops3* gene was thus targeted to induce the appropriate amino acid substitution in its protein product (Supplementary Figure S7).

Mice homozygous for the mutant *Cops3* allele expressed normal levels of *Csn3* (Figure 4A). As expected, following whole body X-irradiation, *Csn3* was not phosphorylated in tissues of these animals, contrary to another *Atm* substrate, Kap-1 (Figure 5A). These mice grow normally,

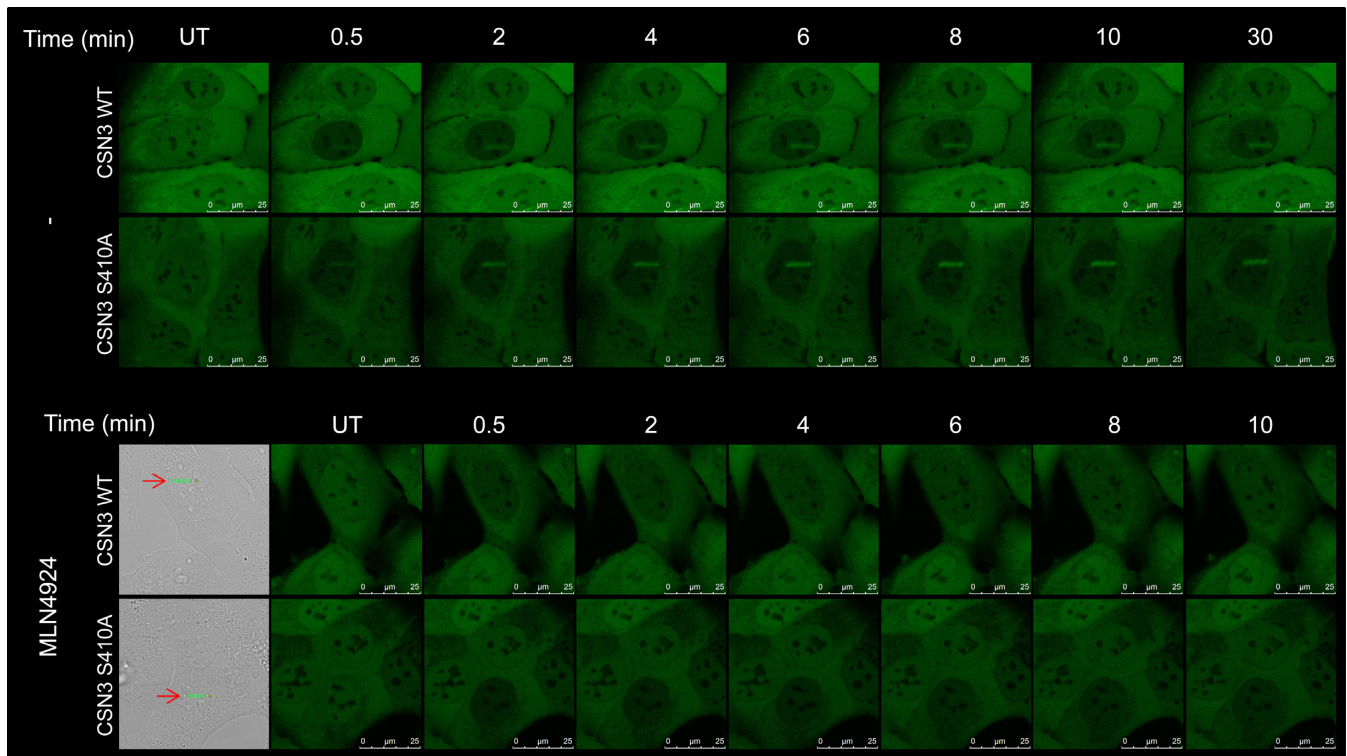


Figure 3. Recruitment of ectopic, GFP-tagged CSN3 to sites of laser-induced DNA damage. U2-OS cells stably expressing ectopic, GFP-tagged CSN3 in wild-type or mutant (S410A) versions were either treated or not with 3 μ M of the neddylation inhibitor, MLN4924, for 6 h. Laser micro-irradiation was then carried out and images captured in live cells at the indicated time points. Experiments were carried out in at least 15 cells. Representative cells are shown. In the bottom panel, red arrows and green lines indicate the location of laser-induced damage in bright-field images of the irradiated cells.

have a normal life span and do not exhibit excessive morbidity, suggesting that the S410A amino acid substitution in Csn3 does not considerably affect CSN function under normal conditions. Significantly, however, these mice exhibited increased radiosensitivity that was intermediate between that of wild-type and *Atm*^{-/-} knockout mice (Figure 5B). Moreover, mouse embryo fibroblasts (MEFs) with non-phosphorylatable Csn3 showed NCS sensitivity that was intermediate between that of wild-type and *Atm*-deficient MEFs (Figure 5C), similar to human cells with down-regulated CSN subunits (Figure 2A). In order to monitor DSB repair in these cells, we followed the dynamics of two hallmarks of unrepaired DSBs in MEFs treated with ionizing radiation: nuclear foci of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) (58), and nuclear foci of the DDR player 53BP1 (59). The gradual disappearance of both of these DSB features was retarded in MEFs expressing the mutant Csn3 (Figure 5D and E), attesting to a perturbation of DSB repair in these cells. The results therefore indicate that CSN's involvement in DSB repair relies on the ATM-mediated phosphorylation of CSN3, although this phosphorylation does not seem to play a role in the physical recruitment of CSN to the sites of DNA damage.

In view of the result suggesting reduced HRR in human cells depleted of CSN subunits (Figure 2D), we applied an immunofluorescent assay to the MEFs in order to assess successful initiation of HRR. We quantified the nuclear foci of a major HRR player, Rad51, which coats DNA single strand stretches following deep end-resection. Remarkably,

at various time points following IR treatment, the fraction of cells with Rad51 nuclear foci in the mutant MEFs was significantly lower than in wild-type cells (Figure 5F), attesting to a reduction in deep end-resection at DSB sites in the mutant MEFs. The organismal and cellular phenotypes associated with the loss of just one of the numerous ATM-mediated phosphorylations (11) are notable and suggest that this phosphorylation plays a crucial role in the DDR, specifically in determining DSB repair efficiency.

DISCUSSION

Our results establish CSN as a new, crucial player in the cellular response to DSBs, and place it at a critical decision point in DSB repair, together with CRL4. Furthermore, we show that the loss of a single ATM-mediated phosphorylation on one CSN subunit is sufficient to affect the organismal and cellular response to DSBs.

The DDR network is based on a highly efficient and economic system which temporarily borrows functional modules from other processes and adapts them to the needs of the DDR, often by inducing PTMs on their key targets (1–2,11). The dynamic organization of CRLs that endows them with a special capacity to alter their substrate specificity (28) makes them ideal candidates for such a scenario. Our data indicate that CSN and CRL4 are temporarily adapted and recruited to serve the DSB response. Abrogation of CRL4 recruitment in CSN-depleted cells as well as the similar inhibition of CSN and CUL4A recruitment by the neddylation

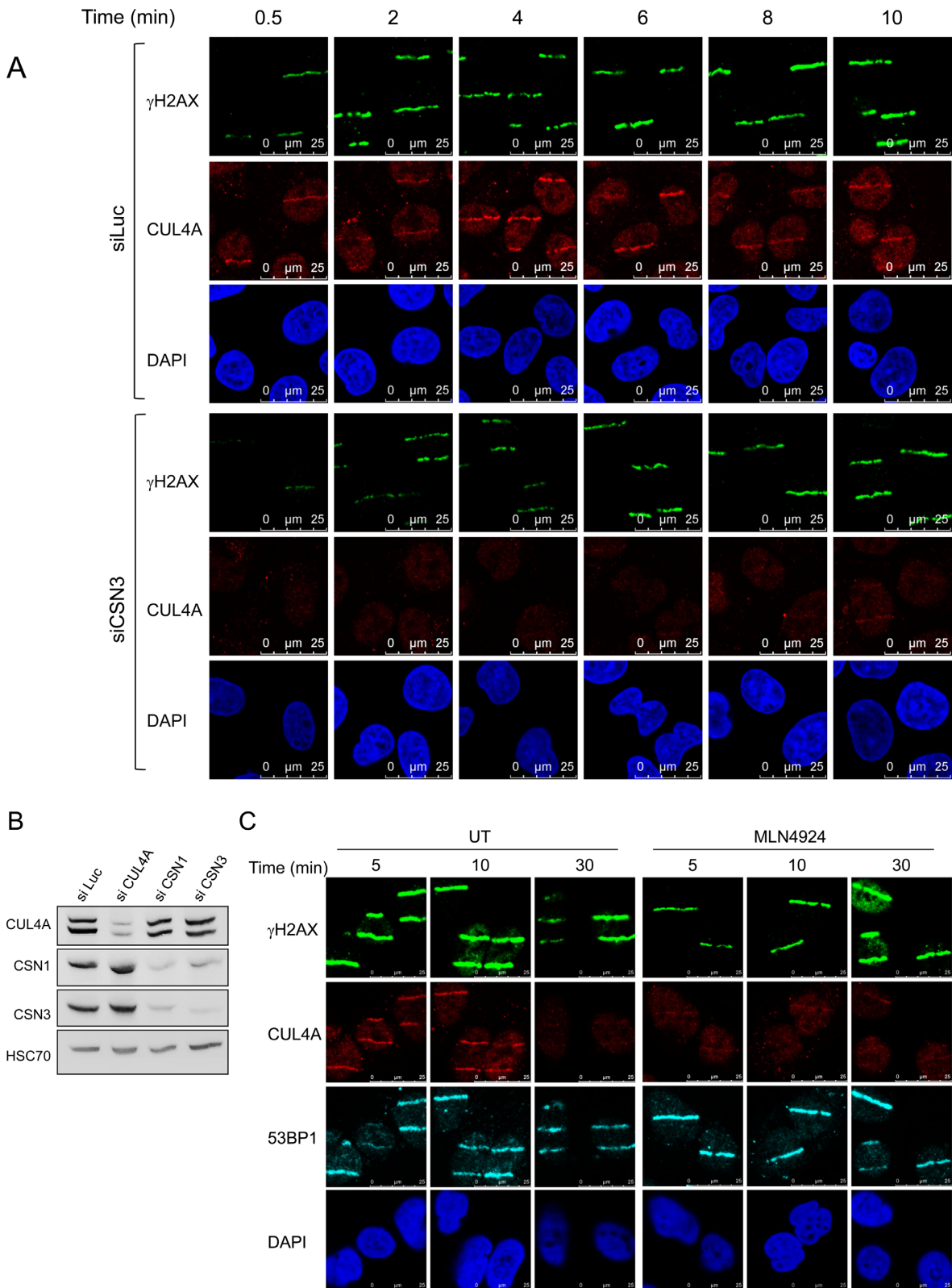


Figure 4. Recruitment of cullin 4A to sites of laser-induced DNA damage is CSN- and neddylation-dependent. (A) Localized DNA damage was induced using a focused laser microbeam in U2-OS cells transfected with the indicated siRNAs. At various time points after DNA damage induction the cells were processed for immunostaining with the indicated antibodies. (B) Extent of knockdown of different proteins in this experiment demonstrated using immunoblotting. Note that down-regulation of CSN subunits does not affect CUL4A levels, and vice versa. (C) Similar experiment as in (A), with treatment of the cells with 3 μ M of the neddylation inhibitor, MLN4924, for 6 h prior to damage induction.

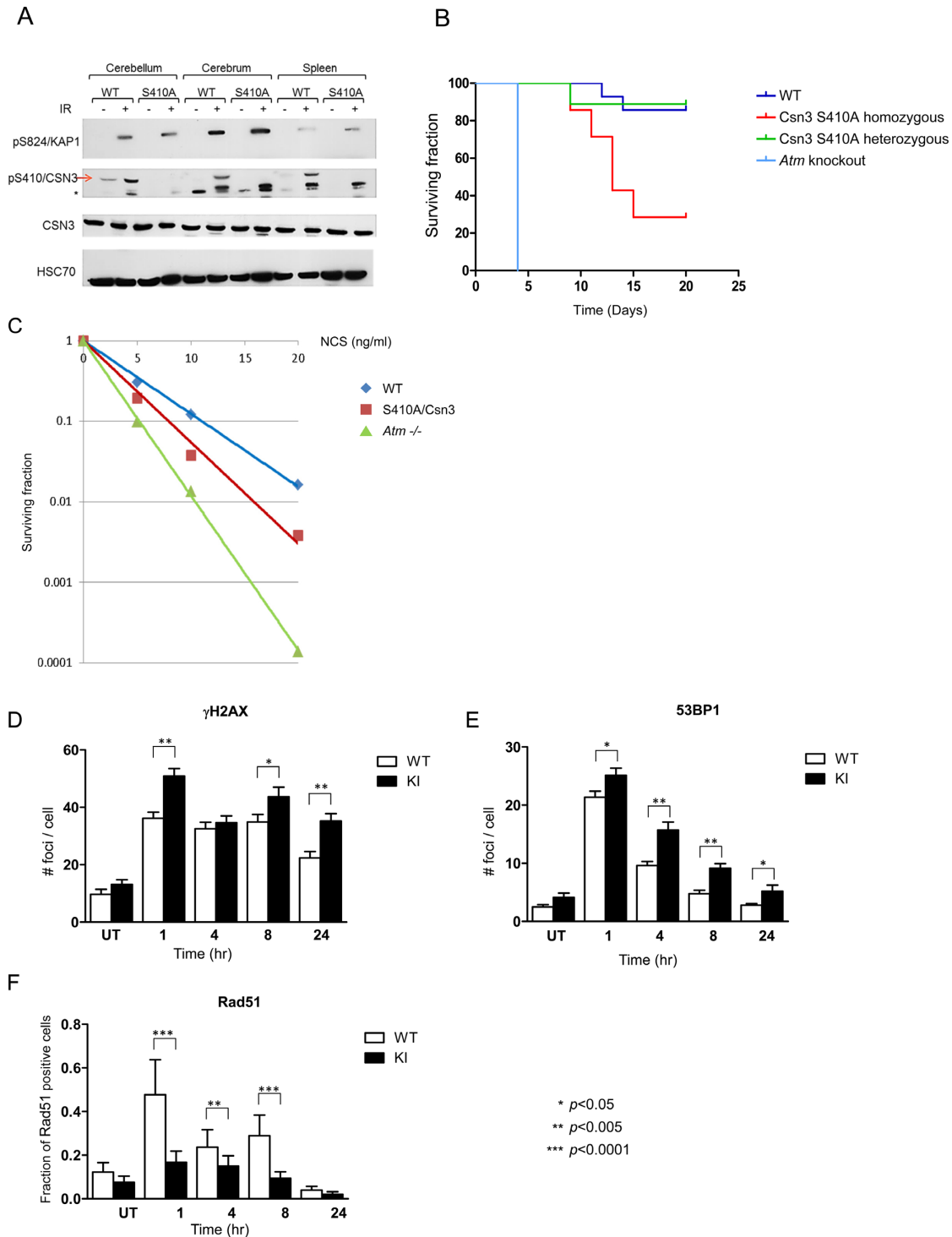


Figure 5. Elimination of the *Atm* phosphorylation site on murine endogenous *Csn3* impairs the DSB response in mice. (A) Endogenous *Csn3* is not phosphorylated on S410 in response to DSBs in various tissues of mice expressing a mutated protein with the S410A amino acid substitution. Ten-day-old mice were irradiated with 10 Gy of IR, and 1 h later tissues were collected and processed for immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Phosphorylation of the *Atm* substrate Kap-1 on S824 served to monitor ATM activity. (B) Kaplan–Meier survival curve of 1-month old mice with various genotypes in the *Cops3* locus encoding *Csn3* following whole body irradiation with 6.5 Gy of IR. 10–20 animals of each genotype were irradiated. (C) Clonogenic survival of MEFs with different genotypes after treatment with various NCS doses. Cells expressing non-phosphorylatable *Csn3* exhibit intermediate radiomimetic sensitivity between that of wild-type and that of *Atm*-deficient cells. (D and E). Lack of an *Atm* phosphorylation site on *Csn3* slows the disappearance of DNA damage-induced γ H2AX and 53BP1 nuclear foci. MEFs with the indicated version of endogenous *Csn3* were irradiated with 1 Gy of IR, and subsequently fixed and stained with antibodies against γ H2AX or 53BP1. Nuclear foci were counted in 150–250 cells per time point. (F) Similar analysis as in (D) and (E) using an antibody against Rad51. The diagram presents the fraction of cells which contained more than 15 nuclear foci. Experiments were carried out in triplicate, and one set of results is shown. Error bars represent SEM. Statistical analysis was based on Student’s *t* test for γ H2AX, 53BP1 and χ^2 for Rad51.

tion inhibitor, MLN4924, suggests that CSN and CRL4 are bound together in the same process that requires protein neddylation dynamics.

Our data also demonstrate a role for this process in the regulation of a key step in HRR—DNA end-resection—which appears to be under very tight regulation (52,53) and subsequently, affects the ratio between HRR and NHEJ. There is growing appreciation for the role of this critical balance in making DSB repair a well-timed and smooth process, and, accordingly, of its subjection to several regulatory mechanisms (9,44). Presumably, the involvement of CSN and CRL4 in this process is due to ubiquitylation of CRL substrate(s) at the sites of DNA damage.

In the nucleotide excision repair pathway, which repairs bulky DNA adducts, recognition of the DNA lesion by the substrate receptor, DDB2, triggers the dissociation of CSN from the CRL4^{DDB2} complex, thereby enhancing its activity, which is subsequently directed to NER players and core histones at the damaged sites (30,38). It was recently shown that inositol hexakisphosphate kinase-1 (IP6K1) is involved in UV damage-induced dissociation of CSN from CRL4 (40). Interestingly, IP6K1 was previously shown to be required for the HRR branch of DSB repair (60). In our study, we found that in the DSB response, CUL4A and CSN are recruited to the damaged sites with roughly similar kinetics. Analogous to the NER scenario, CRL4 and CSN might be initially complexed, with their subsequent disengagement leading to modulation of CRL4 activity and substrate receptor exchange. It will now be important to identify the substrate receptor(s) engaged by the recruited CRL4 out of the 50 or so that characterize CRL4s (56), to examine whether CSN is involved in regulation of their exchange at DSB sites, and to identify the relevant downstream CRL4 substrates.

ATM-mediated phosphorylation is an important PTM in the recruitment of functional modules from other processes to DDR service. ATM phosphorylates a vast number of downstream substrates in the DDR (11–13). Our results with knock-in mice expressing the mutant S410A Csn3 and with cells derived from them, demonstrate that an important phosphorylation can be singled out of this noisy background if it has high functional significance. It is interesting that this single phosphorylation plays a crucial role in accumulation of RAD51 at sites of DSBs, suggesting that it directly impacts the deep end-resection which is a pre-requisite for HRR. Notably, putative phosphorylation of Ser410 of CSN3 was noticed in two proteomic screens that studied phosphoproteome dynamics in response to IR (12) or to the topoisomerase II inhibitor, etoposide, a DSB inducer (61). Our data, together with the visibility of this phosphorylation in proteomic screens, mark it as a highly significant event in the DSB response in general. Recent mass-spectrometric analysis of CSN subunits after treatment of cells with UV radiation suggested that several sites are phosphorylated on CSN in that context too, but these sites were not further validated and their functional significance was not examined (62). It will not be surprising, however, if this modification shapes CSN's action in the nucleotide excision repair pathway as well.

Our data do not point to Ser410 phosphorylation as important for CSN recruitment to sites of DNA damage; thus,

its functional significance should be sought in the possible modulation of CSN's activity through highly dynamic engagement with its neddylation substrates (29,63). ATM typically phosphorylates more than one protein in a pathway and even within the same protein complex (11). Indeed, in the phosphoproteomic screen for ATM/ATR targets carried out by Matsuoka *et al.* (12), Ser232 of CSN subunit 7A was a hit, in addition to Ser410 of CSN3. Importantly, both serine residues are located in the carboxy-termini of the corresponding CSN subunits. The recent elucidation of CSN structure by Lingaraju *et al.* (24) revealed that the carboxy termini of all CSN subunits, which typically contain α -helices, protrude out of the main body of the CSN particle and together form a helical bundle. Thus, both ATM-mediated phosphorylations of CSN fall within this helical bundle. Lingaraju *et al.* (24) suggested that the helical bundle enables the catalytic subunit, CSN5, to sense the assembly state of CSN and become activated in the presence of a CRL substrate. We assume, therefore, that together, these phosphorylations affect the substrate recognition of CSN in the microenvironment of the protein hubs that assemble at sites of DNA damage. CSN's multi-pronged regulation of CRL architecture (28) may further impact the substrate receptor exchange of the interacting CRL, and subsequently, the ubiquitylation of specific proteins by that CRL. Notably, in the CSN structure, CSN3, which is an ATM target, and CSN8, which anchors ATM to CSN, are positioned adjacent to each other and close to the substrate receptor in the CSN-bound CRL (24). Work is in progress to identify the substrate receptor in the fraction of the CRL4 complex that is recruited to serve the DDR, and the downstream substrate of this CRL4 fraction.

All this converges to meticulous regulation of CRL4 at DSB sites, within the protein conglomerates that span these lesions. Such fine regulation of protein ubiquitylation agrees with the growing notion that this PTM must be carefully fine-tuned in the DDR and is therefore subjected to delicate checks and balances (7). In this context, the fine interplay between CRLs and their major regulator, CSN, is emerging as an important pathway regulatory junction, safeguarding the complex system of genome stability.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Gilad Mass, Shaked Shivatsky and Alexandra Lichtenstein for invaluable technical contributions to this study, T. Halazonetis for the anti-53BP1 antibody, Ron Jachimowicz and Nicholas Thomä for critical reading of the manuscript and Ayelet Klartag for editing the text. Special thanks to Michele Pagano and his research group for comments on the data in the course of the experiments.

FUNDING

Dr. Miriam and Sheldon G. Adelson Medical Research Foundation; Israel Cancer Research Fund; Israel Science Foundation (grants no. 1900/12 and 998/14); The I-CORE

Program of the Planning and Budgeting Committee of the Israel Ministry of Education, to YS laboratory; Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2013-43255-P) and ERC Starting Grant (DSBRECA), to PH laboratory; ERC Starting Grant (NEDD8andCRLs) to TK laboratory; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico, to A.C.-G. YS is a Research Professor of the Israel Cancer Research Fund. Funding for open access charge: Donation to our lab.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Thompson, L.H. (2012) Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat. Res.*, **751**, 158–246.
- Sirbu, B.M. and Cortez, D. (2013) DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a012724.
- Goodarzi, A.A. and Jeggo, P.A. (2013) The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv. Genet.*, **82**, 1–45.
- Lukas, J., Lukas, C. and Bartek, J. (2011) More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 1161–1169.
- Altmeyer, M. and Lukas, J. (2013) To spread or not to spread—chromatin modifications in response to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **23**, 156–165.
- Polo, S.E. and Jackson, S.P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.*, **25**, 409–433.
- Panier, S. and Durocher, D. (2013) Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 661–672.
- Jackson, S.P. and Durocher, D. (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol. Cell*, **49**, 795–807.
- Aparicio, T., Baer, R. and Gautier, J. (2014) DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, **19**, 169–175.
- Shiloh, Y. (2014) ATM: Expanding roles as a chief guardian of genome stability. *Exp. Cell Res.*, **329**, 154–61.
- Shiloh, Y. and Ziv, Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 197–210.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R. 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y. et al. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, **316**, 1160–1166.
- Bensimon, A., Schmidt, A., Ziv, Y., Elkon, R., Wang, S.Y., Chen, D.J., Aebersold, R. and Shiloh, Y. (2010) ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Sci. Signal.*, **3**, rs3.
- Bensimon, A., Aebersold, R. and Shiloh, Y. (2011) Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett.*, **585**, 1625–1639.
- Kong, X., Shen, Y., Jiang, N., Fei, X. and Mi, J. (2011) Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell Signal.*, **23**, 1273–1280.
- Chen, B.P., Li, M. and Asaithamby, A. (2012) New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Lett.*, **327**, 103–110.
- Errico, A. and Costanzo, V. (2012) Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **47**, 222–235.
- Marechal, A. and Zou, L. (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, **5**, a012716.
- Nezames, C.D. and Deng, X.W. (2012) The COP9 signalosome: its regulation of cullin-based E3 ubiquitin ligases and role in photomorphogenesis. *Plant Physiol.*, **160**, 38–46.
- Lee, M.H., Zhao, R., Phan, L. and Yeung, S.C. (2011) Roles of COP9 signalosome in cancer. *Cell Cycle*, **10**, 3057–3066.
- Chamovitz, D.A. (2009) Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. *EMBO Rep.*, **10**, 352–358.
- Yan, J., Walz, K., Nakamura, H., Carattini-Rivera, S., Zhao, Q., Vogel, H., Wei, N., Justice, M.J., Bradley, A. and Lupski, J.R. (2003) COP9 signalosome subunit 3 is essential for maintenance of cell proliferation in the mouse embryonic epiblast. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 6798–6808.
- Tomoda, K., Yoneda-Kato, N., Fukumoto, A., Yamanaka, S. and Kato, J.Y. (2004) Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice. *J. Biol. Chem.*, **279**, 43013–43018.
- Lingaraju, G.M., Bunker, R.D., Cavadini, S., Hess, D., Hassiepen, U., Renatus, M., Fischer, E.S. and Thoma, N.H. (2014) Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature*, **512**, 161–165.
- Sarikas, A., Hartmann, T. and Pan, Z.Q. (2011) The cullin protein family. *Genome Biol.*, **12**, 220.
- Hua, Z. and Vierstra, R.D. (2011) The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 299–334.
- Zhao, Y. and Sun, Y. (2013) Cullin-RING Ligases as attractive anti-cancer targets. *Curr. Pharmaceut. Des.*, **19**, 3215–3225.
- Lydeard, J.R., Schulman, B.A. and Harper, J.W. (2013) Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep.*, **14**, 1050–1061.
- Enchev, R.I., Scott, D.C., da Fonseca, P.C., Schreiber, A., Monda, J.K., Schulman, B.A., Peter, M. and Morris, E.P. (2012) Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN. *Cell Rep.*, **2**, 616–627.
- Fischer, E.S., Scrima, A., Bohm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G.M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F. et al. (2011) The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell*, **147**, 1024–1039.
- Schmalzer, T. and Dubiel, W. (2010) Control of Denedylation by the COP9 Signalosome. *Sub-cell. Biochem.*, **54**, 57–68.
- Zemla, A., Thomas, Y., Kedziora, S., Knebel, A., Wood, N.T., Rabut, G. and Kurz, T. (2013) CSN- and CAND1-dependent remodelling of the budding yeast SCF complex. *Nat. Commun.*, **4**, 1641.
- Wu, S., Zhu, W., Nhan, T., Toth, J.I., Petroski, M.D. and Wolf, D.A. (2013) CAND1 controls in vivo dynamics of the cullin 1-RING ubiquitin ligase repertoire. *Nat. Commun.*, **4**, 1642.
- Pierce, N.W., Lee, J.E., Liu, X., Sweredoski, M.J., Graham, R.L., Larimore, E.A., Rome, M., Zheng, N., Clurman, B.E., Hess, S. et al. (2013) Cand1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell*, **153**, 206–215.
- Scharer, O.D. (2013) Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, **5**, a012609.
- Hannss, R. and Dubiel, W. (2011) COP9 signalosome function in the DDR. *FEBS Lett.*, **585**, 2845–2852.
- van Cuijk, L., Vermeulen, W. and Marteijn, J.A. (2014) Ubiquitin at work: the ubiquitous regulation of the damage recognition step of NER. *Exp. Cell Res.*, **329**, 101–109.
- Scrima, A., Fischer, E.S., Lingaraju, G.M., Bohm, K., Cavadini, S. and Thoma, N.H. (2011) Detecting UV-lesions in the genome: The modular CRL4 ubiquitin ligase does it best! *FEBS Lett.*, **585**, 2818–2825.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K. and Nakatani, Y. (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, **113**, 357–367.
- Rao, F., Xu, J., Khan, A.B., Gadalla, M.M., Cha, J.Y., Xu, R., Tyagi, R., Dang, Y., Chakraborty, A. and Snyder, S.H. (2014) Inositol hexakisphosphate kinase-1 mediates assembly/disassembly of the CRL4-signalosome complex to regulate DNA repair and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 16005–16010.
- Golding, S.E., Rosenberg, E., Valerie, N., Hussaini, I., Frigerio, M., Cockcroft, X.F., Chong, W.Y., Hummersone, M., Rigoreau, L., Menear, K.A. et al. (2009) Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 2894–2902.
- Leahy, J.J., Golding, B.T., Griffin, R.J., Hardcastle, I.R., Richardson, C., Rigoreau, L. and Smith, G.C. (2004) Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 6083–6087.
- Moyal, L., Lerenthal, Y., Gana-Weisz, M., Mass, G., So, S., Wang, S.Y., Eppink, B., Chung, Y.M., Shalev, G., Shema, E. et al. (2011)

- Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell*, **41**, 529–542.
44. Gomez-Cabello, D., Jimeno, S., Fernandez-Avila, M.J. and Huertas, P. (2013) New tools to study DNA double-strand break repair pathway choice. *PLoS One*, **8**, e77206.
 45. Certo, M.T., Ryu, B.Y., Annis, J.E., Garibov, M., Jarjour, J., Rawlings, D.J. and Scharenberg, A.M. (2011) Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat. Methods*, **8**, 671–676.
 46. Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A. and Huertas, P. (2014) BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep.*, **9**, 451–459.
 47. Liu, P., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2003) A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res.*, **13**, 476–484.
 48. Levy-Barda, A., Lerenthal, Y., Davis, A.J., Chung, Y.M., Essers, J., Shao, Z., van Vliet, N., Chen, D.J., Hu, M.C., Kanaar, R. *et al.* (2011) Involvement of the nuclear proteasome activator PA28gamma in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, **10**, 4300–4310.
 49. Huertas, P. and Jackson, S.P. (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9558–9565.
 50. Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q. *et al.* (2010) 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 688–695.
 51. You, Z. and Bailis, J.M. (2010) DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.*, **20**, 402–409.
 52. Symington, L.S. (2014) End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, **6**, a016436.
 53. Symington, L.S. and Gautier, J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 247–271.
 54. Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A. and Huertas, P. (2014) BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep.*, **9**, 451–459.
 55. Nawrocki, S.T., Griffin, P., Kelly, K.R. and Carew, J.S. (2012) MLN4924: a novel first-in-class inhibitor of NEDD8-activating enzyme for cancer therapy. *Expert Opin. Invest. Drugs*, **21**, 1563–1573.
 56. Sharma, P. and Nag, A. (2014) CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. *Open Biol.*, **4**, 130217.
 57. Li, J.M. and Jin, J. (2012) CRL Ubiquitin Ligases and DNA Damage Response. *Front. Oncol.*, **2**, 29.
 58. Scully, R. and Xie, A. (2013) Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.*, **750**, 5–14.
 59. Panier, S. and Boulton, S.J. (2014) Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 7–18.
 60. Jadav, R.S., Chanduri, M.V., Sengupta, S. and Bhandari, R. (2013) Inositol pyrophosphate synthesis by inositol hexakisphosphate kinase 1 is required for homologous recombination repair. *J. Biol. Chem.*, **288**, 3312–3321.
 61. Beli, P., Lukashchuk, N., Wagner, S.A., Weinert, B.T., Olsen, J.V., Baskcomb, L., Mann, M., Jackson, S.P. and Choudhary, C. (2012) Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Mol. Cell*, **46**, 212–225.
 62. Fuzesi-Levi, M.G., Ben-Nissan, G., Bianchi, E., Zhou, H., Deery, M.J., Lilley, K.S., Levin, Y. and Sharon, M. (2014) Dynamic regulation of the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, **34**, 1066–1076.
 63. Emberley, E.D., Mosadeghi, R. and Deshaies, R.J. (2012) Deconjugation of Nedd8 from Cul1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylated SCF by a noncatalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, **287**, 29679–29689.

Speed matters: How subtle changes in DNA end resection rate affect repair

Pablo Huertas & Andrés Cruz-García

To cite this article: Pablo Huertas & Andrés Cruz-García (2015) Speed matters: How subtle changes in DNA end resection rate affect repair, *Molecular & Cellular Oncology*, 2:3, e982964

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.4161/23723556.2014.982964>



© 2015 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC© Pablo Huertas and Andrés Cruz-García



Published online: 06 May 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 415



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Speed matters: How subtle changes in DNA end resection rate affect repair

Pablo Huertas^{1,2,*} and Andrés Cruz-García^{1,2}

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER); Sevilla, Spain; ²Departamento de Genética; Universidad de Sevilla; Sevilla, Spain

Keywords: BRCA1, CtIP, DNA end resection, DNA repair/recombination

The contribution of BRCA1 (breast cancer 1) to the repair of broken DNA is well established, but its real role at the molecular level is less well understood. By developing a new high-resolution, single-molecule technique, we have now shown that BRCA1 accelerates the processing of DNA breaks that subsequently engage in homologous recombination.

DNA end resection consists of nucleolytic degradation with 5'–3' polarity of a single strand of DNA on each side of a DNA break.¹ This step is critical for repairing broken DNA molecules, as the single-stranded DNA generated by DNA end resection is the substrate for the error-free repair pathway known as homologous recombination.^{1,2} Proper DNA repair is essential to avoid cancer development, thus it is not surprising that mutations in genes involved in homologous recombination are common in many malignancies,³ including the genes encoding BRCA1 (breast cancer 1) or RBBP8 (Retinoblastoma Binding Protein 8), best known as CtIP (CtBP-Interacting Protein).^{4,5} In cancer development, as in many other natural and pathological biological processes, subtle defects can accumulate to yield relevant differences in the final outcome. However, the techniques currently available for studying these defects have limited the differences that can be measured. This is exemplified by studies to determine the contribution of the tumor suppressor gene *BRCA1* to DNA end resection: traditional techniques have both implicated and ruled out a role for BRCA1 protein (through its interaction with CtIP) in resection.^{6–8} We reasoned that these apparent contradictions were mainly caused by technical limitations.

Briefly, DNA resection in higher eukaryotes has previously been analyzed by the focal accumulation of the single-stranded DNA-protecting replication protein A (RPA) complex. However, rather than reflecting differences in the length of the resected DNA, this method reveals whether the ssDNA was long enough to accommodate a sufficient number of RPA complexes to form a visible focus (Fig. 1). This inability to discriminate between subtle differences in DNA resection has rendered a rather simplistic view within the field, with proteins categorized into 2 discrete groups as either essential or irrelevant for resection (Fig. 1).

With the application of a novel high-resolution technique, we can now observe shades of gray within this overly simplified black-and-white picture.⁹ By modifying the DNA combing technique used for high-resolution replication analyses, we have created a new assay that can measure progression of resection at the level of individual DNA fibers.⁹ We call this new approach Single Molecule Analysis of Resection Tracks, or SMART. By applying this technique, we have now begun to observe subtle effects in DNA end resection that were previously ignored but are relevant to the repair process in the long term. The SMART approach has the potential to drastically change the way we study resection, yet it is

important to point out that the two techniques are complementary. Specifically, the SMART technique measures the speed of resection of the breaks that have initiated resection but does not take into consideration whether the number of resected breaks is the same. On the other hand, observing RPA foci formation better reflects the number of breaks that are resected, but not how fast they are processed.

With regard to the role of BRCA1, we could now characterize the function of the protein in DNA end resection in more detail. We clearly observed that resection takes place in the absence of BRCA1 but at a slower pace.⁹ Thus, we conclude that the role of BRCA1 in DNA resection is to increase the processivity of this process. In fact, such a role is completely dependent on the interaction of BRCA1 with CtIP.⁹ This subtle mechanistic effect, which might seem irrelevant, can in fact explain the long-term consequences of *BRCA1* mutations for cancer development.

The length of resected DNA regulates the mechanism of repair that will act on a DNA break.^{1,2,10} Whereas classic non-homologous end joining can only occur on breaks with little or no processing, microhomology-mediated end joining requires resection to expose short tracks of homology.¹⁰ Moreover, resection is essential for all types of recombinational repair,

© Pablo Huertas and Andrés Cruz-García

*Correspondence to: Pablo Huertas; Email: pablo.huertas@cabimer.es

Submitted: 10/29/2014; Revised: 10/29/2014; Accepted: 10/29/2014

<http://dx.doi.org/10.4161/23723556.2014.982964>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

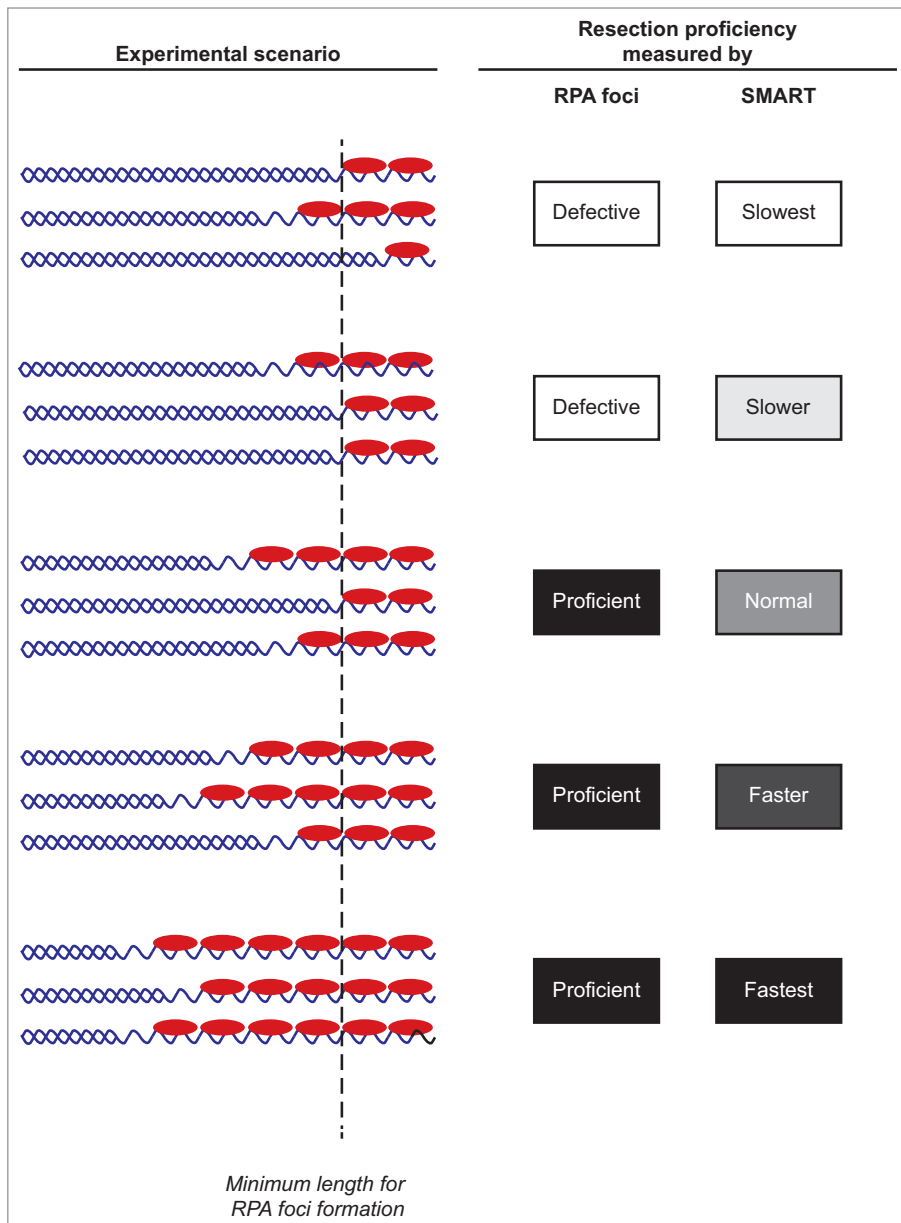


Figure 1. Single molecule analysis of resection tracks (SMART). Comparison of the sensitivity of RPA foci versus SMART as a measurement of DNA end resection. Five different hypothetical experimental scenarios with increasing levels of resection are shown. For RPA (replication protein A) foci, only 2 categories could be established: cases that form RPA foci (proficient) and those in which the length of resected DNA is too short to accumulate enough RPA to form a visible focus (defective). However, using the SMART (Single Molecule Analysis of Resection Tracks) technique, a more accurate measurement of the extent of resection in each case can be established, allowing a greater number of differences to be observed. Note that not all breaks in each population are resected equally, therefore RPA foci formation reflects the most common occurrence in each cell. In contrast, the SMART technique measures each single resection event in a population.

but each subpathway requires different amounts of resected DNA.^{1,2,10} For example, limited resection will enable the newly synthesized DNA to catch the resected DNA to form a Holliday Junction, hence favoring recombination in which crossovers might occur.^{1,2,10} On the other

hand, extensive resection will increase the chances of non-allelic repeats situated in the same chromosome to become engaged in the mutagenic recombination pathway known as single-strand annealing (SSA) that will always cause deletions in the chromosomes.^{1,2,10}

Beyond this characterization of the role of BRCA1 in DNA end resection and recombination, our work has yielded other observations with implications in our research field. For example, a main conclusion of our work is that resection in higher eukaryotes resembles the mechanism observed in yeast more closely than previously thought.⁹ Thus, CtIP, which was previously described as totally essential for DNA end resection,¹ acts like its yeast counterparts Sae2 (sporulation in the absence of SPO11 2) in *Saccharomyces cerevisiae* and Ctp1 (CtIP-related protein) in *Schizosaccharomyces pombe*: it facilitates resection, but resection might still occur at a slower rate in its absence.^{1,9} Moreover, the availability of a new high-resolution technique will expand our simplistic view of the process by allowing us to discover subtle effects in DNA end resection that have previously been ignored. This includes the first opportunity to measure resection rates. Another scenario that was previously impossible to study but can now be addressed is when resection is limited to the same number of cells but progresses either faster or slower. It would be impossible to observe such effects by simply scoring the number of cells that show RPA foci, but these differences will be readily observed using SMART. Thus, this new technique could open an entire new field of possibilities for study.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We would like to thank Ana López-Saavedra, Cristina Cepeda-García, and Sonia Jimeno for critical reading, and Veronica Raker for style corrections.

Funding

This work was funded by a R+D+I grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2010-14877). AC-G is funded by a PhD fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

References

1. Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:11–6; PMID:0051983; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1710>
2. Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2010; 44:113–39; PMID:20690856; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>
3. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; 481:287–94; PMID:22258607; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10760>
4. Silver DP, Livingston DM. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer discovery* 2012; 2:679–84; PMID:22843421; <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0221>
5. Soria-Bretones I, Sáez C, Ruíz-Borrego M, Japón MA, Huertas P. Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer. *Cancer Med* 2013:n/a-n/a
6. Nakamura K, Kogame T, Oshiumi H, Shinohara A, Sumitomo Y, Agama K, Pommier Y, Tsutsui KM, Tsutsui K, Hartsuiker E, et al. Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair. *PLoS Genetics* 2010; 6:e1000828; PMID:20107609; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000828>
7. Reczek CR, Szabolcs M, Stark JM, Ludwig T, Baer R. The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. *J Cell Biol* 2013; 201:693–707; PMID:23712259; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201302145>
8. Yun MH, Hiom K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 2009; 459:460–3; PMID:19357644; <http://dx.doi.org/10.1038/nature07955>
9. Cruz-García A, Lopez-Saavedra A, Huertas P. BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection. *Cell Rep* 2014; PMID:25310973
10. Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* 2009; 423:157–68; PMID:19772495; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20090942>