



*Regulación de la reparación de los cortes de  
doble cadena en el ADN: Papel de la  
nedilación de proteínas*

**MARÍA JESÚS FERNÁNDEZ ÁVILA**

**Tesis Doctoral**

**Universidad de Sevilla**

**2016**







# *Regulación de la reparación de los cortes de doble cadena en el ADN: Papel de la nedilación de proteínas*

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 Biología, por la Licenciada María Jesús Fernández Ávila.

Sevilla, Mayo de 2016

La doctoranda,

María Jesús Fernández Ávila

El Tutor

Andrés Aguilera López

Los directores de Tesis

Pablo Huertas Sánchez

Sonia Jimeno González



# ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INESTABILIDAD GENÓMICA.....</b>	<b>15</b>
<b>2. TIPOS DE DAÑOS EN EL ADN Y SUS CAUSAS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN.....</b>	<b>19</b>
3.1. REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR, MISMATCH REPAIR).....	19
3.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (BER, <i>BASE EXCISION REPAIR</i> ).....	19
3.3. REPARACIÓN DE LOS DAÑOS DE CADENA SENCILLA (SSBR, <i>SINGLE STRAND BREAKS REPAIR</i> ).....	19
3.4. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER, <i>NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR</i> ).....	20
3.5. TLS (TRANS-LESION SYNTESIS).....	21
3.6. REPARACIÓN DE LOS ENLACES INTERCATENARIOS.....	21
3.7. REPARACIÓN DE LOS DSBs.....	21
<b>4. MECANISMOS DE REPARACION DE LOS DSBs.....</b>	<b>22</b>
4.1. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS DSBs.....	22
4.2. REPARACIÓN POR UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS (NHEJ).....	28
4.2.1. Fase de Reconocimiento.....	29
4.2.2. Procesamiento.....	31
4.2.3. Finalización.....	32
4.3. MECANISMO DE REPARACIÓN POR NHEJ ALTERNATIVO (ALT-NHEJ) O UNIÓN DE EXTREMOS MEDIADOS POR MICROHOMOLOGÍA (MMEJ).....	33
4.4. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	33
4.4.1. Resección.....	36
4.4.2. Invasión.....	38
4.4.3. Resolución.....	40
4.4.4. SSA.....	40
<b>5. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES (PTMs) EN LA REPARACIÓN DE LOS DSB.....</b>	<b>41</b>
5.1 MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES CON UBIQUITINA.....	41
5.1.1 La ubiquitina y su conjugación a los sustratos.....	41
5.1.2 Función de la ubiquitinación en la reparación de los DSBs .....	44
5.2 Modificaciones post-traduccionales con SUMO.....	45
5.3 Modificaciones post-traduccionales con NEDD8.....	47
5.3.1 NEDD8.....	47
5.3.2 Las denedilasas.....	50
5.3.3 Papel de la nedilación en la respuesta al daño en el ADN.....	52
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>

**RESULTADOS.....59****1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE REPARACIÓN *IN VIVO* SEE-SAW REPORTER (SSR). DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN ESCRUTINIO CON UNA LIBRERÍA DE esiRNAs Y EL SISTEMA SSR2.0.....61**

1.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA SSR.....	61
1.2. SENSIBILIDAD DEL SISTEMA SSR AL SILENCIAMIENTO DE GENES IMPLICADOS EN REPARACIÓN (NHEJ/HR).....	65
1.3. EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL DAÑO DEL ADN EN EL SISTEMAS SSR.....	68
1.4. DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO DE ESCRUTINIO MASIVO DE GENES QUE AFECTAN EL EQUILIBRIO NHEJ/HR USANDO UNA LIBRERÍA DE ESIRNAS EN UN FORMATO DE PLACA DE CULTIVO DE 96 POCILLOS.....	72
1.5. ESTABLECIMIENTO DEL FLUJO DE TRABAJO PARA EL ESCRUTINIO (WORKFLOW).....	78

**2. PAPEL DE LA NEDILACIÓN EN LA REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ENTRE NHEJ Y HR.....81**

2.1. EFECTO DE UN CONJUNTO DE INHIBIDORES UTILIZADOS EN ENSAYOS CLÍNICOS Y RELACIONADOS CON LA DDR SOBRE EL BALANCE ENTRE REPARACIÓN POR NHEJ Y HR.....	81
2.2. LA NEDILACIÓN INHIBE LA RESECCIÓN DEL ADN Y POR TANTO LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	83
2.3. LA NEDILACIÓN ES UN PROCESO QUE ESTÁ IMPLICADO EN LA RESECCIÓN MEDIADA POR CtIP.....	85
2.4. MEDIADA POR CtIP QUE AFECTA A LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS.....	87
2.5. LA INTERACCIÓN ENTRE CtIP Y BRCA1 ESTÁ CONTROLADA POR NEDILACIÓN.....	88
2.6. LA PROTEÍNA E3 LIGASA RNF111 Y LA PROTEÍNA E2 UBE2M BLOQUEAN LA RESECCIÓN DEL ADN GENERANDO UN DESEQUILIBRIO EN EL RATIO NHEJ/HR.....	91
2.7. LAS DENEDILASAS CSN1 Y NEDP1 MEDIAN EN LA REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA DE LOS CORTES DE DOBLE CADENA.....	95
2.8. LA NEDILACIÓN ESTÁ IMPLICADA EN LA ELECCIÓN DE LA RUTA PARA REPARAR LOS DAÑOS PRODUCIDOS POR ROTURAS DE DOBLE CADENA.....	99

**DISCUSIÓN..... 103****CONCLUSIONES..... 120**

**MATERIALES Y MÉTODOS..... 124****1. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR..... 127**

1.1 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	127
1.1.1. Subcultivado.....	130
1.1.2. Crioconservación .....	130
1.1.3. Cultivo en presencia de inhibidores.....	130
1.2. TRANSFECCIÓN.....	131
1.2.1. siRNAs.....	131
1.2.2. DNA plasmídico.....	132
1.2.2.1. Fugene.....	132
1.2.2.2. Fosfato Cálcico .....	133
1.3. PRODUCCIÓN Y TRANSDUCCIÓN VIRAL.....	134
1.3.1. Transducción en dos pasos.....	134
1.3.2. Transducción en un paso.....	135
1.4. ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR (CLONOGÉNICOS).....	135
1.5. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	136
1.5.1. Análisis del Ciclo Celular.....	136
1.5.2. Titulación de la producción lentiviral.....	136
1.5.3. Análisis de proteínas fluorescentes por FACs.....	137
1.6. ENSAYOS DE REPARACIÓN <i>IN VIVO</i> .....	137
1.6.1. Descripción de los Sistemas de Reparación <i>in vivo</i> .....	138
1.6.2. Ensayos de Reparación con el sistema SSR.....	140
1.6.2.1. Con inhibidores.....	141
1.6.2.2. shRNAs.....	141
1.6.2.3 siRNAs.....	141
1.6.3. Ensayos de Reparación con los Sistemas DR-GFP, EJ5 y SA-GFP en presencia de MLN4924.....	142
1.7. INDUCCIÓN DEL DAÑO CELULAR MEDIANTE IRRADIACIÓN.....	143

**2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR..... 143**

2.1. MANIPULACIÓN DEL ADN.....	143
2.1.1. Amplificación de ADN plasmídico.....	143
2.1.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	144
2.1.3. Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	144
2.2. ANÁLISIS DEL ARN.....	144
2.3.1. Extracción de ARN.....	144
2.3.2. Cuantificación de ARN total.....	144
2.3.3. Síntesis de cDNA.....	145
2.3.4. PCR Cuantitativa.....	145

2.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	147
2.3.1. Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	147
2.3.2. Extracción de proteínas en condiciones nativas.....	147
2.3.3. Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop.....	148
2.3.4. Cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford.....	148
2.3.6. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	148
2.3.7. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.....	148
2.3.8. Inmunodetección de proteínas (Western blot).....	148
2.3.9. Inmunoprecipitación (IP) de proteínas.....	149
<b>3. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....</b>	<b>151</b>
3.1. INMUNOFLUORESCENCIA PARA FOCOS DE RPA Y $\gamma$ H2AX.....	151
3.2. INMUNOFLUORESCENCIA PARA FOCOS DE RIF1.....	153
3.3. ESCRUTINIO MASIVO EN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES IMAGEXPRESS MICRO (MOLECULAR DEVICES).....	154
3.3.1. Adquisición de imágenes en el microscopio IMAGEXPRESS.....	154
3.3.2. Flujo de trabajo para el procesamiento y almacenaje de datos.....	155
3.3.3. Análisis de imágenes mediante el software MetaXpress.....	155
<b>4. AUTOMATIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO CELULAR MEDIANTE EL ROBOT MICROLAB STAR DE HAMILTON.....</b>	<b>157</b>
4.1. PROTOCOLO DÍA 0: DILUCIÓN DE LOS esiRNA EN MEDIO OPTI-MEM.....	157
4.2. PROTOCOLO DÍA1: TRANSFECCIÓN REVERSA.....	157
4.3. PROTOCOLO DÍA1: RENOVACIÓN MEDIO DE CULTIVO.....	158
4.4. PROTOCOLO DÍA 4: LAVADOS DE LOS CULTIVOS Y FIJACIÓN.....	158
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>158</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>180</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura I1.** Esquema de los agentes más comunes causantes de daños en el ADN y los tipos de reparación.
- Figura I2.** La respuesta al daño en el ADN.
- Figura I3.** Representación esquemática de los diferentes modificadores post-traduccionales implicados en la señalización de los DBSs.
- Figura I4.** El NHEJ en células de mamíferos.
- Figura I5.** Mecanismos de reparación de los DBSs mediante homología de secuencia en células mamíferos.
- Figura I6.** Modelo de circuito de control para la elección de reparación de los DSBs.
- Figura I7.** Esquema del ciclo de la ubiquitina.
- Figura I8.** Homología de secuencias de NEDD8 y el ciclo de nedilación/denedilación.
- Figura I9.** Estructura química del MLN4924.
- Figura I10.** Esquema sobre las distintas rutas moleculares según las enzimas E2-RING de la cascada de nedilación.
- Figura R1.** Representación esquemática de los sistemas SSR1.0 y SSR2.0.
- Figura R2.** Caracterización inicial de los sistemas SSR.
- Figura R3.** Niveles de silenciamiento obtenidos por depleción con shRNAs de genes que afectan el equilibrio entre la reparación por NHEJ y HR.
- Figura R4.** Sensibilidad de los sistemas SSR al silenciamiento de genes de reparación por NHEJ y de genes implicados en la resección del ADN.
- Figura R5.** Distribución del ciclo celular en células U2OS deplecionadas para diversos genes mediante shRNAs.
- Figura R6.** Niveles de silenciamiento obtenidos por depleción con shRNAs de genes que afectan a la respuesta al daño en el ADN.
- Figura R7.** Sensibilidad de los sistemas SSR a defectos en la respuesta al daño en el ADN (DDR).
- Figura R8.** Distribución del ciclo celular en células U2OS deplecionadas para diversos genes mediante shRNAs.
- Figura R9.** Ensayos de transfección reversa para la optimización del protocolo y su aplicación en el escrutinio masivo de genes.
- Figura R10.** Selección del tiempo de formación de los complejos (lipofectamina RNAimax+esiRNA).
- Figura R11.** Ensayos de dispensación celular automatizados mediante el empleo del robot MicroLab Star de Hamilton.
- Figura R12.** Representación esquemática del flujo de trabajo establecido para el escrutinio de una librería de esiRNAs.
- Figura R13.** Escrutinio con pequeños inhibidores que alteran el ratio NHEJ/HR.
- Figura R14.** Comprobación del tratamiento con MLN4924 mediante el análisis del ciclo celular y del patrón de nedilación global de las proteínas.
- Figura R15.** Efecto del inhibidor de la nedilación MLN4924 sobre la resección del ADN.

**Figura R16.** La nedilación de proteínas inhibe la resección y la recombinación homóloga del ADN mediadas por CtIP.

**Figura R17.** La depleción de CtIP aumenta la supervivencia de células tratadas con el inhibidor de la nedilación MLN4924.

**Figura R18.** CtIP y BRCA1 interaccionan con proteínas nediladas.

**Figura R19.** La formación del complejo entre CtIP y BRCA1 está regulado por su interacción con proteínas nediladas.

**Figura R20.** La cantidad de CtIP co-inmunoprecipitada con BRCA1 es dependiente de nedilación.

**Figura R21.** Papel de RNF111/UBE2M en la elección de la ruta de reparación de los DSBs.

**Figura R22.** Papel de RNF111/UBE2M en la resección del ADN.

**Figura R23.** Papel de RNF111 y UBE2M en la interacción entre CtIP y BRCA1.

**Figura R24.** Silenciamiento de las denedilasas COP9 signalosoma y NEDP1 mediante siRNAs.

**Figura R25.** Papel del COP9 signalosoma en la elección de la ruta de reparación de los DSBs.

**Figura R26.** Papel del COP9 signalosoma y la denedilasa NEDP1 en la resección del ADN.

**Figura R27.** Niveles de nedilación tras la depleción de NEDP1.

**Figura R28.** Papel de la CUL4A en la elección de la ruta de reparación de los DSBs.

**Figura R29.** Efecto de la inhibición de la nedilación de proteínas en el sistema de reparación *in vivo* DR-GFP.

**Figura R30.** Efecto de la inhibición de la nedilación de proteínas en el sistema de reparación *in vivo* SA-GFP.

**Figura R31.** Efecto de la inhibición de la nedilación de proteínas en el sistema de reparación *in vivo* EJ5.

**Figura D1.** La nedilación actúa como un reloj molecular para la resección y la elección de la ruta de reparación.

**Figura D2.** La extensión de la resección determina la reparación por homología de secuencia realizada.

**Figura M1.** Representación gráfica de los Sistemas de Reparación *in vivo* utilizados en esta tesis.

**Tabla I1.** Enfermedades asociadas a defectos en los genes de DDR.

**Tabla I2.** Tipos de lesiones generadas en el ADN por agentes endógenos y exógenos.

**Tabla M1.** Líneas celulares utilizadas en esta tesis.

**Tabla M2.** shRNAs utilizados en esta tesis.

**Tabla M3.** Inhibidores que componen la minibrería de compuestos químicos con potencial terapéutico utilizados en esta tesis.

**Tabla M4.** siRNAs utilizados en esta tesis.

**Tabla M5.** Plásmidos utilizados en esta tesis.

**Tabla M6.** Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

**Tabla M7.** Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.

**Tabla M8.** Anticuerpos Secundarios usados en esta tesis.

**Tabla M9.** Valores para los parámetros de cuantificación del sistema SSR en el software MetaXpress



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>Alt-NHEJ</b>	Alternative nonhomologous end joining
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated
<b>ATR</b>	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
<b>ATRIP</b>	ATR-interacting protein
<b>BER</b>	Base excision repair
<b>BFP</b>	Blue fluorescent protein
<b>BIR</b>	Break-induced repair
<b>BLM</b>	Bloom's syndrome
<b>BRCA1</b>	Breast cancer 1
<b>BRCT</b>	BRCA1 C-terminal domain
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CPD</b>	Cyclobutane pyrimidine dimer
<b>CPT</b>	Camptothecin
<b>CRLs</b>	Cullin-RING Ubiquitin ligases
<b>CRS</b>	Class-switch recombination
<b>CSN</b>	COP9 signalosome
<b>DDR</b>	DNA damage response
<b>dNTP</b>	Deoxynucleotide triphosphate
<b>DSBs</b>	Double-strand breaks
<b>DUBs</b>	Deubiquitylating enzymes
<b>esiRNA</b>	Endoribonuclease-prepared siRNA
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>FHA</b>	Fork headed associated
<b>G</b>	Glicine
<b>GCRs</b>	Gross chromosomal rearrangements
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GG-NER</b>	Global genomic-NER
<b>HJ</b>	Holliday junction
<b>HNPCC</b>	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
<b>HR</b>	Homologous recombination
<b>ICLs</b>	Interstrand crosslinks
<b>IR</b>	Ionising radiation
<b>JAMM</b>	Jab1/Pad1/MPN+ motif
<b>L</b>	Leucine
<b>LTGC</b>	Long tract gene conversion
<b>MMC</b>	Mitomycin C
<b>MMEJ</b>	Microhomology mediated end joining
<b>MMR</b>	Mismatch repair
<b>MMS</b>	Methyl methanesulfonate
<b>MOI</b>	Multiplicity of infection
<b>NAE</b>	NEDD8 activating enzyme

<b>NEDD8</b>	Neural precursor cell expressed developmentally down regulated 8
<b>NER</b>	Nucleotide excision repair
<b>NHEJ</b>	Nonhomologous end joining
<b>PARP</b>	Poly ADP Ribose Polymerase
<b>PIKKS</b>	Phosphatidyl inositol 3-kinase-like kinases
<b>Q</b>	Glutamine
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR
<b>R</b>	Arginine
<b>RBR</b>	Ring between ring
<b>RFP</b>	Red fluorescent protein
<b>RING</b>	Really interesting new gene
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RPA</b>	Replication protein A
<b>SDSA</b>	Synthesis-dependent strand annealing
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA
<b>SIM</b>	Sumo interacting motif
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>SSA</b>	Single strand annealing
<b>SSBs</b>	Single-strand breaks
<b>ssDNA</b>	Single strand DNA
<b>SSR</b>	See-Saw Reporter
<b>STGG</b>	Short tract gene conversion
<b>STUBLs</b>	SUMO-targeted ubiquitin ligases
<b>TC-NER</b>	Transcription coupled repair-NER
<b>TLS</b>	Trans-lesion synthesis
<b>UBLs</b>	Ubiquitin-like proteins
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>XP</b>	Xeroderma pigmentosum
<b>XRCC4</b>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4

## INTRODUCCIÓN



## 1. INESTABILIDAD GENÓMICA

Durante la proliferación celular numerosos procesos necesitan ser coordinados de una manera precisa para así asegurar la preservación de la integridad del genoma y su correcta propagación. Una replicación eficiente y libre de errores en el ADN es clave para la duplicación de los cromosomas previa a su segregación (Draviam et al. 2004). La coordinación de la replicación del ADN con la detección del daño, la reparación y la progresión del ciclo celular, asegura, dentro de lo posible, la estabilidad del genoma durante las divisiones celulares minimizando la aparición de mutaciones y de reordenamientos cromosómicos (Aguilera & Gómez-González 2008). Sin embargo, aunque dichas mutaciones y reordenaciones pueden ser dañinas para la célula y el organismo, también son el origen molecular de la evolución y de la generación de variación genética (Jackson & Bartek 2009). La inestabilidad genética abarca un amplio rango de alteraciones del ADN que van desde mutaciones puntuales a reordenamientos cromosómicos. Además, la inestabilidad genómica puede tener un papel específico en la generación de variabilidad genética necesaria en determinados procesos, como es la diversificación de las inmunoglobulinas (Maizels 2005). De cualquier forma, la inestabilidad genética se asocia normalmente con desórdenes patológicos como el envejecimiento prematuro, la predisposición a varios tipos de cáncer y con algunas enfermedades hereditarias (Tabla I1) (Aguilera & Gómez-González 2008).

## 2. TIPOS DE DAÑOS EN EL ADN Y SUS CAUSAS

El ADN, como cualquier estructura viva o inerte, puede sufrir alteraciones físicas o químicas, denominadas daños. A consecuencia de estos daños, la molécula puede romperse o modificarse.

En cada una de las  $10^{13}$  células que hay en el cuerpo humano, se producen más de 10.000 lesiones en el ADN al día debido a la acción de agentes físico-químicos, que pueden ser de origen endógeno o exógeno (Jackson & Bartek 2009).

---

**Enfermedades asociadas a mutaciones en los genes de DDR  
y de reparación del ADN**

---

<b>Síndromes asociados</b>	<b>Genes mutados</b>
Xerodermia pigmentosa	XPA-XPG, Pol $\eta$
Síndrome Bloom	BLM
Predisposición a cáncer y linfomas (Deficiencia en la recombinación V(D)J)	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 polipósico hereditario)	MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2
Predisposición a cáncer de mama familiar (distinto BRCA1/2)	Chk2, MRN, ATM, PALB2
Ataxia telangiectásica	ATM
Desorden similar a Ataxia telangiectásica	MRE11
Síndrome Li-Fraumeni (sarcomas, cáncer mama y cerebro)	p53, CHEK2
Síndrome Nijmegen (NBS)	NBS1
Síndrome similar NBS	RAD50
Síndrome RIDDLE (radiosensibilidad, inmunodeficiencia, distrofia y dificultades de aprendizaje)	RNF168
Retinoblastoma	Rb
Síndrome de Seckel	ATR, CtIP, SCKL3

---

**Tabla 11. Enfermedades asociadas a defectos en los genes de DDR.** Los defectos en genes implicados en las diferentes fases de la respuesta al daño conllevan la predisposición a padecer cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otros síndromes. Tabla modificada a partir de Hartlerode & Scully 2009; Ciccia & Elledge 2010; Jackson & Bartek 2009; Aguilera & Gómez-González 2008.

Los daños generados de manera endógena son los originados como consecuencia del propio metabolismo celular (Tabla 12). Las principales fuentes de este tipo de daño son el bloqueo de la replicación o la transcripción y procesos bioquímicos como la incorporación no correcta de los dNTPs durante la replicación, la interconversión de las bases nitrogenadas por reacciones de deaminación, la pérdida de dichas bases por procesos de depurinización,

reacciones de oxidación por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas como subproductos de la respiración oxidativa o reacciones redox y las alquilaciones de las bases nitrogenadas (Ciccia & Elledge 2010).

Origen endógeno de los daños en el ADN	Tipo de lesión generada	Número de lesiones/Célula/día
Depurinización	Generación de sitioapurínico/apirimidínico	10.000
Deaminación de citosina	Transición de bases	100-500
Metilación desde S-Adenosil metionina (SAM)	3meA, 7meG, O <sup>6</sup> meG	10-600
Oxidación	8oxoG	400-1500
Origen exógeno de los daños en el ADN	Tipo de lesión generada	Número estimado de lesiones/célula
Picos de horas de luz	Dímeros de pirimidinas (6-4) fotoproductos	100.000/día
Humo de los cigarrillos	Aductos aromáticos de ADN	45-1029 (1)
Radiografía de pecho	DSBs	0,0008 (2)
Radiografía dental	DSBs	0,0002 (2)
Mamografía	DSBs	0,016 (2)
Tomografía computerizada de cuerpo	DSBs	0,28 (2)
Tomografía computerizada de cabeza	DSBs	0,08 (2)
Angioplastia coronaria	DSBs	0,88 (2)
PET scan (F <sup>18</sup> )	DSBs	0,4 (2)
Tratamiento con I <sup>131</sup>	DSBs	2.8-6
Radioterapia	DSBs	72-80 (3)
Viaje en avión	DSBs	0.0002/hr
Misión espacial (60 días)	DSBs	2
Accidente de Chernobil	DSBs	12
Bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki	DSBs	0.2-160

(1) Aductos de ADN detectados en el pulmón de fumadores que tomaban entre 1-2 paquetes de cigarrillos al día durante aproximadamente 40 años.

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

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

**Tabla 12. Tipos de lesiones generadas en el ADN por agentes endógenos y exógenos.** Clasificación de las fuentes de daño según su origen, los tipos de lesiones generadas y estimación del número de lesiones. Tabla modificada a partir de Ciccia & Elledge 2010.

Los daños generados por agentes exógenos son causados por agentes externos a la célula y al organismo en el que se encuentre dicha célula (Ciccia & Elledge 2010) (Tabla I2). Por lo general, dichos agentes tienen un carácter artificial como el tabaco, la exposición a rayos X durante las radiografías, la exposición por accidentes nucleares o a tóxicos medioambientales... Sin embargo, también hay agentes exógenos de origen natural como los rayos solares. Las radiaciones ionizantes (IR) y la radiación ultravioleta (UV) proveniente de la luz solar, son los agentes genotóxicos físicos más penetrantes y pueden inducir hasta  $10^5$  lesiones en el ADN (dímeros de pirimidinas y fotoproductos) por célula y hora de exposición (Jackson & Bartek 2009). La IR procedente de radiación cósmica y de tratamientos médicos que emplean rayos-X o radioterapia, puede inducir la oxidación de las bases nitrogenadas del ADN y generar roturas en una de las cadenas del ADN (SSBs, *single-strand breaks*) o en las dos (DSBs, *double-strand breaks*) (Hoeijmakers 2009) (Tabla I2).

Hoy en día, los agentes químicos que causan cáncer más importantes y comunes actúan infligiendo daños en el ADN, como aquellos generados como subproductos del tabaco, ya que causan una variedad de daños oxidativos en el pulmón, cavidad oral y otros tejidos adyacentes. Muchos agentes químicos usados en quimioterapia contra el cáncer actúan causando lesiones en el ADN favoreciendo la muerte de las células tumorales dado que estas células suelen ser más sensibles al daño por su capacidad replicativa y porque en muchas ocasiones son tumorales por defectos en alguna ruta de reparación del daño en el ADN. Algunos agentes químicos empleados en quimioterapia dan lugar a alquilaciones, como ocurre con el metilmetanosulfonato (MMS) y la temozolomida, que ataca los grupos alquilo de las bases; agentes como la mitomicina C (MMC), el cisplatino, el psoraleno y el gas mostaza inducen enlaces covalentes entre bases dentro de la misma hebra de ADN (*intrastrand crosslinks*) o entre bases de diferentes hebras de ADN (*interstrand crosslinks* o ICLs) (Ciccia & Elledge 2010). Otros agentes químicos tales como los inhibidores de las topoisomerasas I y II, camptotecina (CPT) y etopósido respectivamente, inducen la formación de SSBs o DSBs por generación de una unión covalente entre el ADN y las topoisomerasas durante la replicación del ADN (Heisig 2009).



### 3. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

La amplia diversidad de tipos de lesiones en el ADN que se pueden producir hace que se necesiten múltiples y diversos mecanismos de reparación más o menos especializados (Figura I1) (Jackson & Bartek 2009).

#### 3.1. REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR, *MISMATCH REPAIR*)

Los emparejamientos erróneos de bases pueden darse durante la replicación normal del ADN y repararse a través de la ruta de MMR mediante la cual, las bases erróneamente emparejadas son reemplazadas por las bases correctas. Una incisión en una de las cadenas elimina el lazo generado por el emparejamiento erróneo y posteriormente la acción de actividades nucleasa, polimerasa y ligasa reparan el ADN (Jiricny 2006). Defectos hereditarios en los genes de MMR dan lugar a patologías como el síndrome de Lynch o HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) (Tabla I1) (Figura I1).

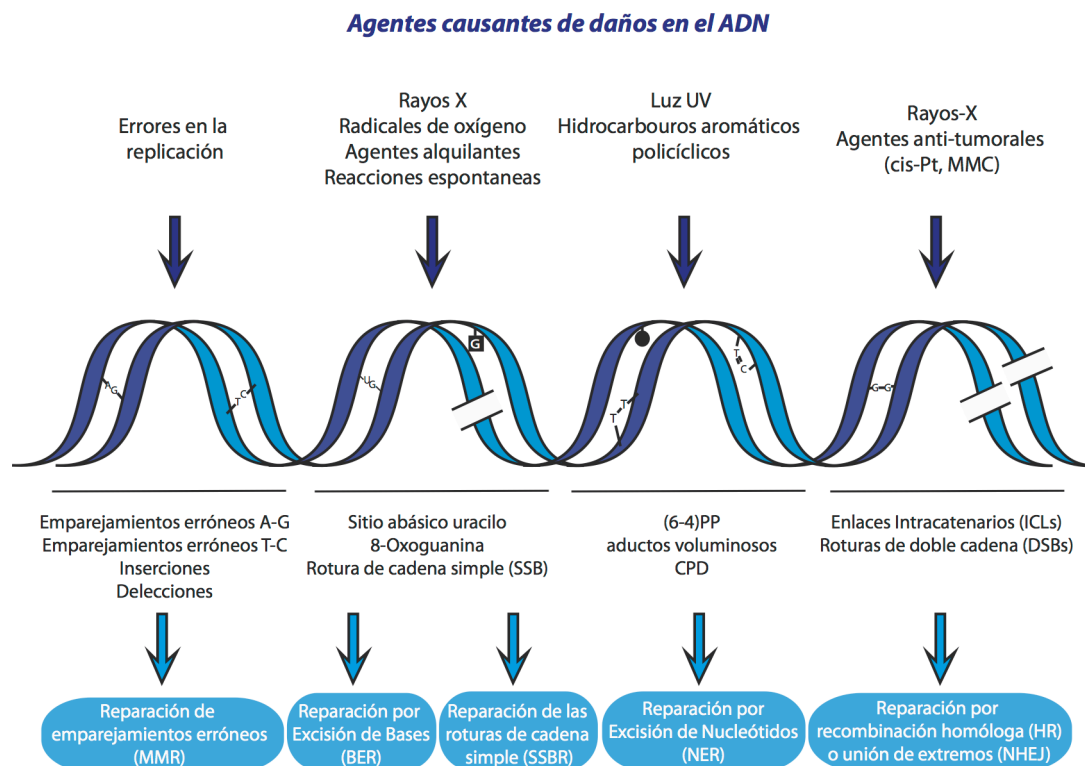
#### 3.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (BER, *BASE EXCISION REPAIR*)

Pequeñas alteraciones químicas en las bases son reparadas escindiendo la base dañada. El daño en la base es reconocido por enzimas denominadas genéricamente glicosilasas que median la eliminación de la base antes de que una nucleasa, polimerasa y ligasa completen la reparación. Este mecanismo emplea algunas enzimas que solapan con las utilizadas en la reparación de los SSBs (ver más abajo) (Lindahl & Barnes 2000) (Figura I1).

#### 3.3. REPARACIÓN DE LOS DAÑOS DE CADENA SENCILLA (SSBR, *SINGLE STRAND BREAKS REPAIR*)

Las roturas de cadena simple (SSBs) son reconocidas por PARP (*Poly ADP Ribose Polymerase*), que sintetiza cadenas de PoliADP ribosa (PAR) en las proximidades del sitio de rotura y promueve el reclutamiento de factores de reparación como XRCC1 y LIG3. Los SSBs pueden ocurrir como resultado de la

IR o de tratamientos con agentes químicos y pueden aparecer también como intermediarios durante la reparación por BER y NER (Caldecott 2008).



**Figura I1. Esquema de los agentes más comunes causantes de daños en el ADN y los tipos de reparación.** Ejemplos de lesiones en el ADN inducidas por agentes endógenos y exógenos que son reparadas por diversos mecanismos de reparación. Ver el texto para más detalle. Figura modificada a partir de Hoeijmakers 2001.

### 3.4. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER, NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR)

Este tipo de reparación reconoce los dímeros de pirimidinas y los enlaces covalentes dentro de la misma hebra de ADN que generan lesiones que distorsionan la hélice. Las lesiones CPD (dímeros de ciclobutano pirimidina) y 6-4PP (pirimidina 6-4 primidina) son inducidas por luz UV y son objeto de reparación por NER (Figura I1). El arquetipo humano de la deficiencia en NER es el Xerodermia pigmentosa (XP) (Tabla I1). NER opera por dos rutas que difieren en el mecanismo de reconocimiento de la lesión. Por un lado, NER acoplado a transcripción (TC-NER, *Transcription coupled repair-NER*), es decir, que reconoce específicamente lesiones que conllevan el bloqueo de transcripción. Por otro lado, la otra ruta reconoce estas lesiones en

cualquier parte del genoma de manera global (GG-NER, *Global genomic-NER*). Las lesiones son corregidas mediante la eliminación y relleno de un oligonucleótido de aproximadamente 20-30 bases que contiene las bases dañadas (Fousteri & Mullenders 2008).

### 3.5. TLS (*TRANS-LESION SYNTESIS*)

El TLS es un mecanismo de reparación de transición que evita el colapso de la horquilla de replicación. Emplea polimerasas con baja fidelidad especializadas, principalmente de la familia Y y es un mecanismo mutagénico (Fousteri & Mullenders 2008).

### 3.6. REPARACIÓN DE LOS ENLACES INTERCATENARIOS

Los enlaces intercatenarios (ICLs, *interstrand crosslink*) son enlaces covalentes que se establecen entre hebras de ADN diferentes. Suelen provocar el bloqueo de la horquilla de replicación siendo tal vez uno de los daños más peligrosos, ya que conducen a la incapacidad completa del cromosoma para duplicarse y pueden conllevar una "catástrofe mitótica", reordenamientos cromosómicos y muerte celular. Mediante este mecanismo de reparación se tiene que restaurar la horquilla colapsada. La reparación ocurre con la activación de las proteínas de la familia FANC, cuyo mal funcionamiento causa el síndrome de Anemia de Fanconi (FA) en humanos seguida por un evento de recombinación homóloga (ver apartado 4.4) (Deans & West 2011).

### 3.7. REPARACIÓN DE LOS DSBs

Las roturas de doble cadena son aquellas en las que ambas cadenas del ADN se rompen simultáneamente y son reparadas tanto por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, *nonhomologous end joining*) como por recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) (Figura 11). Mientras el NHEJ promueve la religación de los DSBs sin un mecanismo que controle la fidelidad de la reparación, la HR restaura, en principio de manera precisa, la secuencia genómica de los extremos rotos cuando utiliza la

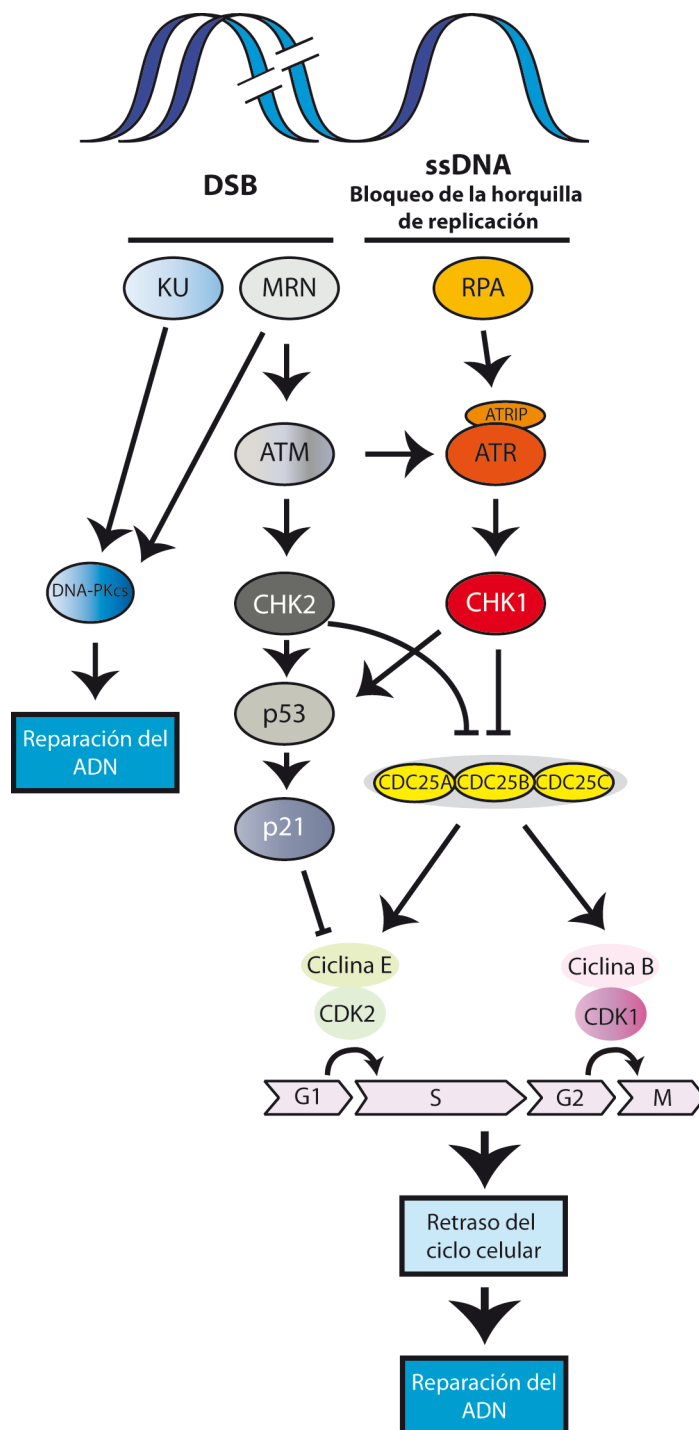
cromátida hermana como molde para reparar. Los DSBs no ocurren tan frecuentemente como otros tipos de lesiones pero son difíciles de reparar y extremadamente tóxicos (Jackson & Bartek 2009). En el siguiente apartado se hará una descripción más completa de la maquinaria molecular implicada en la reparación de los DSBs, ya que son las lesiones cuya reparación es el objeto de estudio de esta tesis.

## 4. MECANISMOS DE REPARACION DE LOS DSBs

Los DSBs son lesiones en el ADN muy perjudiciales para la viabilidad de la célula y cuya reparación es llevada a cabo por una red compleja de múltiples rutas de reparación interconectadas. Al menos cuatro rutas independientes pueden reparar los DSBs: HR, NHEJ clásico, alt-NHEJ (*alternative Nonhomologous DNA End Joining*) y el SSA o alineamiento de cadena simple (*Single Strand Annealing*). El principal elemento que influye en la elección de la ruta de reparación es la magnitud de la extensión del procesamiento de los extremos de ADN dañados, la llamada resección del ADN (Huertas 2010), una degradación en sentido 5'-3' de una de las cadenas a cada lado del corte (ver apartado 4.4.1). El NHEJ clásico no necesita reseccionar el ADN, mientras que el alt-NHEJ (también conocido como MMEJ o unión de extremos mediado por microhomología), la HR y el SSA dependen de que ocurra la resección del ADN en el DSB (Brandsma & Gent 2012). En el caso del alt-NHEJ, la resección está limitada a 5-25 nucleótidos, mientras que en el SSA y la HR es mucho más extensa, por encima de 100-200 (Hartlerode & Scully 2009).

### 4.1. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS DSBs

Los mecanismos de respuesta al daño actúan rectificándolo, minimizando la probabilidad de letalidad y de que este daño sea permanente. Esta respuesta está coordinada a través de varias cascadas de señalización mediadas por quinasas, lo que se conoce como DDR (*DNA damage Response*) (Smith et al. 2010) (Figura 2I).



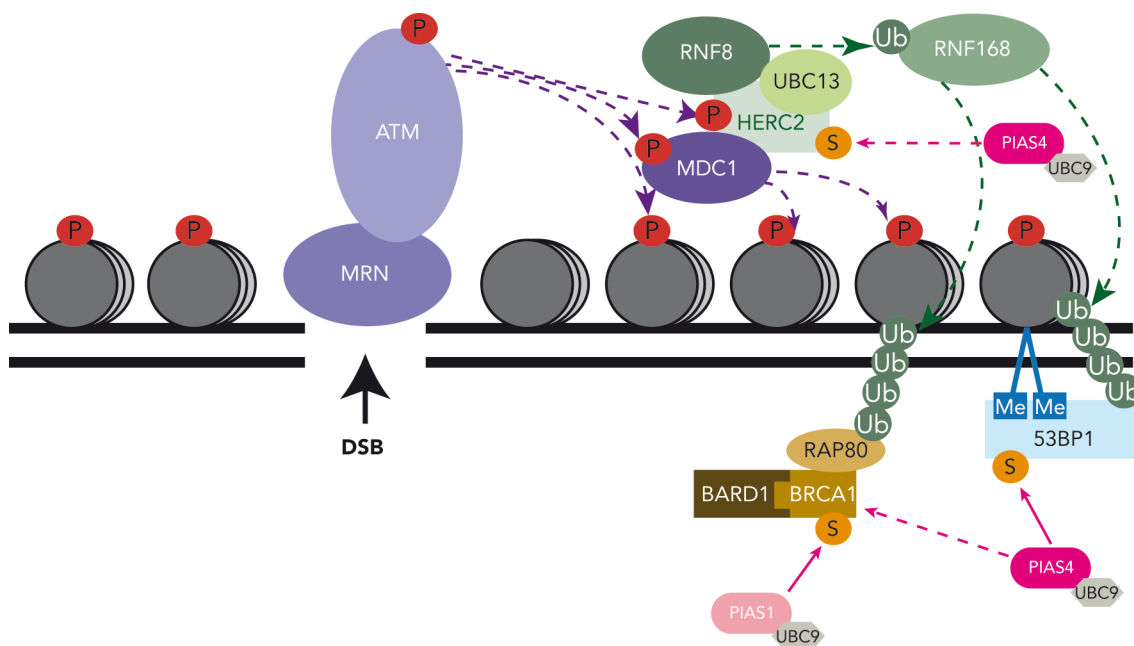
**Figura 12. La respuesta al daño en el ADN.** Tras la inducción de una rotura de cadena sencilla o doble (SSB y DSB), una serie de proteínas se encargan de sensar el daño ocasionado. El complejo MRN detecta los DSBs y la proteína RPA se une a las regiones de cadena sencilla que son expuestas con motivo del colapso de la horquilla de replicación o después de la resección inicial del ADN. MRN y RPA median en el reclutamiento de ATM y ATR respectivamente y la activación de las respectivas rutas de señalización para la coordinación del ciclo celular y la reparación del daño. Por otra parte, el heterodímero KU70/80 (Ku) compite con MRN por la unión a los DSBs. El complejo Ku reclutará a DNA-PKcs como principal componente de la maquinaria de reparación mediante NHEJ. Por otro lado, MRN inicia la reparación del DBS mediante HR. La cascada de señalización del daño se inicia mediante múltiples fosforilaciones principalmente sobre las quinasas de control del ciclo celular CHK1 y CHK2. Sus señales convergen en efectores como el supresor de tumores p53 y las fosfatasa de la familia CDC25. Como resultado la actividad de la CDK es inhibida y la progresión del ciclo celular retardada en las fases G1 a S (checkpoint G1/S) o en las fases de G2 a M (checkpnt G2/M) para facilitar la reparación de las lesiones en el ADN

En mamíferos, el complejo MRN desempeña un papel crítico en la respuesta temprana a los DSBs puesto que es el sensor principal de los DSBs junto con el heterodímero Ku (KU70 y KU80) (Lee & Dunphy 2013) (Figura I2). MRN compite con el complejo Ku por la unión a los DSBs (Brown et al. 2015). Mientras el heterodímero Ku ejerce su papel exclusivamente en reparación, el complejo MRN actúa tanto en la reparación como en la señalización del daño (Figura I2). El complejo MRN está formado por las proteínas MRE11-RAD50-NBS1 (Williams et al. 2007). RAD50 es un miembro de la familia SMC, y contiene un dominio ATPasa que interacciona con MRE11 y se asocia a los extremos del ADN en el DSB (Hopfner et al. 2002). MRE11 tiene actividades endonucleasa y exonucleasa 3'-5' y 5'-3' importantes para los pasos iniciales de la resección y por tanto es esencial para la HR (Williams et al. 2007). La tercera subunidad del complejo MRN es NBS1 que interacciona con MRE11 y contiene un dominio adicional de interacción proteína-proteína importante para la función de MRN en la respuesta al daño en el ADN (Tsuchi et al. 2002). Una unidad del complejo se une a cada extremo del ADN roto y se establece un puente que conecta ambos trozos de ADN a través de la homodimerización de RAD50 (Williams et al. 2008; Hopfner et al. 2002).

El complejo MRN se recluta al DSB y este reclutamiento se puede ver favorecido en algunos casos por PARP1, la histona fosforilada  $\gamma$ H2AX (ver en detalle más adelante) y MDC1 (Haince et al. 2008) (Figura I3).

El complejo MRN además recluta y activa la función catalítica de la proteína quinasa ATM llevándola al DSB a través de una interacción directa con la región C-terminal de NBS1 (Lee & Paull 2005) (Figuras I2 y I3). La activación de ATM es potenciada por otros factores (Falck et al. 2005; Uziel et al. 2003; Lee & Paull 2005). PARP1 también se encarga de reclutar a ATM de manera independiente y podría contribuir a la cascada de fosforilaciones que se da posteriormente. Se ha comprobado que en ausencia de PARP1 hay un retraso en la fosforilación de los sustratos de ATM. De cualquier forma, PARP1/2 y ATM tienen funciones independientes ya que al deletar *PARP1* (o *PARP2*) en ratones deficientes para ATM se observa un fenotipo de letalidad sintética (Huber et al. 2004).

Al igual que ATM, la proteína quinasa ATR es miembro de la familia de las PIKKs (*phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases*) y es, además junto a ATM y un tercer miembro de la familia, DNA-PK<sub>cs</sub> (Figura I2), otra de las kinasas



**Figura 13. Representación esquemática de los diferentes modificadores post-traduccionales implicados en la señalización de los DSBs.** Representación de las fosforilaciones críticas realizadas por ATM sobre la histona H2AX, MDC1 y HERC2. MDC1 y  $\gamma$ H2AX forman una plataforma para el reclutamiento de otros modificadores implicados en la señalización. Se esquematiza la interacción entre MDC1, RNF8, UBC13 y HERC2. La ubiquitinación llevada a cabo por RNF168 sobre la histona H2AX conlleva el reclutamiento de la proteína 53BP1 y del complejo BRCA1-BARD1-RAP80 a los sitios de daño. Existen múltiples niveles en los que PIAS1 y PIAS4 realizan sumoilaciones en respuesta a los DSBs. Las líneas horizontales representan el ADN. Las esferas grises representan los nucleosomas; P, fosforilación; Ub, ubiquitinación; Me, metilación; S, sumoilación. Figura modificada de Brown et al. 2015 y Jackson & Durocher 2013.

fundamentales en la señalización del daño en el ADN. ATR responde a estrés replicativo y a la presencia de ADN de cadena sencilla (Jazayeri et al. 2006) (Figura 12). Mutaciones en la línea germinal en ATM y ATR resultan en ataxia-telangiectasia (Shiloh 2014) y en el síndrome de Seckel (O'Driscoll et al. 2003; O'Driscoll et al. 2004), respectivamente. ATR es reclutada al daño mediante ATRIP (ATR-interacting protein) para su interacción con RPA (*replication protein A*) (Sung & Klein 2006) cuando ésta se encuentra formando un nucleofilamento con el ssDNA. RPA es un complejo heterotrimérico formado por RPA1, RPA2 y RPA3 que estabiliza las regiones de ssDNA generadas ya sea durante la replicación o bien cuando se ha realizado un procesamiento inicial del ADN

dañado durante la reparación (ver con más detalle en el apartado 4.4.1) (Smith et al. 2010; Wold 1997). La formación del complejo RPA-ssDNA tiene una función crítica en la activación de la ruta de señalización iniciada por ATR. Así, tras su reclutamiento al sitio de daño, ATR lleva a cabo la fosforilación de diversos sustratos (Ciccio & Elledge 2010).

CHK1 (*checkpoint kinasa 1*) y CHK2 (*checkpoint kinasa 2*) son los dos sustratos mejor caracterizados de ATR y ATM respectivamente (Stracker et al. 2009) (Figura I2). ATM-CHK2 y ATR-CHK1 son las kinasas que coordinan las dos rutas de señalización principales en respuesta al daño en el ADN (Sancar et al. 2004; Bartek & Lukas 2003). ATM-CHK2 se activa por la generación de DSBs y ATR-CHK1 por generación de ADN de cadena sencilla (ssDNA) ya sea durante la replicación o en la resección durante la reparación por HR (Smith et al. 2010). CHK1 es importante para el mantenimiento del punto de control G2/M, mientras que CHK2 actúa principalmente, pero no exclusivamente, sobre el G1/S (Bartek & Lukas 2003) (Figura I2). Ambas kinasas actúan de intermediarios, transmitiendo la señal iniciada por ATM y/o ATR a otras proteínas. La eficiente activación de ATR y las fosforilaciones posteriores dependientes de CHK1, dependen de la acción de dos proteínas mediadoras, TopBP1 y Claspin (Smith et al. 2010).

Un sustrato crucial de CHK2 es p53, cuya fosforilación conlleva la apoptosis celular cuando el número de lesiones excede a la capacidad de reparar de la célula (Takai et al. 2002). Otros sustratos de CHK2 son MDMX, BRCA1 y la familia de fosfatasa CDC25. Además, CDC25A es el principal sustrato de CHK1 y conlleva la activación de los puntos de control dentro de la fase S y G2/M (Reinhardt & Yaffe 2009) (Figura I2).

Este efecto global de la activación de ATM y ATR tiene como consecuencia la acumulación de factores proteicos y/o modificaciones post-traduccionales a nivel local (Figura I3). Entre las fosforilaciones más importantes en respuesta al daño en el ADN se incluye la de la histona H2AX en la serina 139 (S139) (Rogakou et al. 1998; Savic et al. 2009). Esta histona modificada en este residuo se la denomina  $\gamma$ H2AX y dicha fosforilación es un marcador temprano de los DSBs (Savic et al. 2009; Matsuoka 2007; Fernandez-Capetillo et al. 2004; Stucki & Jackson 2006; Dickey et al. 2009). Existe redundancia funcional entre las kinasas ATM, ATR y DNA-PK para realizar la fosforilación de la histona H2AX en respuesta a daño (Stiff et al. 2004). Por otra parte, MDC1



se une directamente a la S139 fosforilada de H2AX a través de las repeticiones BRCT en su carboxilo terminal (Stucki 2009) (Figura I3).  $\gamma$ H2AX-MDC1 hace de plataforma para el reclutamiento de otros modificadores de la cromatina en respuesta al daño y para la reparación del ADN (Figura I3). Se ha descrito que MDC1 facilita tanto el NHEJ como la HR de una manera dependiente de  $\gamma$ H2AX (Hartlerode & Scully 2009).  $\gamma$ H2AX-MDC1 recluta al complejo MRN mediante la interacción de MDC1 con NBS1. El complejo formado por MRN, MDC1 y  $\gamma$ H2AX se encarga entonces de reclutar a ATM, facilitando la propagación de  $\gamma$ H2AX (y por tanto de MDC1) sobre una amplia extensión de cromatina (1-2 megabases entorno al DSB) (Figura I3). MDC1 también recluta directamente a ligasas de ubiquina con dominio RING como RNF8 y RNF168, que comienzan una cascada de ubiquitinaciones en el entorno del DSB (Al-Hakim et al. 2010). Esto ocurre gracias a la fosforilación de MDC1 por ATM, que crea una plataforma para la unión de RNF8 a través de su dominio FHA (*fork headed associated*) que es un dominio de unión a proteínas fosforiladas (Figura I3). RNF8 acompañada de UBC13 (también conocida como UBE2N) cataliza la formación de cadenas de poliubiquitinas en proteínas en la proximidad de los DSBs, como por ejemplo las histonas H2A y H2AX (Huen 2007; Kolas 2007; Mailand 2007). Seguidamente, RNF168 amplifica estas cadenas de ubiquitina. La fosforilación por ATM de HERC2 participa en la regulación de este proceso al favorecer la interacción funcional de RNF8-UBC13 (Bekker-Jensen et al. 2010) (Figura I3).

La acumulación de factores de la DDR de manera local en el sitio donde el ADN está dañado conlleva el reclutamiento de toda una red de proteínas que van a alterar la cromatina mediante modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación, sumoilación, acetilación y metilación. Entre las enzimas remodeladoras de la cromatina implicadas en la DDR están: la familia SNF2, la proteína INO80 y el complejo SWI/SNF; todos ellos reclutados al DSB de manera dependiente de  $\gamma$ H2AX (H.-S. Lee et al. 2010). INO80 promueve la reubicación de los nucleosomas para facilitar la resección y la HR. De forma similar, el complejo SWI/SNF estimula la relajación de la cromatina en los DSBs de una manera dependiente de MDC1 (Lin et al. 2010).

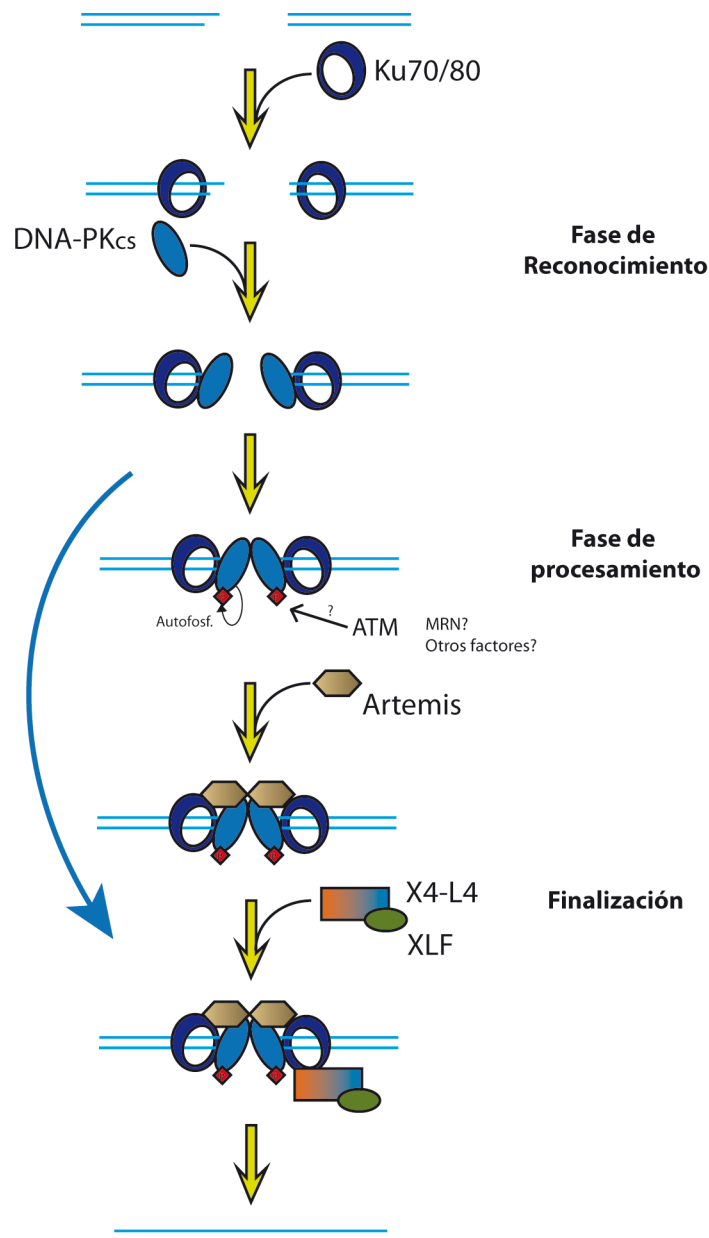
## 4.2. REPARACIÓN POR UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS (NHEJ)

El NHEJ es una ruta de reparación de los DSBs muy eficiente que en eucariotas pluricelulares, como ratón y humanos, representa la mayor ruta de reparación del ADN roto. El NHEJ es un mecanismo que se da en todas las fases del ciclo celular y es especialmente importante durante las fases  $G_0$  y  $G_1$ , ya que en éstas no se da la proximidad de la cromátida hermana para llevar a cabo la reparación por recombinación homóloga (Takata et al. 1998; Pardo et al. 2009).

El NHEJ cumple una serie de funciones especializadas dentro de la célula como en el sistema inmune de los vertebrados, donde se realizan una serie de DSB programados para generar diversificación en el repertorio de los linfocitos T y B. Estos mecanismos de reparación especializados son la recombinación V(D)J (Carmona et al. 2016), la hipermutación somática (Teng & Papavasiliou 2007) y la recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas (CSR) (Dudley et al. 2005). Las proteínas de la ruta del NHEJ son esenciales en la recombinación V(D)J y en la hipermutación somática, mientras que durante la CSR participan múltiples rutas de reparación del ADN, incluyendo el NHEJ.

### 4.2.1. Fase de Reconocimiento

La reparación por NHEJ es iniciada por la unión de un complejo proteico heterodimérico compuesto por las proteínas KU70 y KU80, el cual tiene forma de anillo y se une a ambos extremos rotos de la molécula de ADN (Figura I4). Las proteínas Ku interaccionan con muchas otras proteínas *in vitro*, incluyendo DNA-PK<sub>cs</sub> (Gottlieb & Jackson 1993) y el complejo XRCC4-Ligasa IV (Nick McElhinny et al. 2000). La unión del complejo Ku a los extremos rotos del ADN ocurre a los pocos segundos de producirse el DSB y sirve como base para el ensamblaje de otras proteínas para la siguiente fase en el proceso de reparación de la rotura y forma una estructura específica que promueve el alineamiento de los dos extremos terminales del ADN (Cary et al. 1997; Walker et al. 2001). El complejo DNA-Ku recluta a la proteína DNA-PK<sub>cs</sub> (subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de ADN), miembro de las PIKKs



**Figura 14. NHEJ en células de mamíferos.** La generación de un DSB genera extremos de ADN a los que se puede unir el heterodímero Ku. Su desplazamiento hacia el interior de las cadenas permite el reclutamiento de DNA-PKcs en los extremos del ADN roto. Las dos moléculas de DNA-PKcs en cada extremo pueden interactuar formando un puente entre los extremos del DSB. Esta sinapsis de DNA-PKcs induce su autofosforilación alterando su conformación y dinámica. La fosforilación de DNA-PKcs permite el reclutamiento de Artemis y de otros factores para el procesamiento de los extremos como la ADN polimerasa X que procesa los extremos para que sean adecuados para su religación. Una vez procesados, el complejo X4-L4 junto con XLF se encargan de ligar los extremos reparando la rotura. Figura modificada de Hartlerode & Scully 2009.

(Gottlieb & Jackson 1993). Entonces, el heterodímero Ku se desliza hacia el interior de ADN, permitiendo que DNA-PK<sub>cs</sub> contacte físicamente con el

extremo de ADN y activando su función kinasa (Yaneva et al. 1997; Yoo & Dynan 1999) (Figura I4).

La asociación de DNA-PK<sub>cs</sub> tanto al ADN como al complejo Ku conlleva la activación de la actividad kinasa serina/treonina de DNA-PK<sub>cs</sub> (Mahaney et al. 2009). Además, el desplazamiento de Ku hacia el interior del extremo permite que dos moléculas de DNA-PK<sub>cs</sub> interactúen a lo largo del DSB formando un "puente" molecular o sinapsis entre los dos extremos del ADN (DeFazio et al. 2002). DNA-PK<sub>cs</sub> juega un papel crítico en la estabilización de los extremos y previene la resección (ver apartado 4.4.1) mediante una serie de reacciones de autofosforilación (Meek et al. 2008) (Figura I4).

DNA-PK<sub>cs</sub> puede fosforilar diversos sustratos *in vitro* incluyendo KU70, KU80, XRCC4, XLF, Artemis y la Ligasa IV (Douglas et al. 2005; Yu et al. 2003; Yu et al. 2008; Goodarzi et al. 2006; Wang et al. 2004). Sin embargo, no está claro cómo de necesarias son estas fosforilaciones para el NHEJ. Lo que sí se ha demostrado es que las autofosforilaciones de DNA-PK<sub>cs</sub> ocurren en respuesta al daño *in vivo* (Douglas et al. 2002; Chan et al. 2002) y que también *in vivo*, el único sustrato identificado es su propia subunidad catalítica (Mahaney et al. 2009). Una función esencial de estas autofosforilaciones es controlar el procesamiento de los extremos del ADN, un paso crucial en la decisión entre el NHEJ y la HR. Así, las autofosforilaciones en el conjunto de seis residuos conocido como ABCDE (también conocido como el *cluster* T2609) conllevan la desestabilización de la interacción de DNA-PK<sub>cs</sub> con los extremos de ADN, permitiendo el acceso de otras proteínas como Artemis para el procesamiento limitado de dichos extremos (Meek et al. 2008). Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación ABCDE también puede ser inducida por otra kinasa de la misma familia, ATM (ver apartado 4.1) para facilitar el acceso de proteínas de resección y promover la HR cuando el NHEJ falla (Figura I4). El excesivo procesamiento también es controlado mediante la autofosforilación del *cluster* S2056 que ayuda a proteger los extremos del ADN (Shrivastav et al. 2008).

En levaduras, el complejo MRX (MRE11-RAD50-XRS2), ortólogo de MRN, participa tanto en la reparación por NHEJ como por HR y es uno de los primeros complejos en interactuar en el DSB (Lisby et al. 2004). En vertebrados, dicho complejo, tiene un papel claramente demostrado en la HR (Tsuchi et al. 2002; Yamaguchi-Iwai et al. 1999) y sólo recientemente, se ha

demostrado que está también implicado en la reparación por NHEJ (Dinkelmann et al. 2009; Rass et al. 2009). La proteína RAD50 contiene un dominio de unión al ADN de alta afinidad y dos dominios de unión  $Zn^{2+}$  cisteína que pueden asistir en la fase de sinapsis tal y como ocurre en levaduras (Hopfner et al. 2002). DNA-PK<sub>cs</sub> en vertebrados puede funcionar en paralelo con MRN como un factor que establece puentes entre los dos extremos del ADN durante el NHEJ (DeFazio et al. 2002; Williams et al. 2008). Esta redundancia parcial en vertebrados, no se da en otros eucariotas más simples, como las levaduras, que carecen de ortólogos de DNA-PK<sub>cs</sub>. Esto podría explicar por qué en estos organismos el NHEJ es relativamente ineficiente.

#### 4.2.2. Procesamiento

Independientemente de cómo quede el extremo después de haber ocurrido el daño, deben ser transformados en extremos 5' religables para que puedan ser reparados completamente. Se requieren varias enzimas para procesar dichos extremos y reparar la rotura. Una de las enzimas clave en el procesamiento de los extremos es Artemis (Figura 14). Artemis es miembro de la superfamilia de las metaloproteasas beta-lactamasas y se recluta al sitio del DSB a través de su capacidad para interaccionar con DNA-PK<sub>cs</sub> (Ma et al. 2002; Moshous et al. 2001). Artemis posee una actividad exonucleasa 5'-3' independiente de DNA-PK<sub>cs</sub> y una actividad endonucleasa dependiente de DNA-PK<sub>cs</sub> capaz de actuar sobre ADN de cadena sencilla o doble y sobre ADN con estructuras en forma de horquilla. La inactivación de Artemis conlleva sensibilidad a irradiación, sin embargo, las células que han perdido Artemis no tienen defectos importantes en la reparación de los DSB sugiriendo que sólo un subconjunto de lesiones son reparados de una manera dependiente de Artemis *in vivo* (Wang et al. 2005). En cualquier caso, el procesamiento mediado por Artemis es mucho menor que el que ocurre durante la resección del ADN en la HR (la resección se explicará con más detalle en el apartado 5.3.1). Artemis, las nucleasas APLF y la fosfatasa/kinasa PNK son fosforiladas de una manera dependiente de ATM previo a la ligación del ADN (Mahaney et al. 2009) (Figura 14). Se ha comprobado que ATM tiene un papel en el 10% de los eventos de NHEJ a través de Artemis (Jeggo & Lobrich 2005).

El procesamiento de lesiones complejas puede generar huecos en el ADN que deben ser rellenados previamente por ADN polimerasas para llevar a cabo la reparación por NHEJ. En células de mamíferos, la familia de la polimerasas X (pol X) se compone de las polimerasas  $\beta$ ,  $\mu$ ,  $\lambda$  y la deoxiribonucleotidiltransferasa terminal (TdT). Las tres últimas contienen dominios BRCT y tienen un papel en el NHEJ rellenando los huecos, mientras que pol  $\beta$  no (Nick McElhinny & Ramsden 2004; Lieber 2008).

#### 4.2.3. Finalización

La reparación por NHEJ se completa con la ligación de los extremos de ADN, un paso que es llevado a cabo por el complejo X4-L4, que contiene XRCC4, la Ligasa IV (Grawunder et al. 1997) y el factor estimulante XLF/Cernunnos (Hentges et al. 2006) (Figura I4). XRCC4 forma un homodímero que funciona como andamiaje interaccionando con el complejo Ku y con el ADN (Nick McElhinny et al. 2000; Modesti et al. 1999). El complejo ADN-Ku es estabilizado por XRCC4 y estimulado por XLF/Cernunnos para llevar a cabo el paso de ligación y completar así la reparación (Grawunder et al. 1997; Lieber 2008). La Ligasa IV es activada por XRCC4 y XLF (Gu, Lu, Tsai, et al. 2007) (Figura I4) y puede ligar extremos romos y extremos sobresalientes compatibles (Grawunder et al. 1997). El complejo X4-L4 es capaz de ligar una cadena que tiene sólo un mínimo de emparejamiento de bases con su cadena antiparalela, lo que podría permitir un procesamiento simultáneo de la maquinaria de procesamiento y ligación (Ma et al. 2004). Además de esta capacidad, el complejo puede ligar dejando huecos compuestos por varios nucleótidos y también puede ligar algunos extremos de ADN incompatibles con extremos cortos sobresalientes (Gu, Lu, Tippin, et al. 2007). Se ha comprobado que el NHEJ ocurre incluso en ausencia del complejo X4-L4 sugiriendo que otra ligasa puede sustituir al menos parcialmente a la Ligasa IV (Yan et al. 2007).

### 4.3. MECANISMO DE REPARACIÓN POR NHEJ ALTERNATIVO (ALT-NHEJ) O UNIÓN DE EXTREMOS MEDIADOS POR MICROHOMOLOGÍA (MMEJ)

Es un mecanismo alternativo al NHEJ que opera en ausencia de alguno de los factores clásicos para el NHEJ como el complejo Ku, XRCC4 o la Ligasa IV. Funciona como un mecanismo de seguridad al NHEJ clásico en la reparación de los DSBs que actúa cuando éste está bloqueado (Wang et al. 2006). Estos eventos de reparación implican frecuentemente pequeñas deleciones y requieren de tramos de homología cortos (unas pocas bases) en el punto de rotura (Bennardo et al. 2008). El MMEJ explica una proporción de los eventos de recombinación V(D)J en las células silvestres (Corneo et al. 2007). Es interesante el hecho de que las levaduras que han perdido MRX realizan menos reparación por MMEJ, indicando la implicación de este complejo también en este mecanismo de reparación. El conjunto de genes que participan en alt-NHEJ en células de mamíferos es aún desconocido. Se ha comprobado que PARP1, PARP2, XRCC1, LIG3, LIG1 y CtIP desempeñan una función en el alt-NHEJ (Frit et al. 2014). La reparación por alt-NHEJ parece contribuir a la inestabilidad genómica asociada al cáncer (McVey & Lee 2008).

### 4.4. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Se han identificado varios mecanismos de reparación dependientes de homología de secuencia. Estos incluyen la HR clásica, alineamiento de cadena sencilla (SSA, *single-strand annealing*), el alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA, *synthesis-dependent strand annealing*) y la replicación inducida por rotura (BIR, *break-induced replication*). Mientras que la HR clásica y el SDSA son, en principio, una reparación de los DSBs conservativa, tanto SSA como BIR son rutas intrínsecamente mutagénicas. El siempre produce deleciones entre las secuencias homólogas usadas, mientras que el BIR produce pérdida de heterocigosidad e incluso GCRs (*gross chromosomal rearrangements*). Aún así, tanto la recombinación clásica como el SDSA también pueden producir mutaciones, siempre que la secuencia utilizada como donadora de información no corresponda a la cromátida hermana. Aunque estos mecanismos de reparación son claramente diferentes, todos comparten

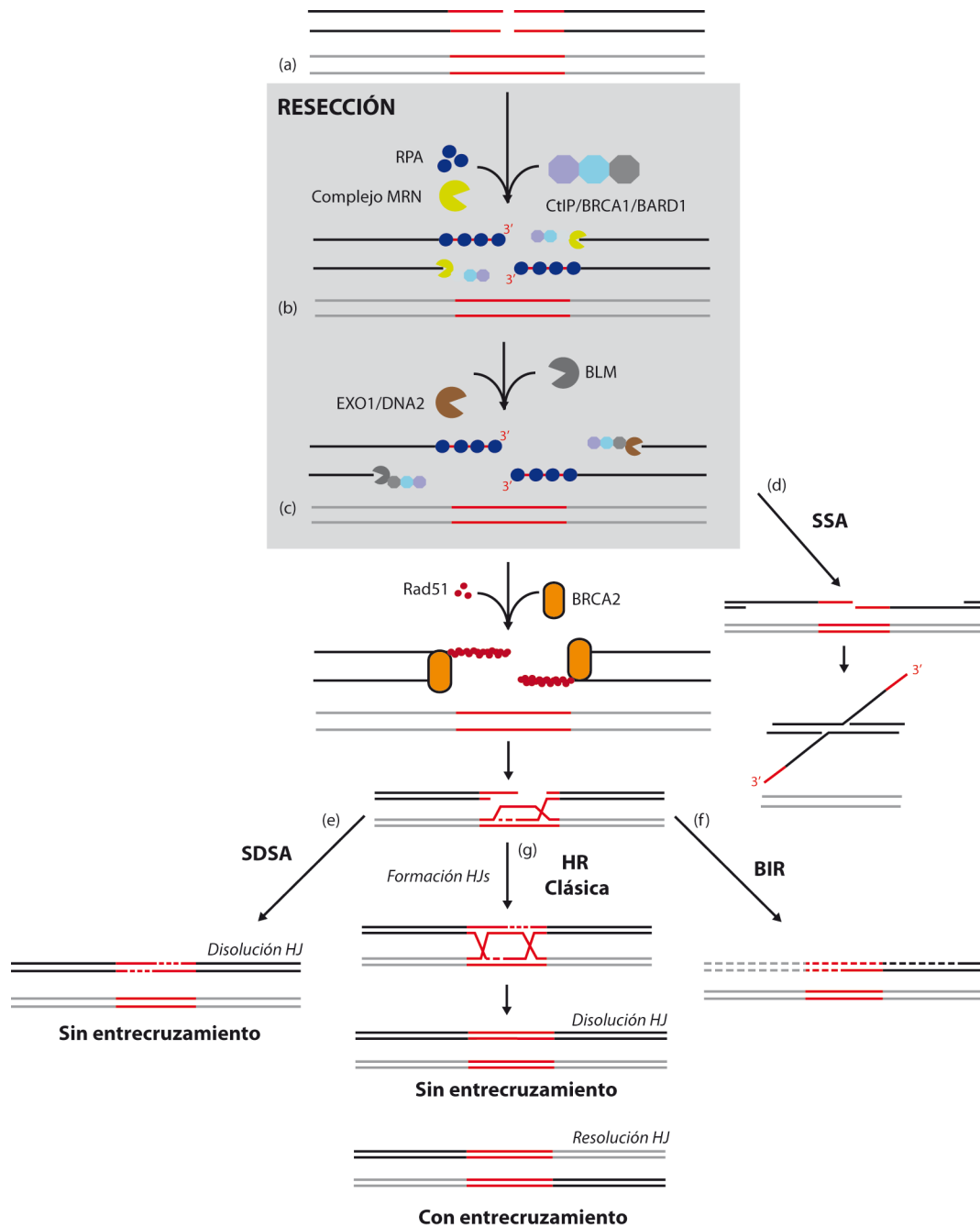
una serie de pasos comunes. En concreto, todos ellos se inician con la resección de los extremos del ADN para generar extremos 3' sobresalientes de cadena sencilla. En el mecanismo de reparación por SSA, la resección iniciada a partir de un DSB localizado entre dos repeticiones directas conduce a la exposición de las secuencias homólogas y el posterior alineamiento de las cadenas complementarias de cada secuencia repetida. En todos los casos, este mecanismo provoca la delección de una de las repeticiones y la zona situada entre ambas secuencias homólogas (Figura I5-d).

Recombinación clásica, SDSA y BIR también comparten el siguiente paso, el emparejamiento de la cadena reseccionada con una secuencia homóloga mediado por RAD51 y un posterior intercambio de cadena (Figura I5-e,-f). Entonces se inicia un periodo de síntesis, usando la cadena invadida como molde. El destino final de esta cadena sintetizada es lo que diferencia a estos tres procesos. En la recombinación clásica la síntesis de ADN llega hasta el final de la zona reseccionada, generándose unas estructuras en forma de X denominadas estructuras de Holliday (HJs), en honor a su descubridor Robin Holliday (Figura I5-g). En el SDSA, las cadenas sintetizadas a ambos lados del corte son desplazadas del molde y alinean entre sí (Figura I5-e). En el BIR, la síntesis de ADN prosigue hasta el final del cromosoma (Figura I5-f). A diferencia de lo que ocurre en la HR clásica y el SDSA, en el BIR en levaduras se requiere la síntesis de la cadena retrasada y esto parece ser mediado por la formación de una horquilla de replicación similar a la canónica (Lydeard et al. 2013). Como consecuencia, el BIR implica la copia extensiva del donador conduciendo a diversas alteraciones cromosómicas, según la posición de la secuencia usada como molde, como translocaciones no recíprocas y a otros tipos de reorganizaciones genómicas (Figura I5). Aunque el BIR ha sido utilizado para explicar algunos ejemplos de inestabilidad genómica en células de mamíferos, cada vez hay más dudas de la contribución real que tiene esta ruta de reparación.

#### 4.4.1. Resección

La resección es el proceso por el que los extremos 5' del DSB son degradados obteniéndose extremos 3' sobresalientes (Figura I5-b,-c). Dichos





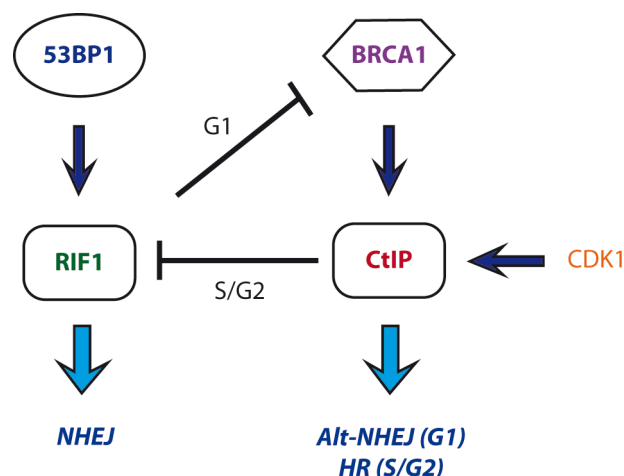
**Figura 15. Mecanismos de reparación de los DSBs mediante homología de secuencia en células mamíferas.** La inducción de un DSB (a) es reconocido por el complejo MRN que mantiene los extremos de ADN unidos y participa de su procesamiento (b). El complejo CtIP-BRCA1-BARD1 coopera con MRN en la resección. La proteína RPA se une al ssDNA evitando la formación de estructuras secundarias (b). EXO1 y DNA2 con ayuda de BLM expanden la resección (c). BRCA1/BARD1 promueve la acumulación de BRCA2 y ésta cataliza la formación de un nucleofilamento (ssDNA-RAD51). Una vez ensamblado RAD51 se realiza la búsqueda de homología. A continuación se podrá llevar a cabo el SSA (d), el SDSA (e), la HR clásica (g), el BIR (f). En la recombinación clásica la formación de las estructuras de Holliday pueden resolverse con o sin entrecruzamiento de las cadenas de ADN. Figura modificada a partir de Hartlerode & Scully 2009.

extremos serán usados para invadir la cadena molde y para actuar de cebadores para la síntesis de ADN. La resección la inicia el complejo MRN el cual se une directamente al DSB, tal y como se ha mencionado con anterioridad en el apartado 4.1 (Figura I5-b). Sin embargo, para que se inicie la resección es necesario que el proceso se active por CtIP (Sartori et al. 2007), que interacciona con MRN y BRCA1 formando un complejo (Huen et al. 2010) (Figura I5-b). CtIP es una proteína esencial para la resección con actividad nucleasa, aunque no se ha demostrado si dicha actividad participa en el proceso directamente o simplemente estimula la actividad del complejo MRN (Aparicio et al. 2014 y Sartori 2007). *In vivo*, no basta con la interacción de estas proteínas, sino que la resección de los DSBs está controlada por otros factores. Por un lado, ATM estimula la resección y por otro, este proceso se induce fundamentalmente durante las fases S y G2 del ciclo celular cuando las cromátidas hermanas pueden ser utilizadas para llevar a cabo la HR. Sin embargo, existe una limitada y mínima resección que ocurre en la fase G1 de una manera independiente de BRCA1 para realizar la reparación por alt-NHEJ (You & Bailis 2010). En las fases S y G2, la resección se estimula por la fosforilación de CtIP por la CDK en diversas posiciones (Wang et al. 2013), destacando los residuos T847 y S327 de CtIP, que aumentan su actividad y la interacción con BRCA1 respectivamente (Huertas & Jackson 2009; Yu & Chen 2004). BRCA1 ubiquitina a CtIP y facilita su asociación a los sitios de daño (Huen et al. 2010). En *Schizosaccharomyces pombe* se ha observado que el reclutamiento de Ctp1 (el ortólogo de CtIP) es además dependiente del complejo MRN (a través de su interacción con NBS1) y de la actividad kinasa de ATM (Aparicio et al. 2014). Se han identificado dos y siete sitios de fosforilación por ATM en CtIP y en BRCA1 respectivamente, pero su función precisa está en estudio (You & Bailis 2010). Las kinasas ATM y ATR modulan las actividades de otros factores de resección incluyendo MRE11, RAD50, DNA2 y EXO1 (Jasin & Rothstein 2013; Symington & Gautier 2011). CtIP y el complejo MRN son suficientes para la resección de unas pocas decenas de bases, la llamada resección de tramo corto. Sin embargo, *in vivo* la resección ocurre a lo largo de distancias mucho mayores, la denominada resección de tramo largo, que requiere o bien la actividad nucleasa de EXO1 o bien la acción conjunta de la helicasa BLM y de la nucleasa dependiente de estructura DNA2 (Symington & Gautier 2011) (Figura I5-c). También Artemis, cuyo principal

papel está en la reparación por NHEJ (como se ha descrito en el apartado 4.1) es reclutada por ATM, lo que sugiere que pueda tener un papel en la resección de los DSBs (Beucher et al. 2009).

Una forma precisa de elegir una ruta de reparación en lugar de otras es potenciando dicha ruta o bien regulando negativamente las contrarias. Cuando se producen alteraciones en el equilibrio natural entre las diversas rutas de reparación se puede generar inestabilidad genómica.

Existe un circuito regulador dependiente del ciclo celular que controla que los DSBs sean o no reseccionados, y en consecuencia la forma en la que son reparados (Figura 16) (Escribano-Díaz et al. 2013; Chapman et al. 2013). Este circuito está compuesto por dos parejas antagónicas: BRCA1-CtIP y 53BP1-RIF1. BRCA1 está presente ya en la fase G1 del ciclo, pero es incapaz de formar focos inducidos por IR por la presencia de



**Figura 16. Modelo de circuito de control para la elección de reparación de los DSBs.** La selección de la ruta de reparación de los DSBs es determinada en parte por la presencia en el sitio de rotura de RIF1 o BRCA1-CtIP. RIF1 estimula el NHEJ mientras que BRCA1-CtIP promueve la resección. La decisión está influida por el ciclo celular, en G1, RIF1 es capaz de mantener a BRCA1 lejos del sitio de rotura y en S/G2 la activación del complejo BRCA1-CtIP mantiene a RIF1 fuera del sitio de rotura. Figura modificada de Escribano-Díaz et al. 2013.

RIF1 unido a 53BP1 fosforilado por ATM. Por tanto, RIF1 es un efector crítico de 53BP1 que favorece la reparación por NHEJ (Chapman et al. 2012). De hecho, RIF1 regula el mecanismo de cambio de clase de las inmunoglobulinas por recombinación (CSR) (Di Virgilio et al. 2013). Por otra parte, la acumulación de RIF1 está restringida a la fase G1 del ciclo, y es suprimida en S/G2 por la

interacción BRCA1-CtIP, que es promovida por la fosforilación de CtIP por la CDK (Figura I6). Así, RIF1 suprime la resección y la formación del nucleofilamento de RAD51 en células deficientes en BRCA1. La acumulación de 53BP1 es dependiente de la actividad kinasa de ATM e independiente de BRCA1 (Silverman et al. 2004; Xu & Blackburn 2004).

Además de por fosforilaciones, el reclutamiento tanto de 53BP1 como de BRCA1 es dependiente de ubiquitinación y sumoilación (Jackson & Durocher 2013). El papel de estas modificaciones post-traduccionales se describe más ampliamente en el apartado 5 de la introducción. En cuanto al papel de BRCA1 en la resección, se ha demostrado que este proceso puede ocurrir en su ausencia, sin embargo se ha comprobado que la interacción entre BRCA1 y CtIP controla la velocidad con la que se resecciona (Cruz-García et al. 2014).

#### 4.4.2 Invasión

Una vez terminada la resección, la proteína RPA unida al ADN de cadena sencilla es sustituida por la recombinasa RAD51 que se une al ADN con menos afinidad que RPA *in vitro* (Peterson et al. 2011). Se requieren por tanto, actividades adicionales para la formación del nucleofilamento ADN-RAD51 (Figura I5). De entre estas actividades, cabe destacar a BRCA2, ayudada por las proteínas PALB2 y RAD52, los parálogos de RAD51 y el complejo BRCA1/BARD1 (West 2003). Todas estas proteínas son necesarias para la formación de focos de RAD51 tras IR, pero la función directa de cargar RAD51 al nucleofilamento es de BRCA2 (Figura I5). La interacción entre RAD51 y el carboxilo terminal de BRCA2 es importante para la HR, y está limitada a las fases S y G2 del ciclo celular mediante la fosforilación de BRCA2 dependiente de CDK (Esashi et al. 2005). Además, RAD51 es fosforilado por CHK1 y esta fosforilación es necesaria para el reclutamiento de RAD51 al sitio de daño. Por otro lado, ATM y/o ATR también fosforilan a BRCA2 (Matsuoka 2007). Además, tanto RPA1 como RPA2 sufren modificaciones post-traduccionales necesarias para promover la HR (D.-H. Lee et al. 2010). Así, RPA2 sufre fosforilaciones y defosforilaciones, y RPA1 es sumoilada facilitando el reclutamiento de RAD51 (Dou et al. 2010).

Seguidamente, la reparación por homología de secuencias puede continuar por diferentes rutas de reparación; las mencionadas SDSA, BIR y la HR clásica.

La invasión de una cadena en una secuencia homóloga forma un intermediario en forma de lazo denominado *D-loop* (Figura I5), en el que el extremo 3' OH de la cadena invasora es extendido por una polimerasa y entonces realineado para procesar el segundo extremo de la rotura (West 2003). Esta ruta es lo que se conoce como SDSA y se piensa que está promovida por la helicasa RTEL (Figura I5-e). Aunque los datos indican que la ruta SDSA es la principal vía de la reparación por HR en células somáticas de mamíferos, los HJs probablemente aumentan durante otros procesos de recombinación. La resolución correcta de las estructuras de Holliday es importante en la HR de células somáticas y para la estabilidad genómica. 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 donadora (Figura I5-f).

Cuando se forman los HJs se genera una región de heteroduplex, es decir, la molécula de ADN está formada por una cadena de la molécula invasora y otra que actúa de donadora de información (Figura I5). Los HJs pueden desplazarse a lo largo del ADN, en un proceso dependiente de ATP denominado migración. Esta migración incrementa o disminuye la longitud del heteroduplex de ADN dependiendo de la dirección del deslizamiento. Si los DSBs han ocurrido durante las fases S o G2 del ciclo celular, se usará la cromátida hermana como molde para realizar una reparación, en teoría, totalmente libre de errores (Johnson & Jasin 2000). Sin embargo, cuando se usa otro donador de información, este heteroduplex puede presentar pequeñas zonas en las que las bases no aparean correctamente. Su posterior reparación explica el fenómeno de conversión génica. En la mayoría de los eventos de HR, ya sea en levaduras o en células de mamíferos, se copia un fragmento pequeño de la molécula donadora y es lo que se denomina STGC (*short tract gene conversion*). Una pequeña proporción de eventos de HR en mamíferos copia un fragmento superior de varias kilobases y se denomina LTGC (*long tract gene conversion*) (Puget et al. 2005). Se ha descrito que

mutaciones en algunos parálogos de RAD51 como XRCC3, RAD51C y XRCC2 favorecen la HR con LTGC (Nagaraju et al. 2009).

#### 4.4.3. Resolución

Una vez formados los HJs, ambas moléculas de ADN, la molde y la invasora, quedan unidas entre sí. Por ello, los HJs deben ser procesados enzimáticamente. La resolución de los HJs es ejecutada por varios complejos enzimáticos. BLM (*Bloom's syndrome*), formando un complejo con la topoisomerasa III $\alpha$ , puede disolver los HJs y dar lugar a unos productos siempre sin entrecruzamiento (Wu & Hickson 2003). Alternativamente, estos pueden ser cortados por nucleasas dependientes de estructuras, que pueden generar entrecruzamientos (Figura I5). Existen al menos tres factores con esta actividad: el complejo MUS81-EME1 (Wyatt et al. 2013), GEN1, que promueve la resolución de los HJs por un corte simétrico y SLX4 (Fekairi et al. 2009). Recientemente se ha especulado que estas tres nucleasas puedan cooperar *in vivo* (Sarbjana & West 2014).

#### 4.4.4. SSA

En la ruta de reparación por SSA la rotura del ADN ocurre en o entre dos secuencias repetidas en orientación directa. Tras la resección, las zonas homólogas quedan expuestas, lo que conduce al alineamiento de las cadenas de las secuencias repetidas. Este alineamiento del ssDNA puede ser favorecido por RAD52, de una manera independiente de RAD51. Posteriormente, es necesaria la eliminación de los extremos colgantes por XPF/ERCC1 (Hartlerode & Scully 2009; Motycka et al. 2004). El producto de este evento de reparación deja una única copia de la secuencia repetida y se produce una delección de las secuencias intermedias.

## 5. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES (PTMs) EN LA REPARACIÓN DE LOS DSBs

Las modificaciones post-traduccionales consisten en la alteración de las proteínas tras su traducción mediante transformaciones químicas de sus

aminoácidos, ya sea la adición covalente de grupos funcionales o péptidos, o la lisis parcial de la proteína. Así mismo, estas modificaciones pueden ser reversibles o irreversibles. Entre las modificaciones que se pueden realizar se encuentran la fosforilación, glicosilación, nitrosilación, metilación, acetilación, lipidación, ubiquitinación, sumoilación y la nedilación.

Las modificaciones post-traduccionales son valoradas hace muchos años como importantes mecanismos para la regulación de la actividad celular y por su papel en el tratamiento y en la prevención de enfermedades.

Históricamente, en la DDR, los estudios se han centrado en las fosforilaciones producidas por las quinasas estructurales de los puntos de control del ciclo (ATM, ATR, CHK1, CHK2) (Figura 12). Sin embargo, en los últimos años, las investigaciones de diversos grupos han puesto de manifiesto el papel integral de otras modificaciones, entre las que destacan las mediadas por ubiquitina y otros UBLs (*ubiquitin-like proteins*) como SUMO. Sólo recientemente se ha empezado a entender la función de otros UBLs como NEDD8 (Meir et al. 2015).

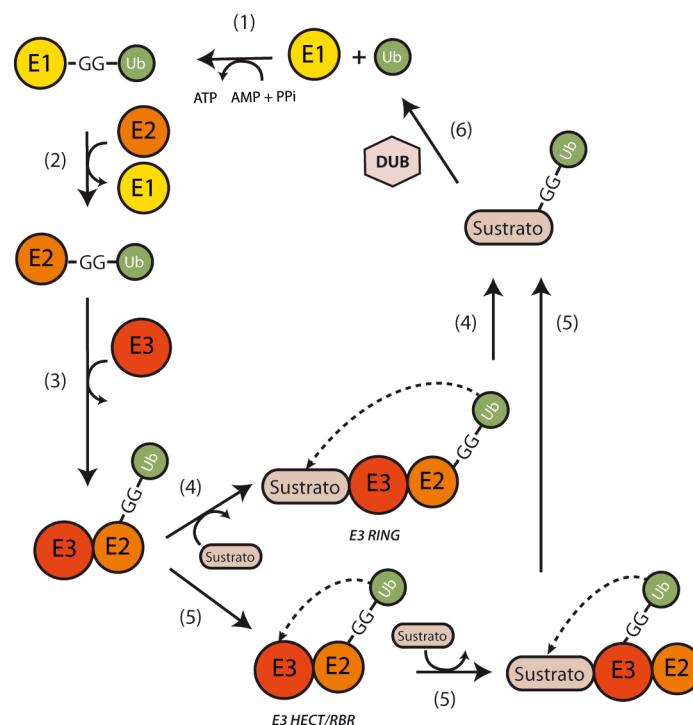
Al igual que se da una fuerte integración entre los sistemas regulados por SUMO y los regulados por ubiquitina durante la respuesta a los DSBs (Jackson & Durocher 2013), se espera un nivel similar de comunicación entre la ubiquitinación y la nedilación. De hecho, la función predominante de la nedilación es regular la actividad ubiquitinasa de las CRLs (ligasas E3 de ubiquitina de tipo RING-culinas) (Chung & Dellaire 2015). Es por ello que es de gran relevancia determinar cómo la actividad de las CRLs es regulada en el contexto de la respuesta al daño en el ADN.

## 5.1 MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES CON UBIQUITINA

### 5.1.1 La ubiquitina y su conjugación a los sustratos

La ubiquitina es una proteína altamente conservada evolutivamente, de tamaño pequeño, 76 aminoácidos, y originariamente identificada por su capacidad para inducir la degradación de proteínas en extractos de reticulocitos de manera dependiente de ATP (Ciehanover et al. 1978). Cuatro genes codifican ubiquitina en humanos: *UBC*, *UBB*, *UBA52* y *UBA80*. La ubiquitina se sintetiza en forma de un precursor que sufre un corte sobre un

motivo di-glicina en el carboxilo terminal. La ubiquitina es entonces conjugada, vía su carboxilo terminal, a las proteínas diana, generalmente en el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina. Esta conjugación implica un proceso enzimático en tres pasos, descrito por primera vez en los años 1980s, que emplea una enzima E1 (activación), después una enzima E2 (conjugación) y por último una enzima E3 (ligación) (Figura 17). La especificidad de los enlaces está determinada por las enzimas E2 y/o E3 específicas implicadas en la cascada de ubiquitinación (Rieser et al. 2013). Las rutas para la conjugación de la ubiquitina son complejas y, además, están altamente reguladas. En humanos se conocen ocho enzimas E1, dos de ellas específicas para ubiquitina, UBA1 y UBA6



**Figura 17. Esquema del ciclo de la ubiquitina.** La ubiquitina inicialmente se produce como un precursor que tras su procesamiento expone un motivo terminal GG. De una manera dependiente de ATP, una enzima E1 toma la ubiquitina a través de su motivo GG terminal formándose un enlace tioéster (1). La enzima E1 cargada con la ubiquitina es reconocida por una enzima E2 y transferida a un residuo de cisteína catalítico de la E2 a través de un enlace tioéster (2). A continuación una enzima E3 reconoce a la E2 cargada con la ubiquitina (3). Cuando son E3 de tipo RING, la transferencia de la ubiquitina al sustrato es facilitada por la E3 pero sin que ésta forme un enlace covalente directo con la ubiquitina (4). Alternativamente, en las E3 de tipo HECT/RBR, la ubiquitina es transferida al sitio activo de E3 antes de formar un enlace isopeptídico con una lisina del sustrato (5). El proceso puede ser revertido mediante las enzimas deubiquitinantes (DUBs) (6).



(Schulman & Harper 2009), 35 E2s activas y más de 1000 E3s putativas según su secuencia. Las E3s se dividen en tres familias principales: las RING (*really interesting new gene*), HECT (*homology to E6AP carboxyl-terminus*) y RBR (*ring between ring*) (Berndsen & Wolberger 2014). Las E3 RING se unen simultáneamente a la E2 cargada con ubiquitina y al sustrato, ya sea directamente o través de proteínas acompañantes, facilitando la transferencia de la ubiquitina al sustrato sin que exista unión directa entre la E3 y la ubiquitina en ningún momento (Figura 17).

No hay un motivo diana consenso para la conjugación de la ubiquitina al sustrato. En la mayoría de los casos, la ubiquitinación no está restringida a un residuo de lisina en particular aunque existen ejemplos de ubiquitinación en un residuo de lisina concreto como es el caso de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Mattioli & Sixma 2014).

Como otras modificaciones post-traduccionales, la ubiquitinación es un proceso dinámico y puede ser revertido por las DUBs (*deubiquitylating enzymes*). Hay cinco familias de DUBs, que abarcan un total de 79 genes. Las funciones de las DUBs pueden ser divididas en tres grupos: procesamiento de cadenas lineales de ubiquitina para generar ubiquitina libre, edición de las cadenas de ubiquitina y reversión de la ubiquitinación en los sustratos (Komander 2009). El balance entre las actividades de ubiquitinación y deubiquitinación es esencial para la regulación de un amplio rango de procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la transcripción, la apoptosis, la inflamación y la señalización del daño en el ADN y su reparación.

### **5.1.2 Función de la ubiquitinación en la reparación de los DSBs**

El primer dato sobre el papel de la ubiquitinación en la DDR en organismos superiores fue el descubrimiento de la mono- y poli-ubiquitinación de la proteína PCNA por RAD18, que es crucial para la coordinación de la tolerancia al daño en el ADN tanto en levaduras como en humanos (Sale 2012). Desde entonces, se ha comprobado que la ubiquitinación regula casi todas las rutas de reparación del ADN y, en particular, está integrada en los eventos de señalización temprano después de un DSB.

RNF8 es una ligasa de ubiquitina de tipo RING crítica para la conexión entre los eventos de fosforilación y ubiquitinación en la DDR. Se ha demostrado que RNF8 es la ligasa E3 predominante en la regulación de la ubiquitinación en los DSBs (Mailand et al. 2007) (Figura I3). Estos estudios han demostrado que RNF8 se une a través de su dominio FHA (*forkhead-associated*) a MDC1 fosforilado por ATM y media la ubiquitinación en K63 en los sitios de daño en colaboración con la enzima E2 UBC13 (ver apartado 4.1) (Figura I3). La ubiquitinación es requerida tanto para el reclutamiento de 53BP1 al DSB como para el del complejo RAP80/BRCA1. Además de la unión de MDC1, el dominio FHA de RNF8 interacciona con HERC2 (una ligasa E3 RING) fosforilado por ATM tras el daño en el ADN para formar un complejo MDC1-RNF8-HERC2 (Bekker-Jensen et al. 2010). Aunque no está claro aún si la actividad ligasa E3 de HERC2 se requiere para su función en la DDR, en células humanas, HERC2 estabiliza la interacción entre RNF8 y UBE2N y además mantiene el nivel de RNF8 promoviendo la ubiquitinación (Bekker-Jensen et al. 2010).

Para mantener la señal de ubiquitinación requerida para la DDR no sólo es necesaria RNF8, sino que se requiere la actividad de una segunda ligasa E3 de ubiquitina, RNF168, la cual se une a los sustratos ubiquitinados por RNF8 en el entorno del DSB (Figura I3). RNF8 promueve la ubiquitinación de la histona H2A (K13/15) y facilita el ensamblaje de 53BP1 y del complejo BRCA1/RAP80 al sitio de daño (Mattiroli et al. 2012). Como se ha comentado en el apartado 4.4.1, 53BP1 y BRCA1 tienen funciones opuestas, 53BP1 promueve el NHEJ y BRCA1 la HR. BRCA1 forma un complejo con BARD1 que funciona como una ligasa E3 de ubiquitina en una amplia variedad de sustratos en los sitios de daño, entre ellos la histona H2A y CtIP (Huen et al. 2010). Varios estudios sugieren que la actividad ligasa de BRCA1 no es crítica para su función como supresor de tumores y su papel en la HR, sin embargo parece ser que dicha actividad sí es importante para su interacción con BARD1 y otras proteínas formando el complejo BRCA1-A (Drost et al. 2011).

La depleción de RNF8 o RNF168 conlleva hipersensibilidad a los agentes que causan DSBs. Otros estudios han demostrado la función de RNF8/168 en el mecanismo de recombinación en el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Kracker & Durandy 2011), en la protección de los telómeros

(Rai et al. 2011; Peuscher & Jacobs 2011) y en la represión transcripcional que ocurre en los sitios de daño en el ADN (Shanbhag et al. 2010).

Hay estudios en *Xenopus laevis* que muestran que la proteína de unión al ADN KU80 es poliubiquitinada en su K48 por el complejo SCF<sup>FBXL12</sup> (que contiene la culina 1) y eliminada del ADN (Postow et al. 2008), sin embargo aún no se ha determinado si representa un mecanismo conservado en otras especies.

Otra ligasa E3 de ubiquitina que regula la elección de la ruta de reparación entre HR y NHEJ es RNF169, muy parecida a RNF168 en su arquitectura y en sus dominios (Panier et al. 2012). Estudios recientes han demostrado que RNF169 compite con 53BP1 y con BRCA1/RAP80 en el sitio de unión de H2A ubiquitinada por RNF168 afectando al balance entre NHEJ/HR (Panier et al. 2012; Poulsen et al. 2012).

## 5.2 Modificaciones post-traduccionales con SUMO

El enlace entre sumoilación y la respuesta al daño en mamíferos llegó a través del hallazgo de que SUMO1, SUMO2/3, UBC9, PIAS1 y PIAS4 se acumulan en los DSBs (Galanty et al. 2009; Morris et al. 2009). SUMO1-3 son unas proteínas con una alta expresión en mamíferos que están relacionadas estructuralmente con la ubiquitina y se unen covalentemente a proteínas diana mediante un sistema de conjugación similar al de la ubiquitinación en el que participan una enzima de activación E1 (SAE1/SAE2), una ligasa E2 (UBC9) y varias ligasas E3 con especificidad de sustrato. PIAS1 y PIAS4 son ligasas E3 de SUMO implicadas en DDR (Galanty et al. 2009). Se ha descrito que proteínas importantes para la reparación de los DSBs como 53BP1, BRCA1 y HERC2 son sumoiladas. BRCA1 es sumoilada tanto por PIAS1 como por PIAS4, sin embargo 53BP1 y HERC2 sólo son sumoilados por PIAS4. Además, la depleción de 53BP1 afecta al reclutamiento de SUMO1 mientras que la depleción de BRCA1 afecta al reclutamiento de SUMO2/3, por lo que parece que la DDR es canalizada por rutas independientes mediadas por las relaciones entre 53BP1-SUMO1 y BRCA1-SUMO2/3 (Figura I3) (Jackson & Durocher 2013). Las modificaciones con SUMO están fuertemente relacionadas con las modificaciones por ubiquitina, así la sumoilación de BRCA1 intensifica su actividad ligasa de ubiquitina (Morris et al. 2009). La depleción de RNF8 y

RNF168 reduce la acumulación de SUMO1 y SUMO2/3 en los sitios de daño, sin embargo no impide el reclutamiento de PIAS1 y PIAS4 (Galanty et al. 2009; Morris et al. 2009). Por otro lado, RNF168 y HERC2 son sumoilados de manera dependiente de PIAS4 tras el daño. La depleción de PIAS4 reduce los niveles de RNF168 viéndose perjudicada la interacción entre HERC2 y RNF8 tras irradiación y reduciéndose la acumulación de HERC2 en la cromatina (Danielsen et al. 2012).

Ejemplo de la conexión existente entre la ubiquitinación y la sumoilación son las ligasas E3 de ubiquitina marcadas con SUMO (STUBLs, *SUMO-targeted ubiquitin ligases*) que reconocen y tienen un dominio de interacción con SUMO (SIM, *sumo interacting motif*) y cuya actividad es ubiquitinar proteínas sumoiladas. Tienen un papel importante en la disociación de complejos altamente sumoilados en los DSBs y en enlazar esta sumoilación a la degradación a través del proteosoma.

En levaduras, la primera STUBLs caracterizada fue Slx8-Rfp. Su homólogo en humanos es RNF4, el cual es importante para la reparación de los DSBs, tanto por HR como por NHEJ, y para la liberación y recambio en el sitio de daño de varias proteínas importantes para la reparación incluyendo MDC1, 53BP1, RPA, RAD51, FANCI y FANCD (Yin et al. 2012; Gibbs-Seymour et al. 2015; Rojas-Fernandez et al. 2014).

Otra STUBL con un papel en DDR es RNF111 o Arkadia, aunque en este caso la señal de ubiquitinación no es una señal para que la proteína diana sea sustrato del proteosoma, sino para reclutarla al sitio de daño (Poulsen et al. 2013)

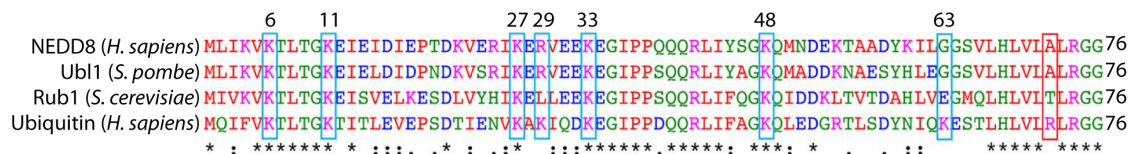
## 5.3 Modificaciones post-traduccionales con NEDD8

### 5.3.1 NEDD8

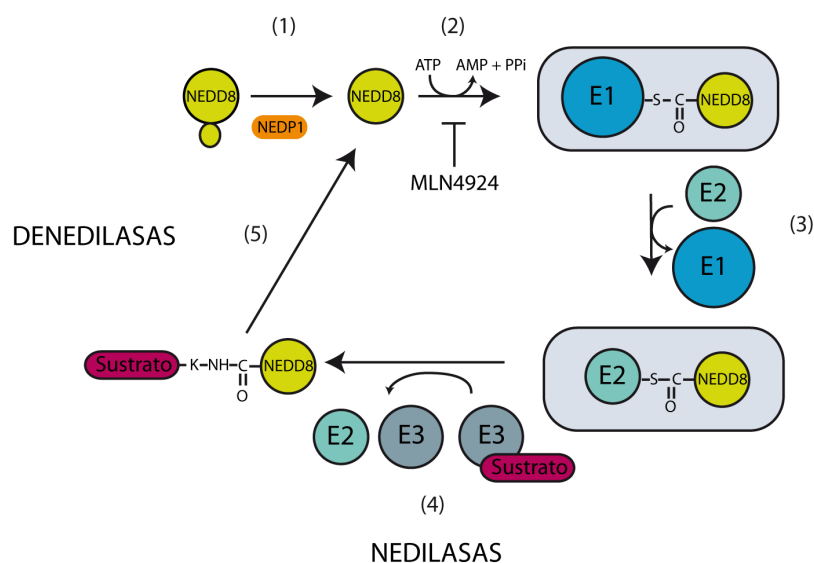
En 1992 se descubrieron 10 genes identificados por su baja expresión durante el desarrollo neuronal, NEDD1-10 (*neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 1-10*) (Kumar et al. 1992). NEDD8 es una UBL y es la que se parece más, a nivel de secuencia y estructura secundaria, a la ubiquitina (Figura 18A) (Kamitani et al. 1997; Whitby 1998). NEDD8 se conjuga a las proteínas diana mediante una cascada de nedilación que está muy

conservada desde levaduras hasta humanos y es una ruta esencial en todos los organismos estudiados, salvo en *S. cerevisiae* en la que su homólogo es Rub1 (Liakopoulos et al. 1998). Como la ubiquitina, NEDD8 se sintetiza primero

A



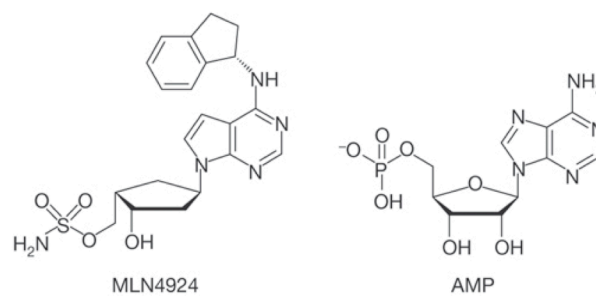
B



**Figura 18. Homología de secuencias de NEDD8 y el ciclo de nedilación/denedilación.** (A) Alineamiento de la secuencia humana de NEDD8, la ubiquitina y los homólogos a NEDD8 en *S. pombe* (Ubl1) y *S. cerevisiae* (Rub1). Los residuos de lisina esenciales para la formación de cadenas de ubiquitina están encuadrados en azul. El residuo 72 (una arginina en la ubiquitina y una alanina en NEDD8) es crítico para la especificidad de la E1 y está encuadrado en rojo. Los colores de cada residuo se asocian a sus propiedades fisicoquímicas: rojo, pequeño (pequeño+hidrofóbico, incluyendo al aromático Y); azul, ácido; magenta, básico; verde, hidroxilo+sulfidriilo+amino+G. El asterisco (\*) indica que es un residuo conservado, los símbolos :/ . representan la alta o baja conservación de propiedades similares entre grupos. (B) Ciclo de nedilación/denedilación. NEDD8 es sintetizado como un precursor que es procesado en un residuo terminal de glicina (76) por la actividad hidrolasa de enzimas denedilasas quedando expuesto un motivo diglicina que sirve como sitio de unión a los sustratos diana (1). Este carboxilo terminal expuesto es adenilado por una enzima de activación E1, en conjunción con ATP que es transferido a un residuo de cisteína mediante un enlace tioéster (2). NEDD8 activado es a continuación transferido a una enzima de conjugación E2 mediante la formación de otro enlace tioéster (3). Una ligasa E3 transfiere NEDD8 al grupo ε-amino de una lisina del sustrato resultando en la formación de un enlace isopeptídico (4). La modificación covalente de los sustratos puede ser revertida por la acción de enzimas denedilasas (más detalles en el texto) (5). Figura modificada a partir de (Brown et al. 2015)

como un precursor que es procesado en un residuo conservado de Gly76 en el extremo carboxilo por una actividad hidrolasa de enzimas denedilasas y como resultado expone un motivo diglicina que es requerido para la unión covalente de NEDD8 a sus sustratos (Figura 18B). NEDD8 es conjugado a un residuo de lisina del sustrato mediante una cascada enzimática de tres pasos similar a lo que ocurre con la ubiquitina, con enzimas específicas de nedilación E1, E2 y E3 (Figura 18B). En células humanas, la inhibición de la conjugación de NEDD8 a sus proteínas dianas hipersensibiliza a las células a agentes que dañan el ADN como por ejemplo la mitomicina C, el cisplantino y la IR (Garcia et al. 2014; Yang et al. 2012).

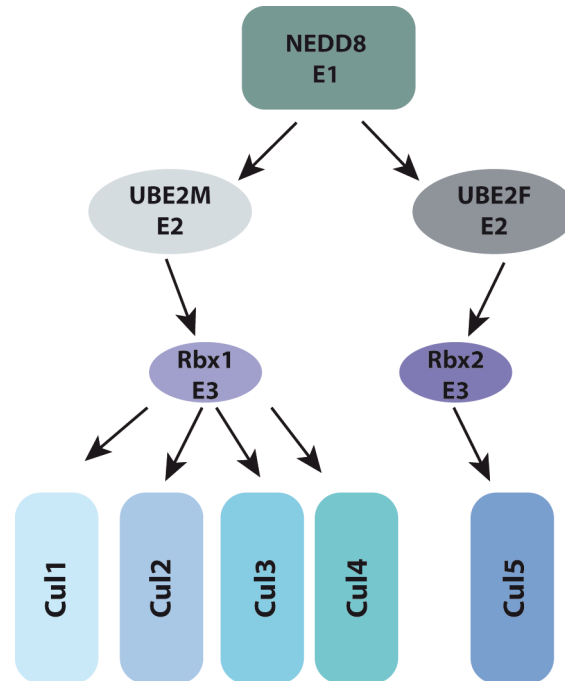
La enzima E1, denominada NAE (*NEDD8 activating enzyme*), es un heterodímero compuesto por NAE1-UBA3 en el que ambos monómeros son muy parecidos a UBE1, una E1 de ubiquitina. La especificidad de unas E1 por



**Figura 19. Estructura química del MLN4924.** Para su comparación se muestra la estructura del AMP. Figura modificada a partir de Soucy et al. 2009.

la ubiquitina o NEDD8 viene determinada por el residuo 72 de ambas (Figura 18A). Se ha desarrollado un inhibidor específico de la nedilación, denominado MLN4924 (Figura 19) que se une a la proteína NAE1 en lugar del ATP, bloqueando la nedilación por lo que es muy útil para investigar las consecuencias de la inhibición a nivel celular. El MLN4924 se encuentra actualmente en fase III de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (Soucy et al. 2009).

Se conocen dos enzimas E2 de NEDD8: UBE2M y UBE2F (Liakopoulos et al. 1998; Gong & Yeh 1999; Huang et al. 2009). UBE2M tiene, preferencialmente, como ligasa E3 a RBX1 (ROC1) y UBE2F tiene a la ligasa E3 RBX2 (también llamada ROC2 o RNF7) (Huang et al. 2009). RBX1 y -2 son ligasas E3 de tipo RING que se unen a su sustrato y catalizan la transferencia



**Figura I10. Esquema sobre las distintas rutas moleculares según las enzimas E2-RING de la cascada de nedilación.** Las enzimas E2-RING (UBE2M y UBE2F) durante la nedilación tienen como enzimas diana las ligasas E3 RBX1 y RBX2 respectivamente y determinan qué culinas son sustratos de nedilación. Figura modificada de Huang et al. 2009.

de NEDD8 desde la E2 UBE2M/F (Scott et al. 2010) sin que la E2 y el sustrato interactúen. Tanto RBX1 como RBX2 pueden funcionar como ligasas E3 de ubiquitina (Kamura et al. 1999; Petroski & Deshaies 2005) (Figura I10). Así mismo, RNF168 y RNF111 pueden funcionar como ligasas de NEDD8 (Ma et al. 2013; Li et al. 2014).

El sustrato principal conocido de la nedilación son un grupo de proteínas denominadas culinas. Se han identificado ocho miembros: CUL1, 2, 3, 4A, 4B, 5, 7 y PARC (Figura I10) y todos tienen un dominio evolutivamente conservado característico de las culinas y un sitio diana de nedilación en el carboxilo terminal. Las culinas constituyen el andamio sobre el que se montan los complejos CRLs (*cullin-RING ligases*). Las CRLs son responsables de hasta el 20% de toda la degradación de las proteínas vía proteosoma mediada por ubiquitina (Lydeard et al. 2013; Sarikas et al. 2011; Soucy et al. 2009). Las CRLs son responsables de la poli-ubiquitinación y consiguiente degradación de muchas proteínas reguladoras del ciclo celular, de la transducción de señales y del desarrollo. La especificidad por el sustrato se define a nivel de la E2/E3, así

UBE2M/RBX1 nedila preferencialmente las CUL1-4 y UBE2F/RBX2 la CUL5 (Huang et al. 2009) (Figura I10). Como en el caso de la ubiquitina, NEDD8 contiene un residuo de lisina concreto para la formación de cadenas de NEDD8, sin embargo sólo se ha podido observar *in vitro* la formación de cadenas de NEDD8 en sustratos distintos a las culinas y bajo la sobreexpresión de NEDD8, por tanto, la relevancia fisiológica de las cadenas de NEDD8 está actualmente cuestionada (Leidecker et al. 2012; Xirodimas et al. 2008; Jones et al. 2008).

### 5.3.2 Las denedilasas

Como otras modificaciones post-traduccionales, la nedilación es un proceso reversible y puede ser revertida por la acción de una isopeptidasa de NEDD8 (denedilasa). En el año 2005, se describieron las denedilasas signalosoma COP9 y NEDP1 (SENP8) como las isopeptidasas capaces de eliminar NEDD8 (Figura I8) (Watson et al. 2011).

El signalosoma COP9 (CSN) es un complejo formado por 8 subunidades que fueron designadas como CSN1 a CSN8 (Deng et al. 2000) y que originariamente se aisló como un supresor de la fotomorfogénesis en plantas (Chamovitz & Deng 1995). Posteriormente, se redescubrió en los glóbulos rojos (Seeger et al. 1998) y en el bazo (Wei & Deng 1998) vislumbrándose que el papel de estas proteínas iba más allá de su función en plantas. Se ha identificado en otros tipos de eucariotas como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans*, *C. elegans* y *D. melanogaster* (Hannss & Dubiel 2011).

La función biológica principal del CSN es la regulación de las proteínas CRLs (Petroski & Deshaies 2005). CSN es la única isopeptidasa que corta NEDD8 desde las culinas de manera eficiente *in vivo*, aunque hay otras proteínas que poseen también actividad isopeptidasa sobre NEDD8 *in vitro* (Rabut & Peter 2008). Cada subunidad CSN se caracteriza por ser una superficie de unión capaz de interactuar con proteínas reguladoras diferentes. La delección de los genes de cualquiera de estas subunidades en ratón es letal en estadíos tempranos del desarrollo embrionario. Sin embargo, esto no es así en eucariotas de complejidad inferior como las levaduras o algunos hongos, lo que indica que estas proteínas han ido ganando importancia durante la evolución (Yan et al. 2003). Se ha comprobado que el



complejo CSN tiene que estar completo para su correcta actividad enzimática *in vitro* (Sharon et al. 2009), aunque es la subunidad CSN5 la que tiene un motivo JAMM (dominio Jab1/MPN) que es crítico para la actividad de nedilasa del complejo CSN. En *S. pombe* el CSN participa en la DDR, ya que los mutantes *Csn1* y *Csn2* tienen un retraso en la progresión de la fase S y son hipersensibles a UV y a radiación gamma (Mundt et al. 1999). Esta relación también existe en *A. nidulans* (Lima et al. 2005) y en *D. Melanogaster* (Tomoda et al. 2004). En mamíferos, Groisman et al. (2003) demostraron que el complejo CSN regula las CRLs implicadas en los procesos de reparación.

Otra nedilasa bien caracterizada es NEDP1, también llamada Denedilasa 1 (DEN1) y SENP8 (llamada así por su homología con la deconjugasa de SUMO Ulp1/SENP). NEDP1 es capaz de unirse selectivamente al precursor de NEDD8 (-G<sup>75</sup>G<sup>76</sup>GGLRQ) e hidrolizar su carboxilo terminal resultando la forma funcional de NEDD8 (-G<sup>75</sup>G<sup>76</sup>) para su conjugación con las culinas. NEDP1 también es capaz de eliminar NEDD8 de su sustrato, pero con una eficiencia inferior al signalosoma COP9 (Wu et al. 2003). NEDP1 puede eliminar NEDD8 de las culinas tanto *in vitro* como *in vivo*, es altamente específica para NEDD8, no actúa sobre SUMO ni sobre ubiquitina y es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución (Mendoza et al. 2003). Un aumento en la actividad NEDP1 resultaría en la denedilación de las culinas y en un incremento en la disponibilidad del NEDD8 maduro, por tanto si el procesamiento de NEDD8 es limitante, es una forma de generar NEDD8 libre (Jackson & Durocher 2013). El aumento de la actividad de NEDP1 implica el bloqueo de la degradación de proteínas ubiquitinada por las culinas y un bloqueo en la progresión del ciclo celular. Con respecto a su papel en la DDR, se ha comprobado que NEDP1 funciona como nedilasa de la histona H2A y es la responsable también de la denedilación de RNF168 (Li et al. 2014).

### 5.3.3 Papel de la nedilación en la respuesta al daño en el ADN

De todas las culinas, CUL4A y CUL4B son las que se han relacionado más con la DDR. A nivel celular, existe bastante redundancia funcional entre ambas culinas. Tienen un papel bien definido en la reparación por NER además de intervenir en la respuesta al daño en el ADN a nivel del control del

ciclo celular y de la reparación de los DSBs (Rizzardi & Cook 2012). Hay diversos ejemplos que explican la importancia de las ligasas RING-culina en controlar el ciclo celular en respuesta a daños en el ADN. Por ejemplo, CRL4<sup>CDT2</sup> promueve la degradación de CDT1 de una manera dependiente de la unión de PCNA a la cromatina. Otro ejemplo es CDC25A, que es una fosfatasa requerida para la activación de kinasas dependientes de ciclinas capaces de llevar a cabo la progresión del ciclo celular y que tras el daño en el ADN es fosforilada de una manera dependiente de CHEK1/CHEK2, conduciendo a su ubiquitinación por SCF <sup>$\beta$ TRCP</sup>, degradación y en consecuencia la parada del ciclo (Sancar et al. 2004).

En células humanas, la inhibición de la conjugación de NEDD8 hipersensibiliza a las células a los agentes que dañan el ADN tales como la mitomicina C, el cisplatino y la IR (Garcia et al. 2014; Koinuma et al. 2003). Dado el amplio rango de efectos causados por la inhibición de la nedilación, es probable que la sinergia observada sea de origen multifactorial y específico según el tipo celular.

Recientes estudios han relacionado la nedilación con la reparación de los DSBs de una forma más directa ya que NEDD8 se concentra en los sitios de daño (Ma et al. 2013). En este estudio se concluyó que RNF111 funciona como una ligasa E3 de NEDD8 responsable de la acumulación de NEDD8 en los sitios de daño y que la proteína UBE2M es la ligasa E2 para NEDD8 en respuesta a la DDR. La nedilación de la histona H4 mediada por RNF111 es esencial para el reclutamiento de RNF168 a los sitios de daño (Ma et al. 2013). Otro estudio reciente muestra que la nedilación es importante para la ubiquitinación de NBS1 y, por tanto, para la activación de ATM (Wu et al. 2012).

Por otro lado, se ha propuesto que las histonas H2A, H2B y H4 son sustratos de nedilación (Li et al. 2014). Aunque RNF168 predominantemente conjuga ubiquitina a H2A en los estadios tempranos de la reparación (a los 10 minutos de producirse el daño), RNF168 también es capaz de funcionar como una ligasa E3 de NEDD8 nedilando a la histona H2A. La nedilación de RNF168 decae a los 30 minutos del daño, coincidiendo con una disminución en su interacción con la enzima E2 UBC13 por lo que su actividad ligasa de ubiquitina sobre H2A disminuye. La histona H2A es tanto ubiquitinada como nedilada. Tras el daño, la histona H2A es predominantemente ubiquitinada y

su nedilación es reducida para favorecer los procesos de reparación (Li et al. 2014). En estadios posteriores a la reparación, la nedilación de H2A aumenta y la ubiquitinación disminuye a un nivel basal por lo que se piensa que el proceso de reparación del daño en el ADN está regulado negativamente por la nedilación de la H2A. La nedilación por RNF168 de la histona H2A regula negativamente su ubiquitinación dando como resultado una disminución en el reclutamiento de BRCA1 a los sitios de daño (Li et al. 2014).



## OBJETIVOS



Los objetivos de esta tesis son:

1. Caracterizar y validar los sistemas SSR en sus versiones 1.0 y 2.0 para su utilización en la medición del balance entre la ruta de reparación por NHEJ y por recombinación homóloga de los DSBs en células humanas bajo diferentes condiciones experimentales.
2. Establecer un flujo de trabajo para la realización de un escrutinio con una librería de esiRNA de genoma completo usando el sistema SSR2.0.
3. Analizar el efecto de una minilibrería de inhibidores con potencial terapéutico en el equilibrio entre NHEJ y HR.
4. Determinar cómo los mecanismos de metilación/demetilación regulan la reparación de cortes de doble cadena en células humanas.





## RESULTADOS

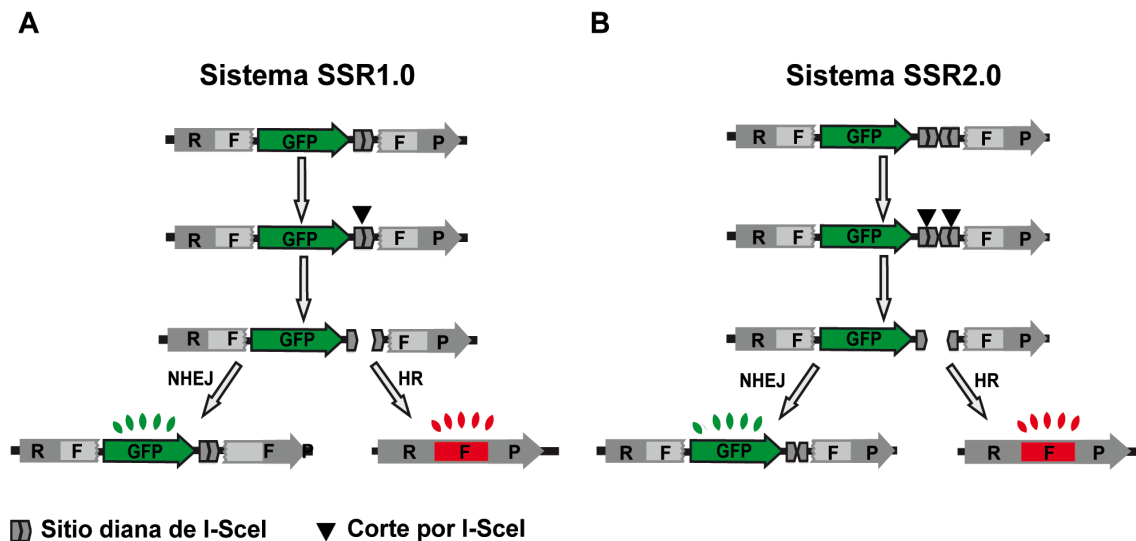


# 1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE REPARACIÓN *IN VIVO* SEE-SAW REPORTER (SSR). DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN ESCRUTINIO CON UNA LIBRERÍA DE esiRNAs y EL SISTEMA SSR2.0.

## 1.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA SSR.

El balance entre NHEJ y HR es esencial para una reparación óptima del ADN (vease el apartado 4 de la Introducción). Con anterioridad a este trabajo, en nuestro laboratorio se diseñaron unos sistemas que permitían medir, *in vivo*, si la reparación de un corte de doble cadena se realizaba por uno u otro mecanismo. Estos sistemas se denominan *See-Saw Reporters* (SSR) y se dispone de dos versiones, SSR1.0 y SSR2.0 (Figura R1) (Gomez-Cabello et al. 2013). Ambos sistemas sirven para detectar desequilibrios entre los mecanismos de reparación de NHEJ/HR y no reflejan necesariamente un aumento o disminución de una ruta de reparación u otra, sino un cambio en el equilibrio entre ambas.

En ambas versiones, el sistema consiste en un gen de la GFP flanqueado en el 3' y en el 5' por sendas versiones truncadas de la RFP que comparten 302 pb de homología (repeticiones directas) (Figura R1). En el sistema denominado SSR1.0 se insertó una diana de reconocimiento para la meganucleasa I-SceI (Figura R1A) y en el sistema SSR2.0 se insertaron dos secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción en sentidos opuestos (Figura R1B). Ambos sistemas expresan el gen de la GFP de manera constitutiva ya que la diana I-SceI está insertada en el extremo 3' del gen. Decidimos hacer esta aproximación diferente a la de los sistemas convencionales, DR-GFP, SA-GFP y EJ5, los cuales disponen de la diana I-SceI al comienzo del gen (ver la Figura M1 de los materiales y métodos) (Stark et al. 2004; Bennardo et al. 2009). Con los sistemas convencionales sólo se pueden observar los eventos de reparación mutagénicos y si la pauta abierta de lectura es restaurada. Es decir, los sistemas convencionales no son capaces de detectar la reparación por NHEJ clásico libre de errores ni la mayoría de



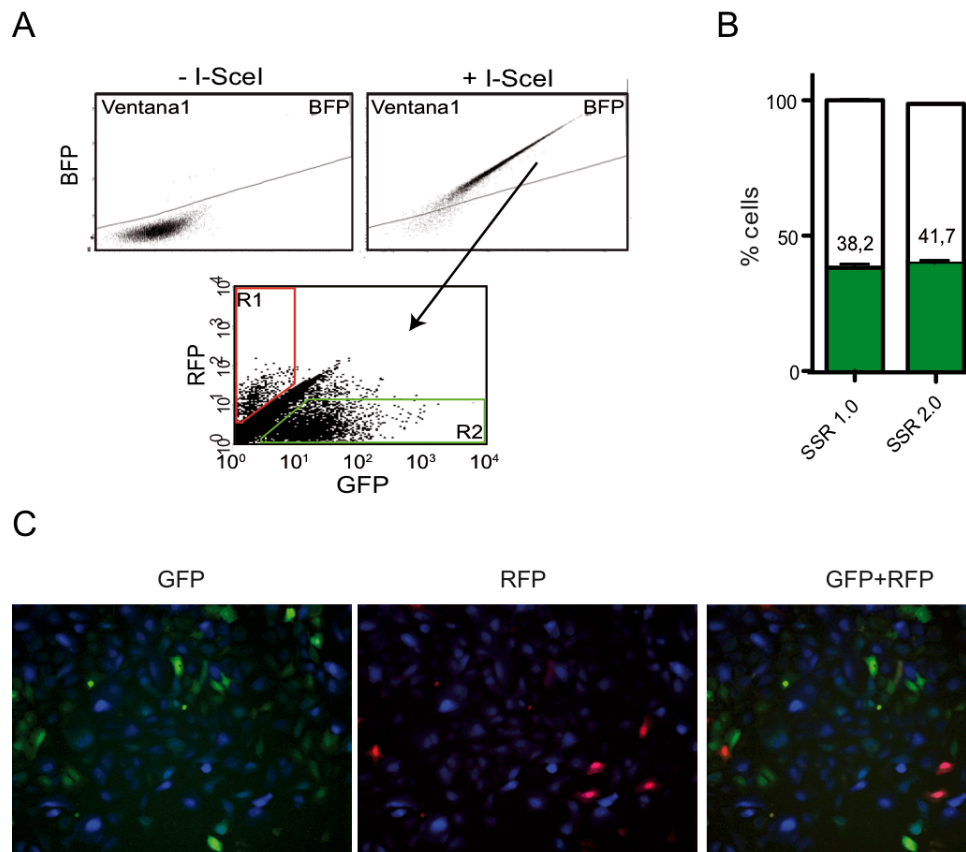
**Figura R1. Representación esquemática de los sistemas SSR1.0 y SSR2.0.** (A) Sistema SSR1.0. El gen de la GFP está flanqueado por dos regiones truncadas del gen de la RFP (RF y FP) que comparten 302 pb de homología. Un sitio diana para la endonucleasa I-SceI fue clonado en el extremo 3' del gen de la GFP. La expresión de la enzima I-SceI genera un DSB; cuando el daño es reparado por NHEJ, las células expresan la proteína GFP y por tanto son verdes, mientras que la reparación por HR genera un gen de la proteína RFP funcional y las células son rojas. (B) Sistema SSR2.0. Igual que en (A) pero en este caso se clonaron dos dianas para I-SceI en orientación opuesta en el extremo 3' del gen de la GFP.

uniones de extremos mutagénicos que no restauran la fase de lectura. Por el contrario nuestros sistemas nos permiten detectar tanto la reparación por NHEJ libre de errores como la mutagénica (Gomez-Cabello et al. 2013). Para que la detección de los eventos de reparación por NHEJ sea fiable es fundamental que la eficacia en el corte por I-SceI sea alta, de manera que toda la señal fluorescente verde detectada provenga de eventos de reparación por NHEJ.

En el sistema SSR1.0 el corte con la enzima I-SceI genera un único sitio de corte religable por sus extremos 3' libres que pueden ser unidos de una manera precisa regenerando el sitio diana para la I-SceI, el cual puede volver a ser cortado de nuevo. Este ciclo puede repetirse de manera indefinida hasta que el sitio de reconocimiento para la enzima desaparezca por reparación mediada por homología o por una unión mutagénica de los extremos. Este sistema comparte con los sistemas anteriormente publicados su inclinación a medir la reparación mutagénica. En el sistema SSR2.0 hay dos dianas de restricción próximas y en orientación inversa (Figura R1B). El sitio diana para la I-SceI no es una secuencia palindrómica y la reparación por NHEJ de dos

secuencias diana invertidas destruye la secuencia diana. Por tanto, en esta versión del sistema tanto la reparación por NHEJ como HR elimina el sitio para la enzima I-SceI y la mayoría de los eventos de reparación representan un único ciclo de rotura/reparación. Por tanto, el sistema SSR2.0 mide el resultado de un único evento de reparación, mientras que el SSR1.0 puede sufrir varias rondas de reparación y, por tanto, favorece aquellos en los que la diana de I-SceI es eliminada. Hay que aclarar que una posibilidad adicional es que tenga lugar la resección, pero la reparación venga mediada por alt-NHEJ, en este caso las células podrían perder la región intermedia del gen de la GFP, por lo que no sería funcional y sin llegar a restaurar el gen de la RFP, por tanto las células no serían fluorescente ni en el verde ni en el rojo, siendo invisible para nuestro sistema.

En el laboratorio, el Dr. Gómez-Cabello generó dos líneas estables para cada sistema con una única copia intregada, así se obtuvieron las líneas U2OS-SSR1.0 y U2OS-SSR2.0. Para inducir el corte de doble cadena *in vivo* en las células con los sistemas SSR utilizamos partículas lentivirales conteniendo el gen para la enzima I-SceI y el gen que codifica la proteína fluorescente azul (BFP) (ver materiales y métodos apartados 1.1 y 1.3). Así, es posible seleccionar aquellas células en las que se expresa la nucleasa siguiendo las que emiten fluorescencia azul y analizando la fluorescencia verde y roja exclusivamente de dicha población (Figura R2A). Al inducir la expresión de la enzima I-SceI, observamos que el 100% de las células cortaban su ADN y que el gen de la GFP dejaba de ser funcional (Gomez-Cabello et al. 2013). Cuando la reparación tiene lugar mediante el NHEJ clásico, tanto libre de errores como con pequeñas mutaciones, el gen de la GFP es restaurado y las células son verdes (Figura R2A). Cuando tiene lugar la resección, y el NHEJ es inhibido, las regiones homólogas del gen de la RFP son expuestas y usadas para reparar el corte mediante el sistema de reparación SSA (Hartlerode & Scully 2009; Huertas 2010; Heyer et al. 2010). En este caso, la reparación crea un gen de la RFP funcional y se elimina el gen de la GFP, por lo que las células son rojas (Figura R2A). Otra posibilidad es que tenga lugar la resección y la reparación sea llevada a cabo por el mecanismo de alt-NHEJ. Por tanto, la población que se obtiene tras la reparación del corte de doble cadena es heterogénea y está formada, además de por células verdes y rojas,



**Figura R2. Caracterización inicial de los sistemas SSR.** (A) Análisis por citometría de los sistemas SSR. Gráfico representativo de células que expresan de manera estable el sistema SSR2.0, transfectadas o no con partículas lentivirales que contienen la construcción BFP-I-SceI. El análisis por citometría determina las células que emiten fluorescencia azul (BFP) y son agrupadas en una ventana para separarlas de las que carecen de dicha fluorescencia. Las células de la ventana 1 se analizaron para la presencia de fluorescencia verde o roja definiendo dos regiones R1 (rojas) y R2 (verdes). (B) Cuantificación del porcentaje de células que expresan GFP o RFP después de la infección lentiviral con BFP-I-SceI. Células con el sistema SSR1.0 y células con el sistema SSR2.0 fueron infectadas con partículas lentivirales que contenían la proteína BFP y la meganucleasa I-SceI. Como control se incluyó un shRNA sin diana conocida. Tras la reparación del corte de doble cadena, se cuantificó por citometría de flujo el porcentaje que se obtenía de células con fluorescencia que eran verdes o rojas en cada uno de los sistemas. (C) Imágenes obtenidas de los sistemas SSR mediante el microscopio ImageXpress Micro. Tras la inducción del corte de doble cadena por la meganucleasa I-SceI, las células que repararon por NHEJ se visualizan en verde y las células que repararon por HR se observan en rojo. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342.

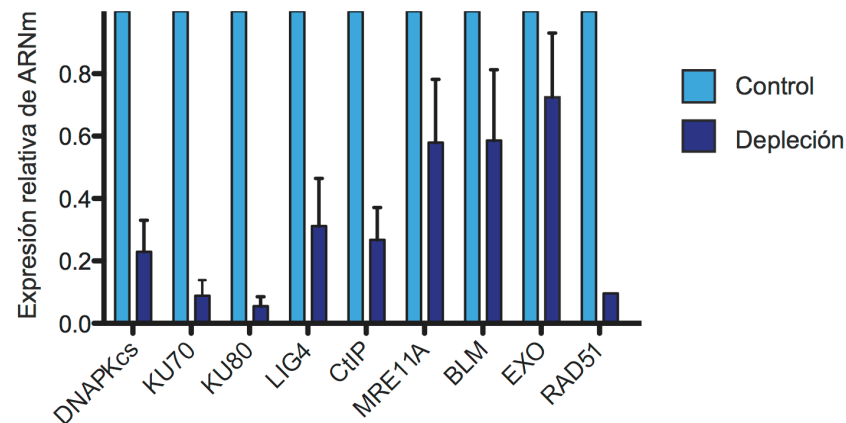
por: i) células que no han reparado el daño, o que lo han reparado tan recientemente que no les ha dado tiempo a acumular suficiente proteína para visualizarla por FACS; ii) células que aún manteniendo la resistencia han perdido el sistema y por tanto no son ni verdes ni rojas; iii) células que han

reparado el daño pero no consiguen expresión de la RFP ni de la GFP, como aquellas reparadas por el alt-NHEJ.

En el análisis se tuvo en cuenta que las células en las que la enzima I-SceI no había cortado permanecerían verdes afectando al conteo del número de eventos de reparación por NHEJ. Para analizar sólo las células que expresaban la enzima I-SceI, y que por tanto se había producido un DSB, se usó la proteína BFP que se expresa en el mismo plásmido de la I-SceI y se seleccionaron exclusivamente las células azules (ver materiales y métodos apartado 1.2.2). Dos días después de la infección, las células fueron preparadas y analizadas como se describe en los materiales y métodos apartados 1.5.3 y 1.6.2. Así, para calcular el balance entre HR y NHEJ, se cuantificó el porcentaje de células verdes y el porcentaje de células rojas de la población azul (Figura R2). Este análisis se puede hacer mediante FACS o por microscopia (Figura R2). Considerando exclusivamente las células azules que expresaban GFP o RFP, el porcentaje de células verdes en el sistema SSR1.0 fue del 38,2% y para el sistema SSR2.0 fue del 41.4% (Figura R2B). Unas imágenes representativas de la apariencia de las células con los sistemas se encuentran en la Figura R2C, donde los núcleos están teñidos con Hoechst 33258 (azul), las células que han reparado por NHEJ fluorescen en verde y las que han reparado por SSA fluorescen en rojo.

## **1.2. SENSIBILIDAD DEL SISTEMA SSR AL SILENCIAMIENTO DE GENES IMPLICADOS EN REPARACIÓN (NHEJ/HR).**

Para validar los sistemas SSR analizamos el impacto en ellos de la depleción mediante shRNAs de genes que se conocen que afectan el equilibrio entre NHEJ y HR (Tabla M2). En concreto, genes estructurales de NHEJ y de la resección del ADN. Se cuantificó el nivel de depleción obtenida con los diferentes shRNAs mediante PCR cuantitativas (Figura R3). Para facilitar la comparación entre los sistemas SSR1.0 y SSR2.0 y entre experimentos, normalizamos el ratio NHEJ/HR a un shRNA control cuya secuencia diana está ausente en el genoma humano (Tabla M2). De este modo, un valor cercano a 1 significa que el equilibrio entre ambos sistemas de reparación es similar al control. Valores inferiores a 1 que hay un aumento de células rojas, o sea, más



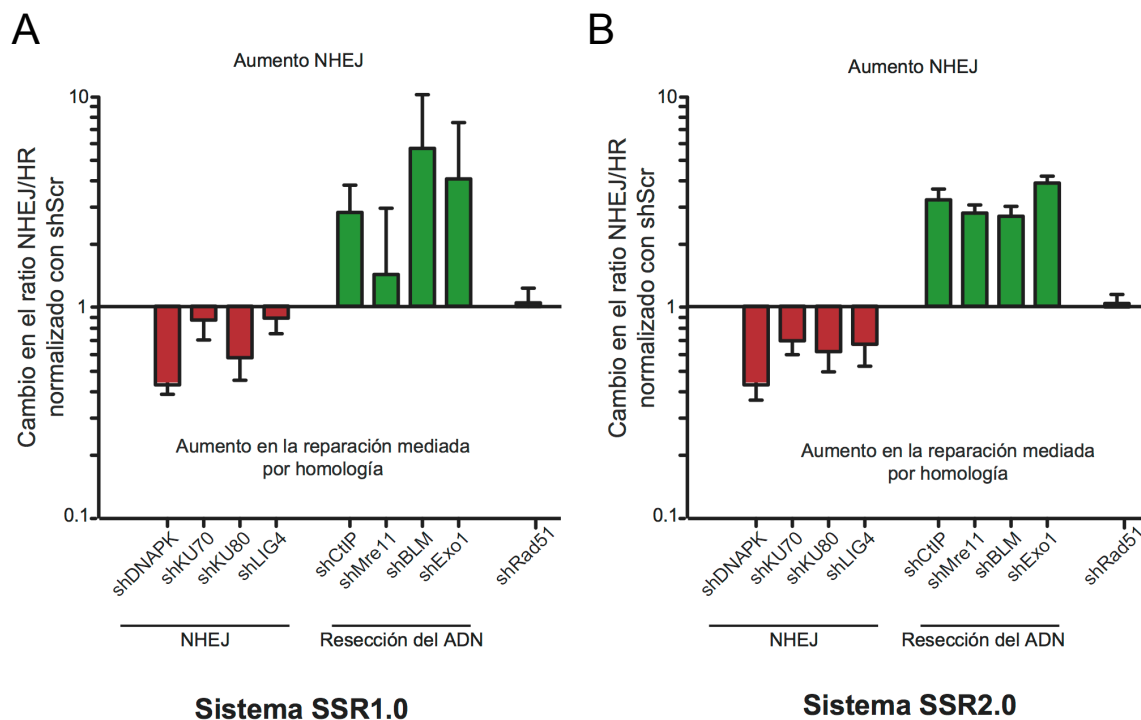
**Figura R3. Niveles de silenciamiento obtenidos por depleción con shRNAs de genes que afectan el equilibrio entre la reparación por NHEJ y HR.** Se realizaron RT-PCR cuantitativas a partir de ARNm de células transfectadas de manera estable con los shRNAs indicados en la figura. El nivel de cDNA de cada gen se normalizó con el cDNA del gen de la actina. La expresión relativa se cuantificó mediante un shRNA control. Se representa la media y el error de un mínimo de tres experimentos independientes por triplicado.

recombinación homóloga. Finalmente, un aumento del NHEJ se visualiza con valores superiores a 1.

Previamente, se había descrito en varios organismos que bloquear el mecanismo de reparación por NHEJ conduce a las células a aumentar la resección del ADN y por tanto la recombinación homóloga (Huertas 2010; Chapman et al. 2013; Clerici et al. 2008; Fradet-Turcotte et al. 2013; Muñoz-Galvan et al. 2013). Así, silenciamos diversos genes que desempeñan un papel clave en la reparación por NHEJ como las tres subunidades del complejo DNA-PK (DNA-PKcs, KU70 y KU80) y la proteína Ligasa 4 (LIG4). Observamos una desviación en el equilibrio NHEJ/HR hacia un incremento en la reparación mediada por homología en ambos sistemas SSR (Figura R4). Estos resultados están en concordancia con resultados previamente publicados que indican que en ausencia de NHEJ, los extremos del ADN se encuentran desprotegidos, ocurre la resección y los cortes tienden más a ser reparados por recombinación homóloga.

Por otro lado, y como cabría esperar, la depleción de genes implicados tanto en la resección de tramo corto como en la de tramo largo (CtIP, BLM o EXO1) inclinó el equilibrio de los sistemas SSR hacia la reparación por NHEJ.





**Figura R4. Sensibilidad de los sistemas SSR al silenciamiento de genes de reparación por NHEJ y de genes implicados en la resección del ADN.** (A) Efecto de la depleción de varios genes implicados en la reparación por NHEJ y en el proceso de resección del ADN sobre el sistema SSR1.0. Sobre una línea de U2OS que portaba de manera estable el sistema SSR1.0 se transdujo con lentivirus que portaban diferentes shRNAs para los genes indicados. Se generaron diversas líneas estables y se sometieron a la inducción de daño mediante un corte de doble cadena en el sistema SSR1.0 mediante la meganucleasa I-SceI. Tras llevar a cabo la reparación, se cuantificó la variación en el balance entre reparación independiente o dependiente de homología mediante el cálculo del ratio entre células verdes y rojas. Para facilitar la comparación entre experimentos, este ratio se normalizó con un shRNA control. Aquellos shRNAs que inclinaban el equilibrio hacia un aumento en la reparación independiente de homología eran de valor mayor de 1 (verde), mientras que aquellos que aumentaban la HR el valor era menor de 1 (rojo). Los datos representan un mínimo de tres conjuntos de experimentos con duplicados. (B) Igual que en (A) pero sobre el sistema SSR2.0.

Por tanto, estos sistemas han sido eficaces a la hora de detectar defectos en estos genes sobre los mecanismos de reparación. MRE11 tiene un papel esencial en la resección de tramo corto pero además ha sido implicada en otros procesos, tales como el NHEJ, manteniendo unidos ambos extremos de la rotura, detectando la presencia de DSB y activando el checkpoint (Stracker & Petrini 2011). Por tanto, podría parecer difícil *a priori* predecir el resultado de la depleción de MRE11 en la elección entre los mecanismos de reparación de DBSs. Sin embargo con nuestros sistemas se ha podido observar como la depleción de MRE11 desvió el equilibrio hacia el NHEJ (Figura R4), demostrando que la función principal de MRE11 es favorecer la reparación

mediada por homología de secuencia. Dicho efecto es probablemente debido al papel que desempeña MRE11 en la resección.

Aunque no se observó diferencias cualitativas en ningún caso entre el sistema SSR1.0 y el SSR2.0, sí observamos claramente diferencias cuantitativas (Figura R4). Los resultados son más claros en el caso del sistema SSR2.0 probablemente porque sólo hay un ciclo de corte-reparación.

Como control adicional, deplecionamos una proteína relacionada con la reparación de los DSBs en el intercambio de cadena, RAD51, que no debía tener efecto en la elección de la ruta de reparación dado que RAD51 está implicada en pasos posteriores a la decisión entre reparación por HR o por NHEJ y lo más importante, RAD51 no participa en el mecanismo de reparación por SSA (Hartlerode & Scully 2009). Comprobamos que en concordancia con esto, la depleción de RAD51 no tuvo efecto en los sistemas SSR (Figura R4).

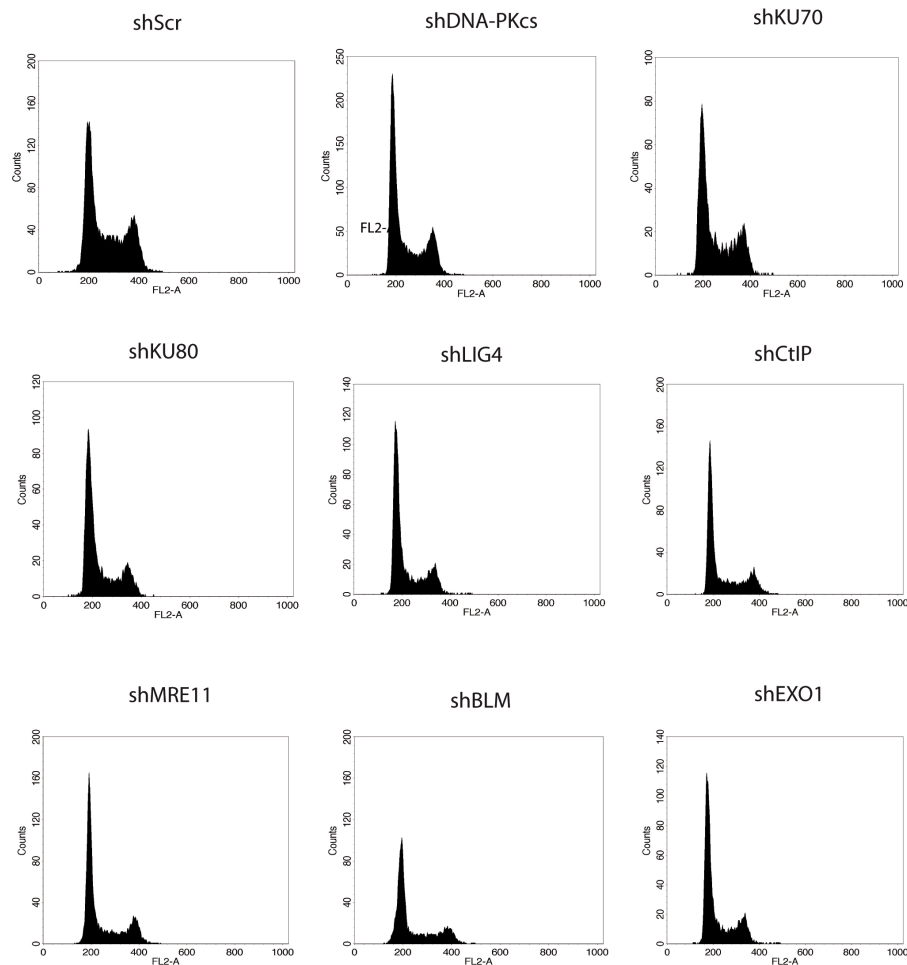
Se ha demostrado que el ciclo celular es el principal regulador en la elección entre reparación independiente o dependiente de homología. Mientras las células en G1 sólo pueden reparar mediante NHEJ, las células en S y G2 pueden activar la reparación por HR a través de la resección del ADN mediada por la ciclina dependiente de kinasa (CDK) (Huertas et al. 2008; Ira et al. 2004). Por tanto, analizamos los perfiles de ciclo celular de las células deplecionadas con los diferentes shRNAs empleados anteriormente. No se observaron diferencias en los perfiles del ciclo celular que pudieran explicar el fenotipo observado (Figura R5).

### **1.3. EFECTO DE LA DEPLECIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL DAÑO DEL ADN EN LOS SISTEMAS SSR.**

El contexto en el que se encuentra la célula determina el tipo de respuesta al daño en el ADN que se activa y la manera en la que se va a reparar dicho daño. Se requiere una coordinación entre el metabolismo celular y la reparación del ADN mediante una compleja cascada de transducción de señales, lo que es conocido como DDR (Ciccía & Elledge 2010; Jackson & Bartek 2009).

Con objeto de validar nuestro sistema decidimos comprobar el efecto de la depleción de varios factores implicados en la DDR que podían influir en

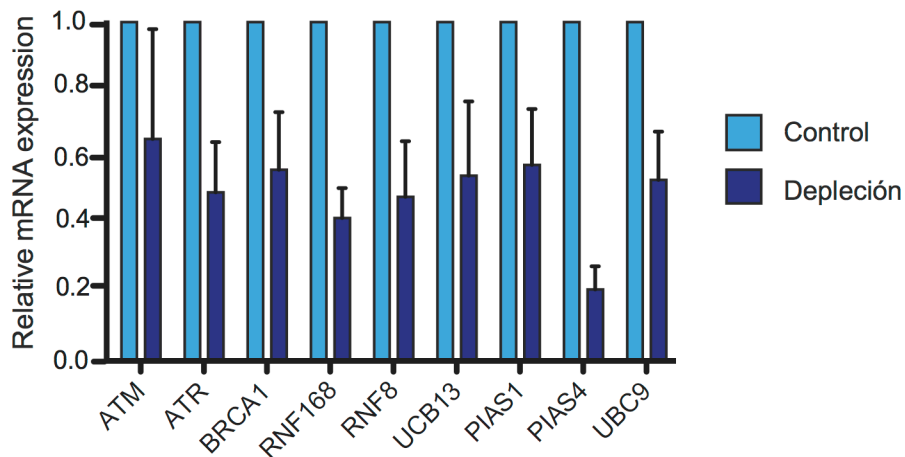
el equilibrio entre HR y NHEJ. En la Figura R6 se muestra la comprobación de las depleciones de dichos genes mediante RT-PCR.



**Figura R5. Distribución del ciclo celular en células U2OS deplecionadas mediante shRNAs para diversos genes.** En la figura se muestran los gráficos representativos del análisis por citometría de flujo de la depleción de los genes diana para la obtención del perfil del ciclo celular en cada caso.

La DDR se activa mediante una serie de fosforilaciones de proteínas iniciadas por dos kinasas, ATM y ATR (Ciccia & Elledge 2010; Jackson & Bartek 2009). El silenciamiento mediado por shRNAs de ATM y ATR resultó en un desequilibrio en los sistemas SSR hacia la reparación independiente de homología (Figura R7). Estos resultados están en consonancia con un papel de ATM y ATR a favor de la resección del ADN y de la recombinación homóloga.

La cascada de fosforilaciones que se da durante la DDR, conlleva el reclutamiento de una serie de proteínas en la proximidades del lugar donde ha



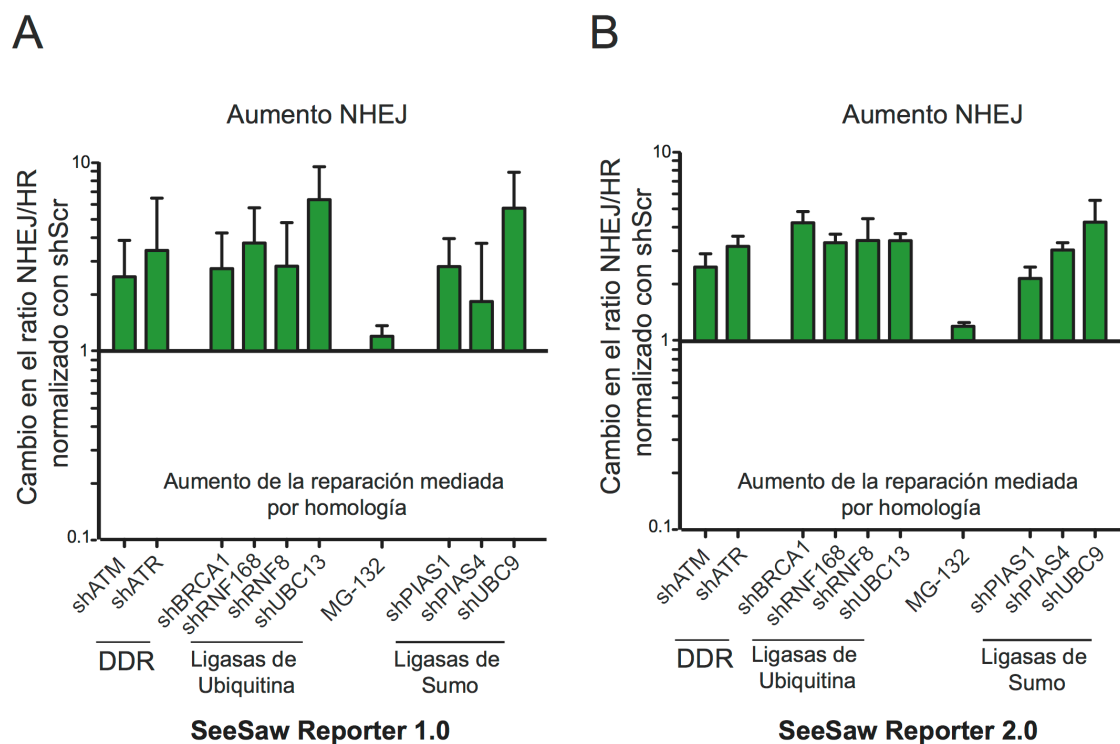
**Figura R6. Niveles de silenciamiento obtenidos por depleción con shRNAs de genes que afectan a la respuesta al daño en el ADN.** Se realizaron RT-PCR cuantitativas a partir de ARNm de células transfectadas de manera estable con los shRNAs indicados en la figura. El nivel de cDNA de cada gen se normalizó con el cDNA del gen de la actina. La expresión relativa se cuantificó mediante un shRNA control. Se representa la media y el error de un mínimo de tres experimentos independientes.

ocurrido el daño, entre ellas las ligasas E3 de ubiquitina, RNF8, RNF168 y BRCA1. La actividad de estas tres ligasas es fundamental para la DDR y la reparación del ADN. Observamos que la depleción de estas proteínas inclinó el equilibrio hacia la reparación mediante NHEJ (Figura R7).

El efecto obtenido fue similar para las tres ligasas de ubiquitina (RNF8, RNF168 y BRCA1) y fue más pronunciado en el caso de la ligasa E2 de ubiquitina UBC13. Además, este efecto fue específico, ya que al perjudicar de manera global el proceso de ubiquitinación mediante el inhibidor del proteosoma MG132, no se alteró de manera significativa el equilibrio entre NHEJ/HR (Figura R7).

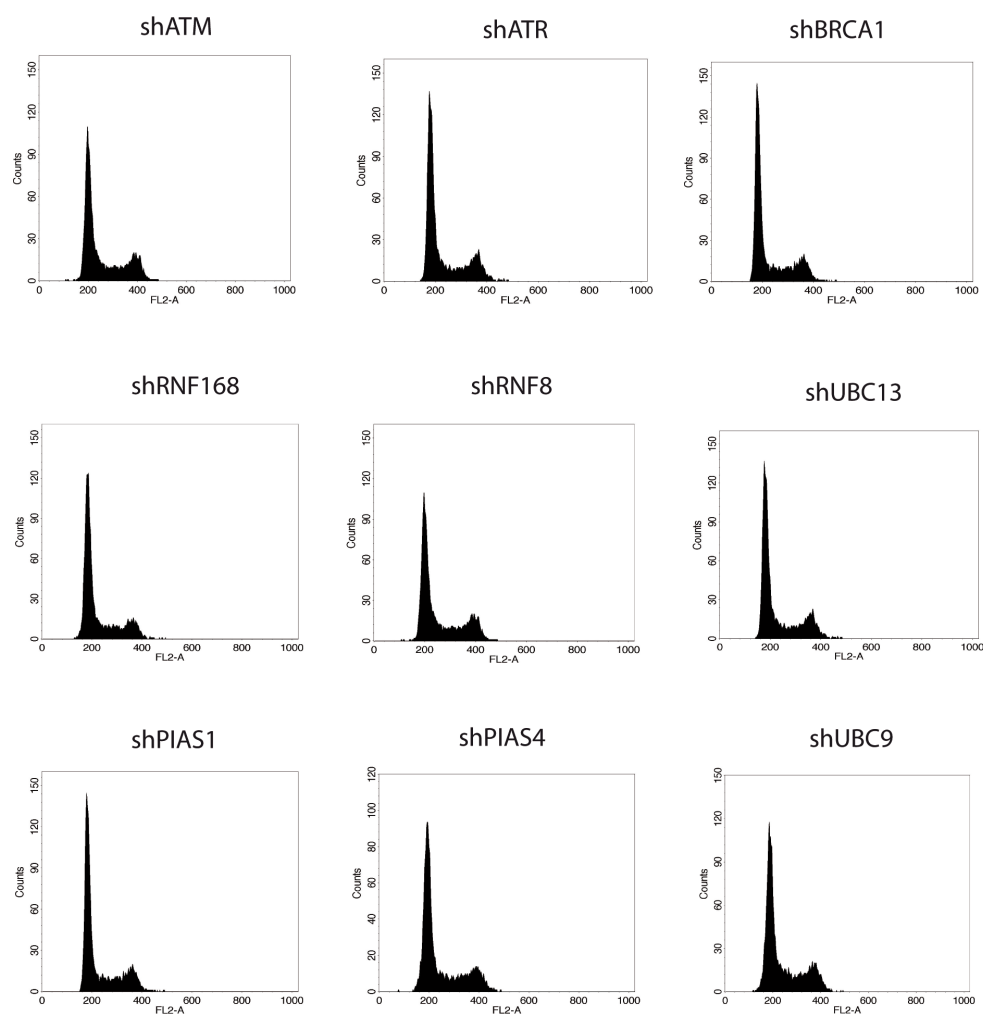
Se ha descrito que tienen lugar en los sitios de rotura procesos de sumoilación (Galanty et al. 2009). Quisimos comprobar el efecto que tendría la depleción de la ligasa E2 de sumo UBC9 y las ligasas E3 PIAS1 y PIAS4 en los sistemas SSR. Como se puede ver en la Figura R7 la depleción de estas ligasas alteró el equilibrio entre NHEJ/HR favoreciendo la reparación por NHEJ.

Por tanto, defectos en diversas modificaciones post-traduccionales dependientes del checkpoint como fosforilaciones, ubiquitinaciones y sumoilaciones alteran el balance entre NHEJ/HR, favoreciendo el NHEJ, y los sistemas SSR fueron capaces de detectarlo. De nuevo, para asegurarnos que los resultados obtenidos no se debían a la alteración del ciclo celular, se analizó el perfil del ciclo celular en cada una de las depleciones realizadas



**Figura R7. Sensibilidad de los sistemas SSR a defectos en la respuesta al daño en el ADN (DDR).** (A) Efecto de la depleción de varios genes implicados en DDR sobre el sistema SSR1.0. En una línea de U2OS que portaba de manera estable el sistema SSR1.0 se llevó a cabo la infección con diferentes shRNAs para los genes indicados en la figura. Se generaron diversas líneas estables y se sometieron a la inducción de daño mediante un corte de doble cadena mediante la meganucleasa I-SceI. Tras llevar a cabo la reparación, se cuantificó la variación en el balance entre reparación independiente o dependiente de homología mediante el cálculo del ratio entre células verdes y rojas. Para facilitar la comparación entre experimentos, este ratio se normalizó con un shRNA control. Aquellos shRNAs que inclinaban el equilibrio hacia un aumento en la reparación independiente de homología eran de valor mayor de 1, mientras que aquellos que aumentaban la HR el valor era menor de 1. Los datos representan un mínimo de tres conjuntos de experimentos. (B) Igual que en (A) pero sobre el sistema SSR2.0.

(Figura R8). En ninguno de los casos se observó alteración en el ciclo celular, por lo que concluimos que el desequilibrio observado hacia la reparación por NHEJ no se debió a defectos en el ciclo celular (Figura R8).



**Figura R8. Distribución del ciclo celular en células U2OS deplecionadas para diversos genes mediante shRNAs.** En la figura se muestran los gráficos representativos del análisis por citometría de flujo de la depleción de los genes diana para la obtención del perfil del ciclo celular en cada caso.

#### 1.4. DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO DE ESCRUTINIO MASIVO DE GENES QUE AFECTAN EL EQUILIBRIO NHEJ/HR USANDO UNA LIBRERÍA DE esiRNAS EN UN FORMATO DE PLACA DE CULTIVO DE 96 POCILLOS.

En esta tesis se optimizó un protocolo de escrutinio para buscar genes que estuvieran implicados en mantener el equilibrio entre los mecanismos de reparación por recombinación homóloga y los mecanismos de reparación por unión de extremos no homólogos. El escrutinio propiamente dicho no se incluye en esta tesis, sólo su optimización, ya que ha sido un proyecto general

en el que han participado varios miembros del laboratorio. Se adquirió una librería de 16.920 esiRNAs de genes humanos y organizados en 177 placas de 96 pocillos. Cada placa incluía un esiRNA contra el gen de la luciferasa como control negativo. Para el escrutinio se decidió usar la línea de U2OS que contenía el sistema SSR2.0 integrado (en adelante SSR). El objetivo era medir el ratio entre NHEJ/HR que se obtenía al transfectar con los diferentes esiRNAs. Se diseñó y desarrolló el protocolo a utilizar. Dicho protocolo necesitó una serie de ensayos de optimización:

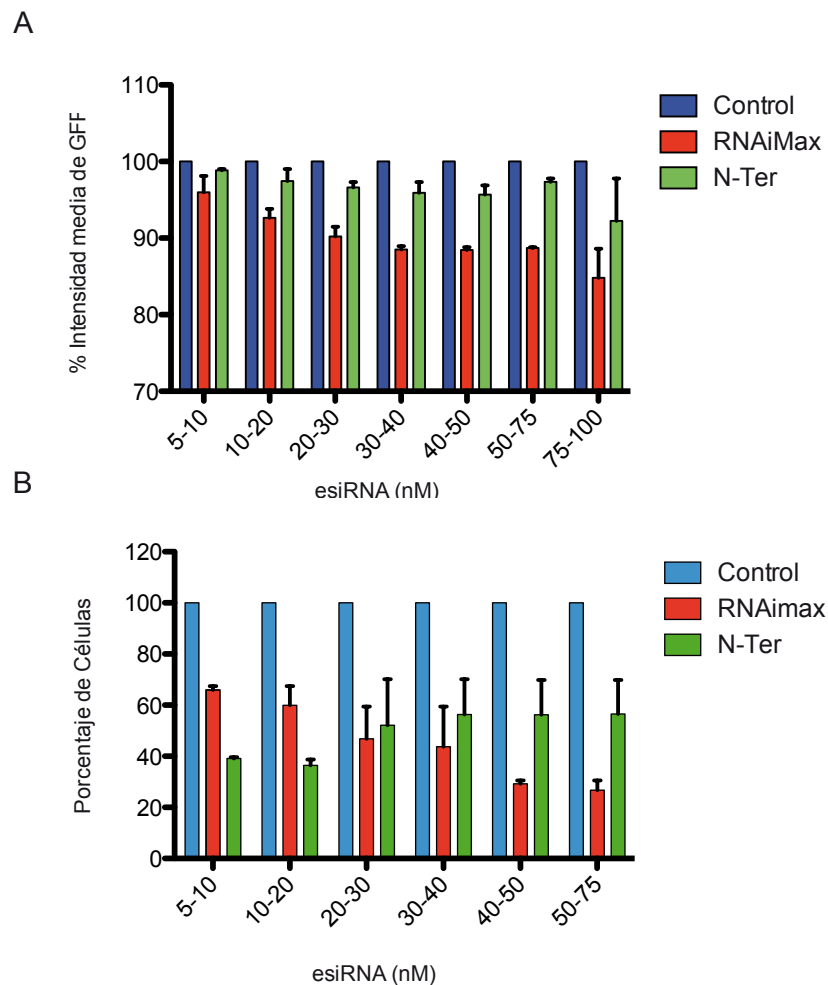
- i) Elección de las condiciones de transfección: concentración esiRNA, nivel de toxicidad durante la transfección y los tiempos de formación de los complejos (esiRNA + agente transfección)
- ii) Condiciones óptimas de infección viral
- iii) Proceso de fijación y tinción celular
- iv) Procesamiento de las imágenes, incluyendo la adquisición, el análisis y almacenamiento de dichas imágenes.

Para definir el número de células de partida se usó el dato inicial de 4000 células empleadas en ensayos de transfección directa realizados en placas de 96 pocillos previos a la optimización del escrutinio. Dado que en el escrutinio se iba a emplear un protocolo de transfección reversa, se incrementó el número de células de partida como recomiendan las especificaciones de la solución de transfección RNAiMax. Si bien las especificaciones recomendaban un incremento de 2,5 veces, solamente lo incrementamos 1,75 veces ya que la duración de nuestro protocolo era de cuatro días y no de 48-72 horas como en las transfecciones convencionales y así evitar que las células crecieran hasta la confluencia, parando el ciclo celular y afectando a los resultados. Finalmente, el número de células del que partimos para realizar la transfección reversa fue de 7000.

Para optimizar las condiciones de la transfección, quisimos comprobar la eficiencia de dos agentes de transfección distintos: lipofectamina RNAimax (Invitrogen) y N-Ter (Sigma) (Figura R9). Nos basamos en las especificaciones del reactivo de transfección (ver materiales y métodos apartado 1.2.1.). Para evaluar la concentración óptima de esiRNA en los ensayos de transfección reversa, se utilizó un esiRNA para el gen GFP a diferentes concentraciones (5-100 nM), en células con el sistema SSR y que por tanto expresaban de manera constitutiva la proteína GFP. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos

y la lectura ImageXpress Micro (ver materiales y métodos apartado 3.3.1.). El resto de parámetros de la transfección se conservaron tal y como los recomendaba la casa comercial. Se observó que el agente de transfección lipofectamina RNAimax funcionó mejor en casi todo el rango de concentraciones utilizadas (Figura R9A).

Por otra parte quisimos comprobar el nivel de toxicidad de cada reactivo al

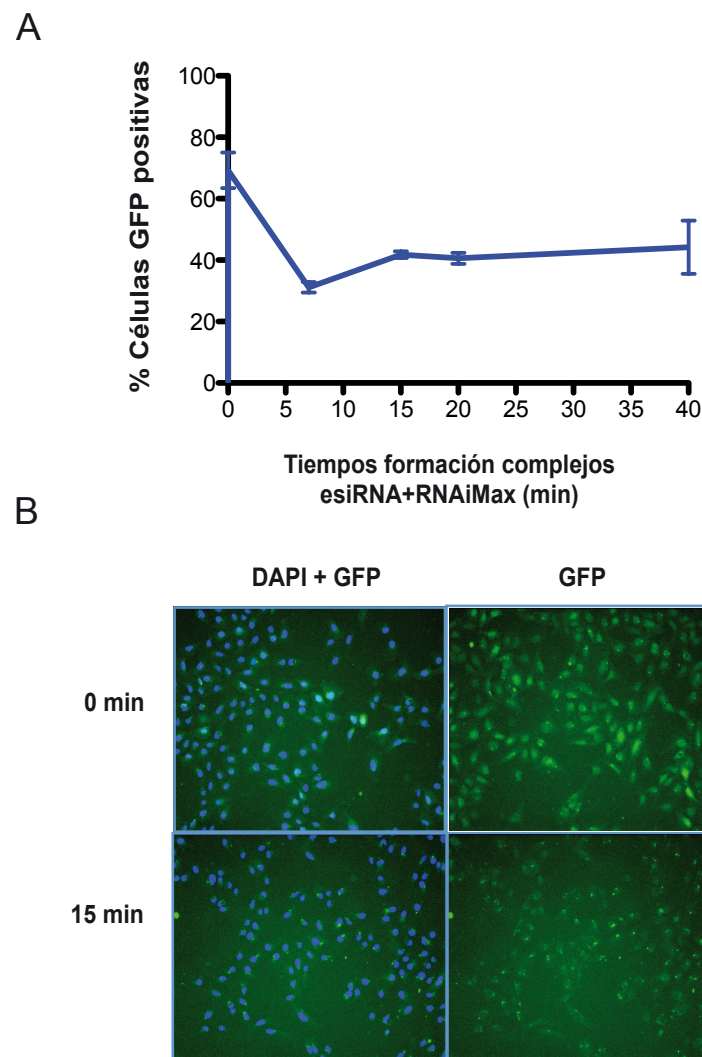


**Figura R9. Ensayos de transfección reversa para la optimización del protocolo y su aplicación en el escrutinio masivo de genes.** (A) Medida de la eficiencia de la transfección por depleción mediante un esiRNA específico para la proteína GFP. Células con el sistema SSR fueron transfectadas con un esiRNA para el gen de la GFP a diferentes concentraciones entre 5 y 100 nM. Se utilizaron dos agentes de transfección diferentes, lipofectamina RNAimax (Invitrogen) y N-Ter (Sigma) en las condiciones estándar descritas en las especificaciones técnicas de cada producto. A las 24 horas de la transfección, se cuantificó la intensidad media de la GFP en las células transfectadas y se calculó el porcentaje con respecto al valor medio de la intensidad de la GFP en las células control. (B) Cuantificación de la supervivencia celular. Células con el sistema SSR fueron transfectadas en las mismas condiciones que en (A) y a las 24 horas de la transfección se cuantificó el número medio de células y calculó el porcentaje de células con respecto a un control sin transfectar.



transfectar en las condiciones anteriormente descritas y para ello, cuantificamos el número medio de células por pocillo que sobrevivían a las 48 horas de la transfección. Comprobamos que, en general, hasta los 30 nM la supervivencia era similar en ambos casos (Figura R9B). A concentraciones más altas, la lipofectamina RNAimax provocaba una toxicidad mayor que el N-Ter (Figura R9A). Con estos datos decidimos utilizar el reactivo lipofectamina RNAimax y la concentración de 30 nM para transfectar los esiRNAs. El procesamiento de las placas de 96 pocillos se automatizó utilizando un robot MicroLab Star de Hamilton, con una capacidad de procesamiento continuo de hasta 5 placas. Dado que el procesamiento de las placas no es simultáneo, el tiempo de incubación para la formación de los complejos esiRNA + agente de transfección iba a ser distinto entre la placa 1 y la 5, por tanto, decidimos comprobar si dicho parámetro podría introducir diferencias en la eficiencia de la transfección entre placas. Entre la placa 1 y la 5 transcurrían 7 minutos. Realizamos un ensayo para evaluar la eficiencia de la transfección con complejos (esiRNA + agente de transfección) formados con distintos tiempos de incubación. Como se puede observar en la Figura R10A a partir de los 15 minutos de incubación la eficiencia de la transfección no se modificaba significativamente. Por tanto calculamos los tiempos de incubación de cada placa para que fueran de un mínimo de 15 minutos el tiempo de formación de los complejos y posterior dispensación de las células. En la Figura R10B se muestra una imagen del silenciamiento de la proteína GFP mediante complejos esiRNA-GFP y lipofectamina formados durante un tiempo de incubación de 15 minutos.

Dentro del protocolo de transfección reversa, el último paso es la dispensación de las células después de formarse los complejos esiRNA+lipofectamina. Quisimos optimizar dicha dispensación mediante el robot Hamilton para lo cual, las células se procesaban en las salas de cultivo, se preparaba una suspensión celular con 1000 células/ml y eran vertidas a un contenedor para su dispensación mediante el brazo articulado del robot. En los ensayos realizados con el robot no se pudo obtener una dispensación homogénea entre los diferentes pocillos de una misma placa y tampoco entre las cinco placas que se procesaban de manera consecutiva. Lo que se obtenía

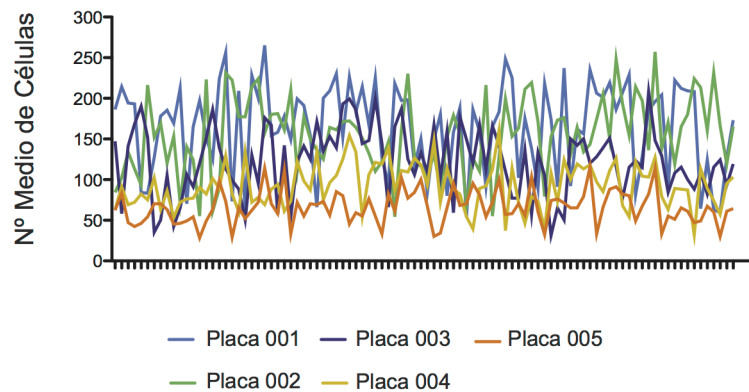


**Figura R10. Selección del tiempo de formación de los complejos (lipofectamina RNAiMax+esiRNA).** (A) Eficiencia de la transfección según el tiempo de incubación para la formación de los complejos (lipofectamina RNAiMax+esiRNA). Células de U2OS-SSR1.0 fueron transfectadas con complejos de lipofectamina RNAiMax+esiRNA formados durante diferentes tiempos de incubación (0-40 minutos). 24 horas después de realizarse la transfección se cuantificó el porcentaje de células GFP positivas. (B) Imágenes representativas de la depleción obtenida en la proteína GFP al llevar a cabo una incubación para la formación de los complejos de 0 y 15 minutos.

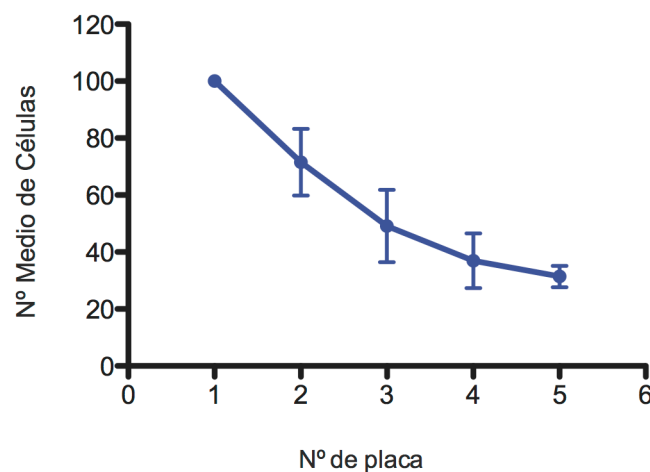
era una dispensación heterogénea (Figura R11A). Como se puede observar, el número medio de células cuantificadas mediante el microscopio ImageXpress en 9 zonas (*sites*) dentro del pocillo podía variar entre 25 y 250 células, teniendo en cuenta que estos valores corresponden a la cuantificación en el área de una única zona y no a la totalidad de la superficie del pocillo. Esta variación no era asumible ya que en unos pocillos el cultivo podía confluir antes que en otros. También se observó que el número medio de células que

se dispensaba iba decayendo al ir procesando las placas de la 1 a la 5. Por tanto, el número medio de células no sólo oscilaba entre los pocillos de una misma placa sino también entre las placas procesadas en grupo desde la 1 hasta 5 (Figura R11A).

A



B



**Figura R11. Ensayos de dispensación celular automatizados mediante el empleo del robot MicroLab Star de Hamilton. (A)** Perfil de dispensación celular en el procesamiento de cinco placas de 96 pocillos. Un cultivo celular en suspensión con 1000 células/ $\mu$ l fue dispensado de manera consecutiva en cinco placas de 96 pocillos. En la gráfica se representa el número medio de células dispensadas a lo largo de cada uno de los 96 pocillos de las cinco placas procesadas de manera consecutiva (placas 1-5). **(B)** Representación del número medio de células dispensadas por pocillo y por placa. Se realizaron tres réplicas experimentales de la dispensación celular de cinco placas de 96 pocillos de manera consecutiva (de la 1 a la 5).

Se realizaron numerosas pruebas de dispensación celular automática, aumentando la agitación del reservorio que contenía las células, cambiando el

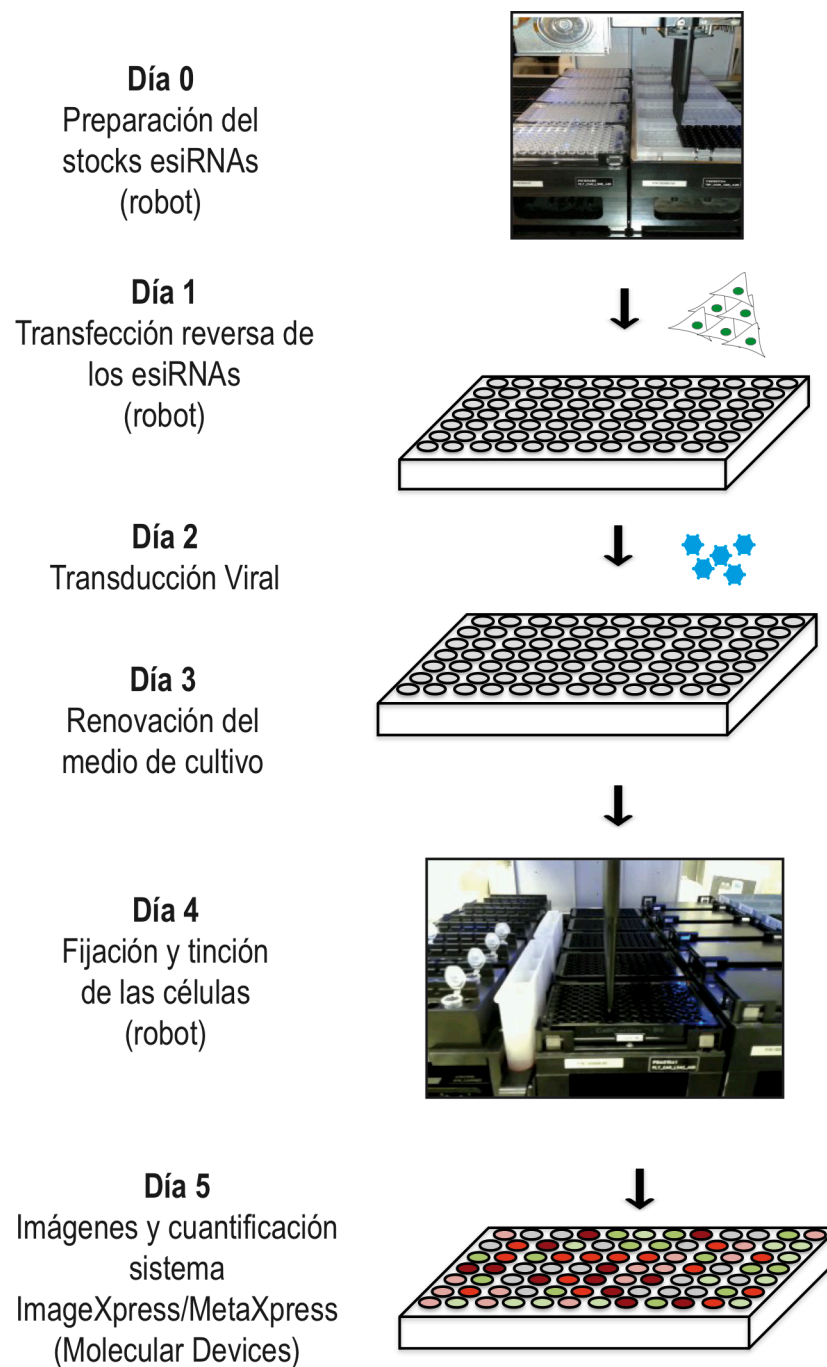
modo de aspiración, aumentando la agitación mediante el brazo del robot, etc... Sin embargo, no se pudo conseguir la dispensación homogénea necesaria para que el número de células inicial fuera similar en cada placa (Figura R11B). Lo que siempre se obtuvo fue una caída en el número medio de células dispensadas conforme se procesaban desde la placa 1 hasta 5 probablemente por la sedimentación de las células durante el proceso. Para el desarrollo del escrutinio, por tanto, decidimos llevar a cabo el paso de dispensación forma manual.

### **1.5. ESTABLECIMIENTO DEL FLUJO DE TRABAJO DURANTE EL ESCRUTINIO (*WORKFLOW*).**

Para la realización del escrutinio de genes mediante la librería de esiRNAs se diseñaron protocolos para la realización de varios trabajos de forma automatizada con el robot Microlab Star de Hamilton. Otros trabajos se realizaron en las salas de cultivos y, el procedimientos para la adquisición y análisis de las imágenes se obtuvo mediante el escaneo de las placas en un microscopio de alto rendimiento ImageXpress Micro (ver materiales y métodos apartado 3.3.1).

El protocolo completo tiene una duración de cinco días (Día 1-5) (Figura R12), además de un paso previo, Día 0 (Preparación del stock de esiRNAs) para la preparación de las diluciones de esiRNAs con las que se va a trabajar a partir de las placas de la librería original (Sigma). El Día 1 se realiza la transfección reversa (Figura R12) y tanto la preparación de las diluciones de esiRNAs como la transfección se realizan con un sistema automatizado mediante el empleo del robot, mientras que la dispensación de células, como se ha mencionado antes, se hace de manera manual. En el apartado 4 de los materiales y métodos se describe de manera más detallada cómo se desarrollan ambos procedimientos.

El Día 2 se realiza el protocolo de transducción con lentivirus que portan un plásmido que expresa la proteína fluorescente azul (BFP) y la meganucleasa-Scel. Este protocolo se describe en los materiales y métodos apartado 1.3.2. Para los ensayos del escrutinio se realizaron transducciones con una MOI=10 para asegurarse que prácticamente la totalidad de las células



**Figura R12. Representación esquemática del flujo de trabajo establecido para el escrutinio de una librería de esiRNAs.** El protocolo completo para el procesamiento de 5 placas de 96 pocillos incluye los procedimientos indicados en el esquema. Se representa cada uno de los protocolos por día de experimento. Día 0 "Preparación de stock esiRNAs"; Día 1 "Transfección reversa de los esiRNAs"; Día 2 "Transducción Viral"; Día 3 "Renovación del medio de cultivo"; Día 4 "Fijación y tinción de las células"; Día 5 "Captación de imágenes y cuantificación con el sistema ImageXpress/MetaXpress (Molecular Devices)"

eran transducidas y por tanto portaban la construcción BFP-I-Scel. A las 24 horas (Día 3) se renueva el medio de cultivo para retirar los lentivirus.

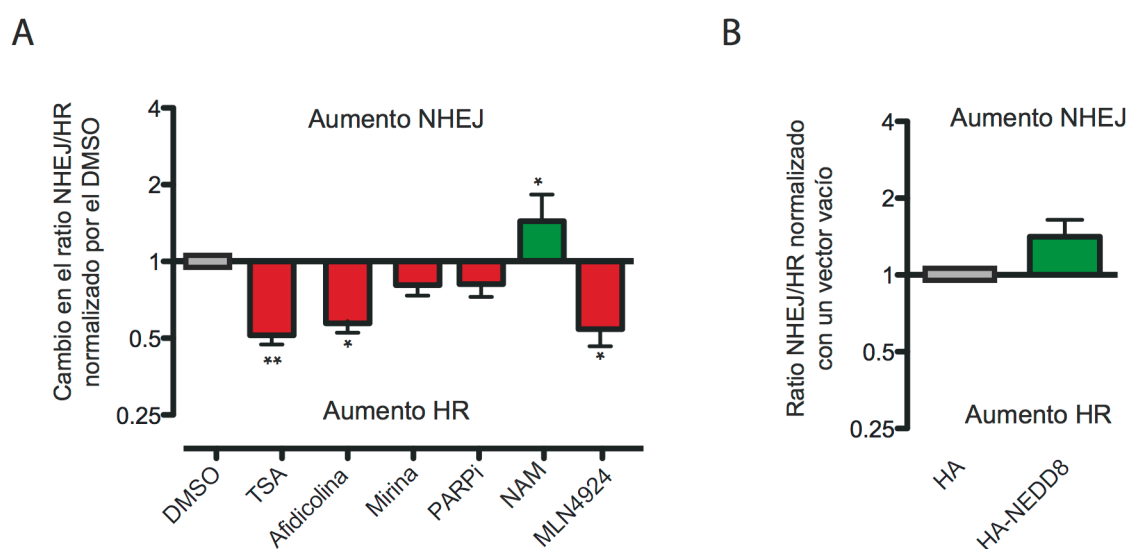
El Día 4 se fijan las células con paraformaldehído al 4% y se tiñen sus núcleos con Hoechst 33258 para su posterior adquisición al microscopio y así mejorar la reproducibilidad entre ensayos (Figura R12). Las cuantificaciones se realizaron mediante el software MetaXpress (más detalles en los materiales y métodos apartado 4.4).

## 2. PAPEL DE LA NEDILACIÓN EN LA REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ENTRE NHEJ Y HR.

### 2.1. EFECTO DE UN CONJUNTO DE INHIBIDORES UTILIZADOS EN ENSAYOS CLÍNICOS Y RELACIONADOS CON LA DDR SOBRE EL BALANCE ENTRE REPARACIÓN POR NHEJ Y HR.

Para investigar los mecanismos que pueden estar implicados en la elección de la ruta para reparar el daño, analizamos el efecto de un conjunto de pequeñas moléculas inhibitoras de diferentes procesos celulares, que están actualmente en fase de ensayos clínicos contra el cáncer y y que están relacionadas con la DDR, con el sistema SSR (Tabla M3).

Como se puede ver en la Figura R13A, tres de los inhibidores inclinaron el equilibrio hacia la reparación por HR: TSA (inhibidor de las histonas



**Figura R13. Efecto de pequeños inhibidores que alteran el ratio NHEJ/HR. (A)** Análisis del efecto sobre el equilibrio entre NHEJ y HR de varias moléculas inhibitoras medido mediante el sistema SSR. Se cuantificó el número de células verdes y rojas obtenidas en cada condición. Se calculó el ratio y se normalizó con respecto al control (DMSO). Aquellas condiciones que inclinaban el balance hacia un aumento en NHEJ resultaban con un valor mayor de 1 (verde). Por el contrario, una disminución de este ratio (valores menores a 1) representaban un desequilibrio del sistema hacia la HR (rojo). Los datos representan un mínimo de tres grupos de experimentos por duplicado. El asterisco representa una significancia estadística de una  $P < 0,05$  como se describe en materiales y métodos. **(B)** Efecto de la sobreexpresión de NEDD8 en el balance NHEJ/HR. Células de U2OS con el sistema SSR fueron transfectadas con HA-NEDD8 o con HA como control. Otros detalles como en **(A)**.

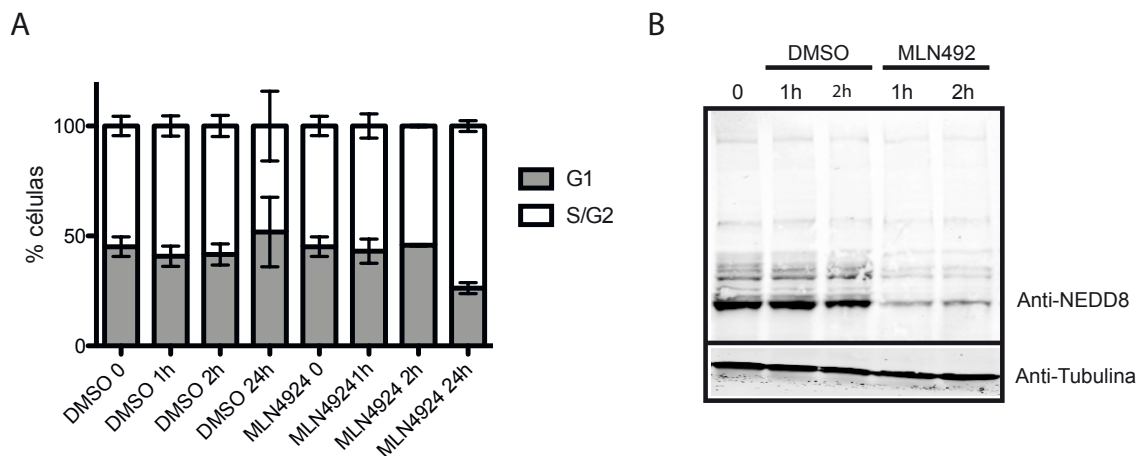
deacetilasas de clase I y II), afidicolina (inhibidor de la replicación del ADN) y el inhibidor de la nedilación MLN4924. Ni el inhibidor de MRE11 (Mirina) ni un inhibidor de PARP (Olaparib) dieron lugar a un efecto significativo en el sistema SSR. El compuesto NAM (Nicotinamida), que inhibe PARP-1 e incrementa los niveles de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> disponible en la célula, incrementó el ratio hacia la reparación por NHEJ.

El desequilibrio observado hacia la reparación por HR por el inhibidor de la nedilación fue opuesto al observado por la falta de sumoilación y ubiquitinación (ver capítulo anterior, Figura R7). La nedilación, la sumoilación y la ubiquitinación han sido descritas como procesos que ocurren en los sitios de rotura del ADN y, en principio, con funciones similares (Jackson & Durocher 2013; Ma et al. 2013; Li et al. 2014; Yang et al. 2012), por lo que este resultado fue sorprendente. Dado que habíamos obtenido un incremento en la recombinación homóloga por inhibición de la nedilación, quisimos comprobar el efecto que obtendríamos en el sistema SSR al sobreexpresar NEDD8. En principio esperaríamos obtener el resultado contrario, es decir, debíamos obtener un incremento en el NHEJ (un ratio mayor de 1). Para esto llevamos a cabo la sobreexpresión de la proteína NEDD8 unida a un antígeno de HA y como control el plásmido con HA (Tabla I5) mediante transfección en células U2OS-SSR2.0 (materiales y métodos apartado 1.2.2.1.). Como esperábamos, la sobreexpresión de HA-NEDD8 dio como resultado un ligero aumento del ratio NHEJ/HR o lo que es lo mismo una disminución en la HR (Figura 13B).

Considerando que el ciclo celular es el principal punto de control para la reparación de los DSB, quisimos descartar que el efecto observado al tratar las células con MLN4924 fuera debido a cambios en el perfil del ciclo celular (Figura R14A). Para ello, las células fueron tratadas con MLN4924 a una concentración de 0,2  $\mu$ M durante 1, 2 y 24 horas. Sólo en el tratamiento largo (24h) se observó un cambio en la distribución del ciclo celular. Por tanto, restringimos los tratamientos con el inhibidor MLN4924 en nuestros experimentos a tiempos cortos para evitar los efectos mediados por el ciclo celular.

Para asegurarnos que el tratamiento con MLN4924 estaba modificando el patrón de nedilación global, realizamos tratamientos a diferentes tiempos, 0, 1 y 2 horas con el inhibidor y, mediante detección por western blot de la





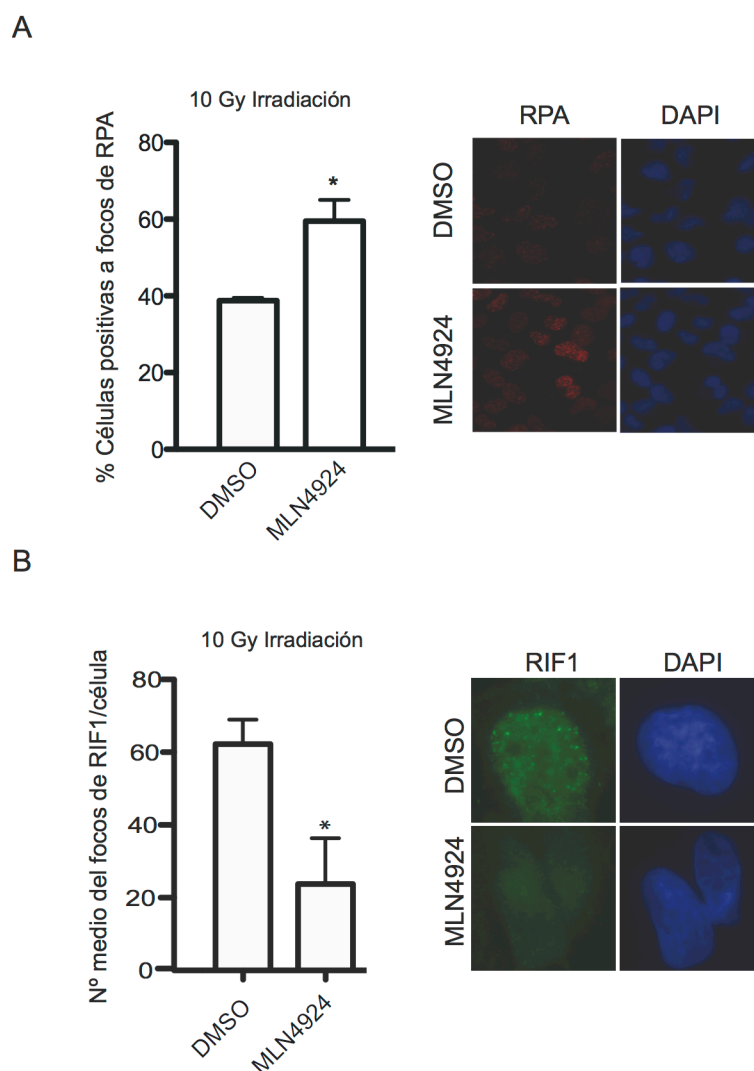
**Figura R14. Comprobación del tratamiento con MLN4924 mediante el análisis del ciclo celular y del patrón de nedilación global de las proteínas.** (A) Análisis del ciclo celular. Las células fueron cultivadas y tratadas con 0,2  $\mu$ M de MLN4924 o con DMSO (control) durante 1, 2 ó 24 horas. Después fueron recogidas y procesadas para el análisis del ciclo celular mediante FACS como se describe en los materiales y métodos. Al menos 10.000 células fueron cuantificadas en cada condición experimental. Las barras representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Detección mediante western de proteínas nediladas. Células de U2OS fueron tratadas con DMSO como control o MLN4924 a 0,2  $\mu$ M durante 1 o 2 horas. Se realizaron los extractos de proteínas y mediante el anticuerpo específico anti-NEDD8 y se inmunodetectaron las proteínas nediladas. Como control de carga se inmunodetectó la proteína alfa-tubulina.

proteína NEDD8, pudimos observar que el nivel de nedilación global de las proteínas

disminuía significativamente en ambos tiempos (Figura R14B). Es decir, 1 o 2 horas de tratamiento con el inhibidor de la nedilación MLN4924 eran suficientes para alterar el patrón de nedilación sin afectar el ciclo celular.

## 2.2. LA NEDILACIÓN INHIBE LA RESECCIÓN DEL ADN Y POR TANTO LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

El principal punto de control entre NHEJ y HR es la resección del ADN (Huertas 2010), por tanto, decidimos comprobar si la nedilación de las proteínas tenía un impacto en dicho proceso. La eficiencia de la resección puede ser medida como el porcentaje de células positivas para focos de la proteína RPA tras inducir daño en el ADN. Para ello, células de la línea U2OS se preincubaron durante 1 hora con el inhibidor de la nedilación MLN4924 o DMSO como control, fueron irradiadas y se analizó la formación de focos de RPA mediante inmunofluorescencia (Figura R15).



**Figura R15. Efecto del inhibidor de la nedilación MLN4924 sobre la resección del ADN. (A)** Eficiencia de la resección medida como porcentaje de células positivas para focos de RPA. Células U2OS fueron pretratadas con DMSO o con el inhibidor de la nedilación MLN4924 a una concentración de 0,2  $\mu$ M durante 1 hora, irradiadas a 10 Gy y tras una hora de recuperación, sometidas a inmunofluorescencia para la detección de focos de la proteína RPA. A la derecha se puede observar un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas. La fluorescencia de los focos de RPA aparece en rojo y la tinción de núcleos con DAPI en azul. La gráfica representa la media y la desviación estándar del porcentaje de células positivas para focos de la proteína RPA de tres experimentos independientes. El asterisco representa una significancia estadística de una  $P < 0,05$  como se describe en materiales y métodos. **(B)** Inmunodetección de focos de RIF1. Al igual que en **(A)**, las células fueron tratadas con DMSO o MLN4924 e irradiadas. La gráfica representa la media y la desviación estándar del número medio de focos de RIF1 por célula de tres experimentos independientes. El asterisco representa una significancia estadística de una  $P < 0,05$  como se describe en materiales y métodos. Una imagen representativa de los focos de RIF1 en verde y de los núcleos con DAPI en azul se muestra a la derecha.

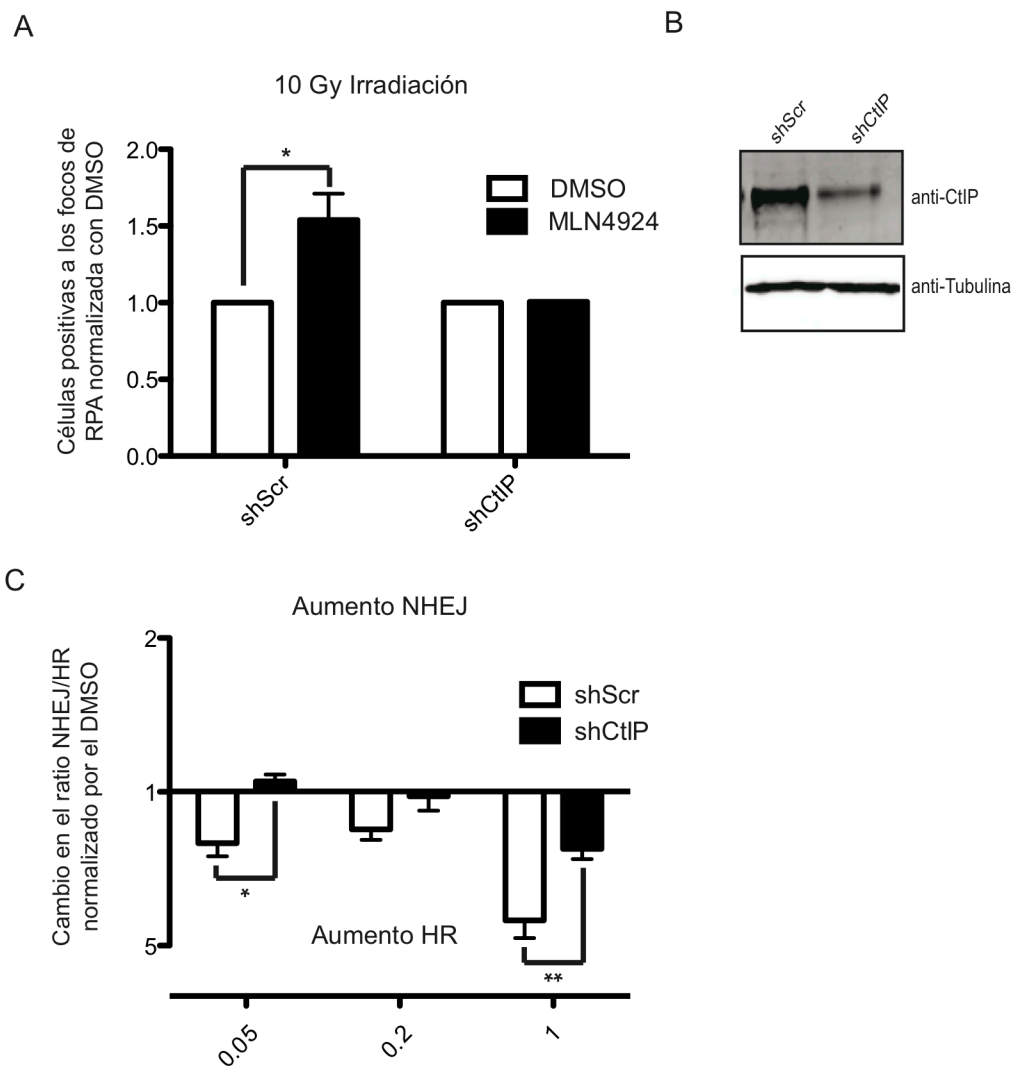
Se pudo observar que el tratamiento con MLN4924 incrementó de manera significativa el porcentaje de células con focos de RPA. También

quisimos conocer si se obtenía una disminución en proteínas que promueven el NHEJ y bloquean la resección mediante el análisis de la proteína RIF1 (Chapman et al. 2013; Escribano-Díaz et al. 2013). Se cuantificó el número medio de focos de RIF1 que aparecían tras inducir el daño por irradiación en las células con o sin MLN4924 (Figura R15B). Como se puede observar en la figura el número medio de focos de RIF1 disminuyó significativamente al tratar con MLN4924.

### 2.3. LA NEDILACIÓN ES UN PROCESO QUE ESTÁ IMPLICADA EN LA RESECCIÓN MEDIADA POR CtIP.

En los apartados anteriores hemos comprobado que la nedilación tiene una implicación en la recombinación y la resección y la proteína CtIP es fundamental en ambos procesos (Sartori et al. 2007; Escribano-Díaz et al. 2013). Quisimos comprobar el efecto que podía tener la depleción de CtIP en combinación con la inhibición de la nedilación sobre la resección. Para ello analizamos los focos de RPA generados tras irradiar células U2OS que habían sido infectadas con partículas lentivirales portadoras de shRNAs para CtIP y para un shRNA control (shScr). Como se puede observar en la Figura R16A, la hiper-resección obtenida por el tratamiento con MLN4924 se vio disminuida por la depleción de CtIP. En cada réplica experimental se comprobó la depleción de CtIP mediante western-blot. En la Figura R16B se muestra un ejemplo de la depleción obtenida mediante shRNA para la proteína CtIP.

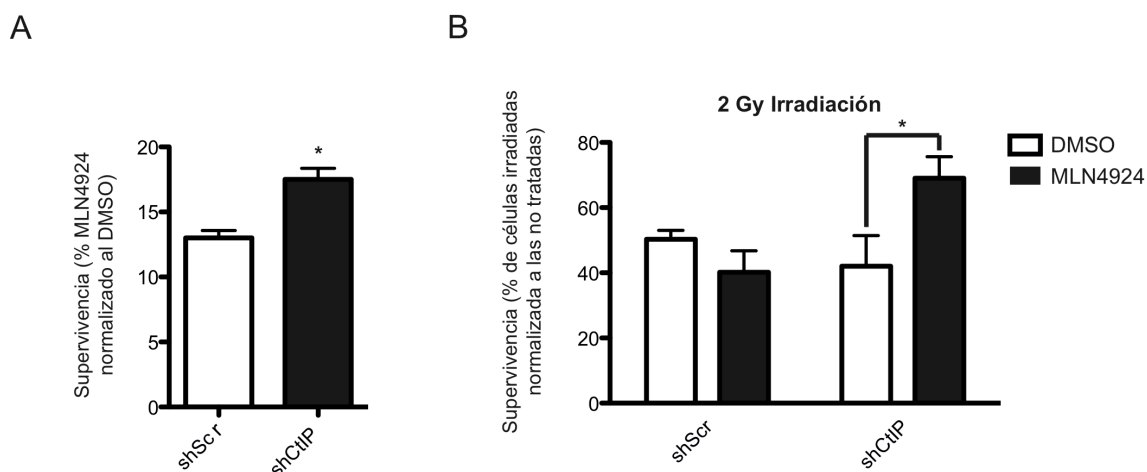
La observación de que la nedilación de proteínas regula negativamente la resección del ADN podría explicar por qué el tratamiento con MLN4924 inclina el equilibrio NHEJ/HR hacia HR. Para probar que el posible desequilibrio entre ambos mecanismos de reparación era causado por una resección excesiva mediada por CtIP, medimos el balance entre ambas rutas de reparación usando el sistema SSR en células que habían sido tratadas con DMSO o bien con MLN4924 con o sin la depleción de CtIP (Figura R16C). Como se puede ver en el gráfico, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor (0.05, 0.2 y 1  $\mu$ M) y se calculó el ratio entre NHEJ/HR normalizado con el DMSO de los controles. Se pudo observar en todos los casos una supresión del fenotipo hiper-recombinogénico debido al tratamiento con el MLN4924 al deplecionar CtIP.



**Figura R16. La nedilación de proteínas inhibe la resección y la recombinación homóloga del ADN mediadas por CtIP.** (A) Eficiencia en la resección como porcentaje de células positivas para focos de RPA. Células U2OS que expresan un shRNA control (shScr) o un shRNA contra CtIP fueron pretratadas con 0,2  $\mu$ M de MLN4924 o con DMSO durante 1 hora, irradiadas (10 Gy) e incubadas durante una hora adicional en presencia del inhibidor. Otros detalles como en la Figura R15. (B) Niveles de CtIP analizados mediante western blot tras su depleción mediante shRNA. (C) Efecto sobre el sistema SSR de la depleción de CtIP y del tratamiento con MLN4924 a diferentes concentraciones. Células con el sistema SSR integrado fueron infectadas con un shRNA control (Scr) y con un shRNA para CtIP (shCtIP) y tratadas con diferentes dosis de MLN4924 (0.05, 0.2 y 1  $\mu$ M). Se calculó el ratio entre HR y NHEJ y se normalizó con respecto al control (DMSO). Otros detalles experimentales son los mismos que en (A). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. La significación estadística se calculó con un análisis doble de la varianza (Two-ways ANOVA).

## 2.4. EL INHIBIDOR DE LA NEDILACIÓN MLN4924 CAUSA UNA HIPER-RESECCIÓN MEDIADA POR CtIP QUE AFECTA A LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS.

El MLN4924 está actualmente en fase de ensayos clínicos por su capacidad para matar células tumorales. Para estudiar si parte de esa letalidad se podría deber a la hiper-resección observada por la inhibición de la nedilación, analizamos la viabilidad de las células tratadas con MLN4924 en combinación con la depleción de CtIP. Pudimos comprobar que la viabilidad de las células tratadas con MLN4924 aumentaba ligera pero significativamente en las células con CtIP deplecionado (Figura R17A). Podemos concluir que la



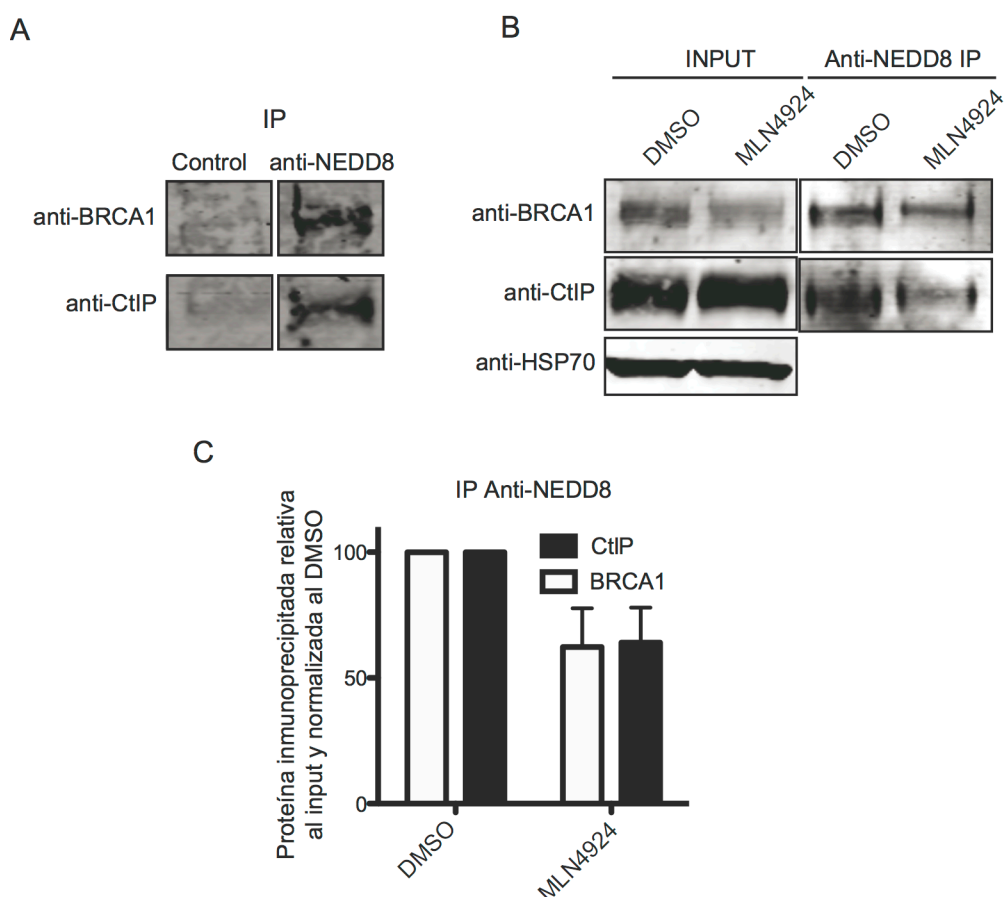
**Figura R17. La depleción de CtIP aumenta la supervivencia de células tratadas con el inhibidor de la nedilación MLN4924.** (A) Efecto de la depleción de CtIP sobre la supervivencia de células tratadas con MLN4924. Células transfectadas con un shRNA contra CtIP o control fueron tratadas durante 12 días con MLN4924 a 0,1  $\mu$ M o con DMSO. El número de colonias formadas en presencia de MLN4924 se normalizó con respecto al DMSO. Las barras representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Supervivencia celular tras la irradiación de células tratadas con MLN4924 con o sin CtIP deplecionado. Células con los shRNAs indicados fueron irradiadas con 2 Gy, con 1h de pre-incubación con 0,2  $\mu$ M de MLN4924 o DMSO, respectivamente.

toxicidad provocada por la inhibición de la nedilación es, al menos parcialmente, debida a una hiper-resección mediada por CtIP. Para apoyar estos resultados analizamos la sensibilidad de estas células a la radiación cuando eran tratadas con MLN4924 y de qué manera cambiaba su capacidad de supervivencia en los casos en los que a su vez se deplecionó CtIP. Como se puede observar en la Figura R17B las células con CtIP deplecionado eran

menos sensibles al daño después de un tratamiento corto con MLN4924. Es decir, la supervivencia de las células tratadas con MLN4924 era mayor cuando éstas tenían a su vez deplecionada la proteína CtIP. Por tanto, nuestros datos sugieren que un empeoramiento de la resección por una reducción en los niveles de CtIP es parcialmente corregido por un fenotipo de hiper-resección debido a una inhibición de la nedilación.

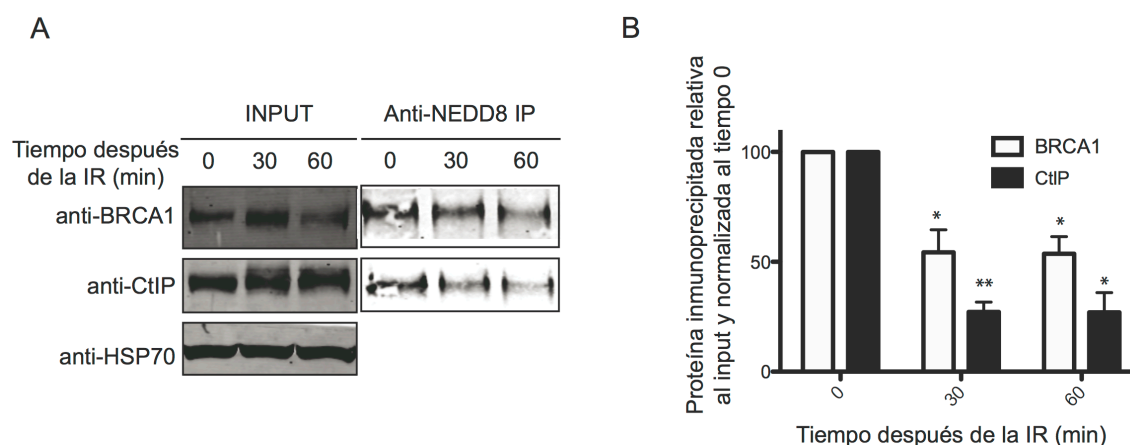
## 2.5. LA INTERACCIÓN ENTRE CtIP Y BRCA1 ESTÁ CONTROLADA POR NEDILACIÓN.

Para entender el mecanismo molecular que controla la inhibición de la resección del ADN mediante la nedilación de proteínas, inmunoprecipitamos las proteínas nediladas utilizando un anticuerpo anti-NEDD8 (Tabla M7) y realizamos un western-blot para detectar CtIP y BRCA1 que son claves en la resección del ADN (Cruz-García et al. 2014; Chapman et al. 2013; Escribano-Díaz et al. 2013). Observamos que tanto CtIP como BRCA1 fueron co-inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-NEDD8 (Figura R18A). Empleamos una IgG control para validar la especificidad de la inmunoprecipitación (IP). También comprobamos que al hibridar estas membranas con el anticuerpo de NEDD8 detectábamos señal debido a nedilación, pero dicho anticuerpo no reconoció ni a CtIP ni a BRCA1. Concluimos que ni CtIP ni BRCA1 eran nedilados o que su nivel de nedilación era tan bajo que no la pudimos detectar, pero que podían interactuar con proteínas nediladas. Para asegurarnos que la interacción que estábamos observando se debía realmente a proteínas nediladas, repetimos la IP realizando un tratamiento con el inhibidor de la nedilación MLN4924 y observamos mediante western blot una reducción del 38% en la aparición tanto de CtIP como de BRCA1 (Figura R18B). Llevamos a cabo varias repeticiones experimentales y pudimos obtener una cuantificación del porcentaje de proteínas inmunoprecipitadas tanto de CtIP como de BRCA1 (Figura R18C). Por tanto, concluimos que CtIP y BRCA1 de manera independiente o bien formando un complejo, interactúan con proteínas nediladas. Considerando que la nedilación de proteínas es un importante inhibidor de la resección del ADN, decidimos analizar la interacción de CtIP y BRCA1 con proteínas nediladas después de inducir daño en el ADN.



**Figura R18. CtIP y BRCA1 interaccionan con proteínas nediladas.** (A) Inmunoprecipitación de CtIP y BRCA1 mediante anticuerpo anti-NEDD8. Extractos de proteínas fueron divididos en dos e inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-NEDD8 o bien con IgG control. Se realizó la detección de CtIP y BRCA1 mediante western blot. (B) Inmunoprecipitación de CtIP y BRCA1 con anti-NEDD8 en extractos tratados con MLN4924. Extractos de proteínas de células pretratadas con MLN4924 o DMSO fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-NEDD8. Se muestra en la figura un western blot representativo. (C) Cuantificación de la cantidad de proteína inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-NEDD8, del apartado B, relativa al input y normalizada al DMSO, tomado como el 100%. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

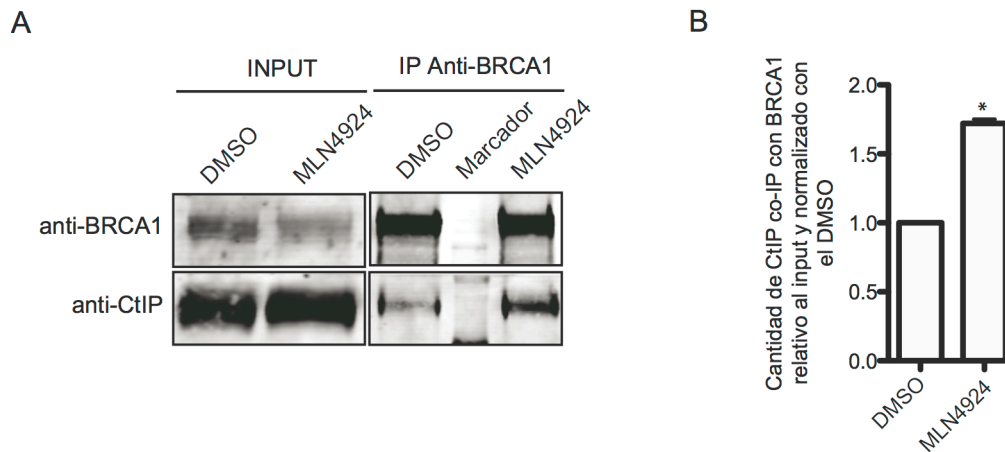
Para ello sometimos a las células a irradiación y cuantificamos la cantidad de CtIP y BRCA1 que era inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-NEDD8 a los 0, 30 ó 60 minutos de realizar el daño (Figura R19). Observamos que tanto CtIP como BRCA1 fueron inmunoprecipitadas en las células no tratadas. Además se comprobó que en ambos casos, la cantidad de inmunoprecipitado se reducía después del daño. Este resultado apoyaba la idea de que tanto CtIP como BRCA1 interaccionan con proteínas nediladas antes de la inducción del daño y que esta interacción disminuye tras la aparición del mismo.



**Figura R19. La formación del complejo entre CtIP y BRCA1 está regulado por su interacción con proteínas nediladas.** (A) Inmunoprecipitación de CtIP y BRCA1 mediante anti-NEDD8 a diferentes tiempos tras la inducción de daño. Las células fueron irradiadas con 10 Gy y los extractos de proteínas recogidos a los tiempos indicados. Después de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-NEDD8 se realizó un western blot contra CtIP y BRCA1. Se muestra una imagen representativa del western blot. (B) Cuantificación del panel (A). Se muestra la cuantificación de la cantidad de proteína inmunoprecipitada relativa al input y normalizada al tiempo 0 de tres experimentos independientes.

CtIP y BRCA1 interactúan físicamente (Yu & Chen 2004) y esta interacción facilita la resección del ADN por eliminación de los sitios de unión de la proteína RIF1 (Chapman et al. 2013; Escribano-Díaz et al. 2013). De hecho, en nuestro grupo hemos demostrado recientemente que la interacción de BRCA1 con CtIP controla la extensión de la resección tras la generación de los cortes de doble cadena por modulación de la velocidad de resección (Cruz-García et al. 2014). Para elucidar el papel de la nedilación en la interacción entre CtIP y BRCA1, realizamos inmunoprecipitaciones en presencia y ausencia del inhibidor de la nedilación MLN4924 con anti-BRCA1 y detectamos CtIP mediante western blot (Figura R20A). Cuantificamos el porcentaje de proteína co-inmunoprecipitada en la condición con DMSO o con MLN4924 y observamos que la cantidad de CtIP co-inmunoprecipitada aumentó aproximadamente dos veces cuando la nedilación fue inhibida (Figura R20B).



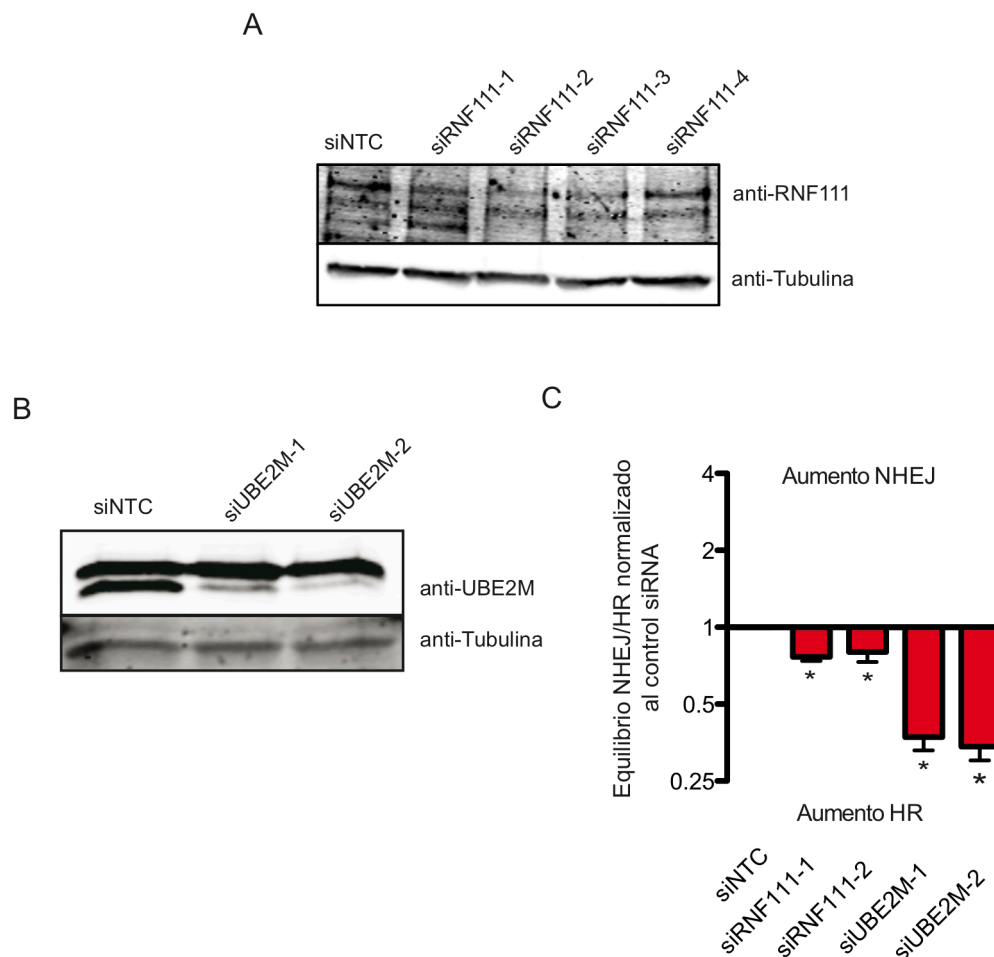


**Figura R20. La cantidad de CtIP co-inmunoprecipitada con BRCA1 es dependiente de nedilación.** (A) Co-Inmunoprecipitación de CtIP. Extractos de proteínas de células pre-tratadas con MLN4924 o DMSO fueron inmunoprecipitadas con una mezcla de dos anticuerpos anti-BRCA1 y se visualizó mediante western blot contra CtIP y BRCA1. Se muestra un western blot representativo. (B). Cuantificación de la cantidad de proteína CtIP inmunoprecipitada relativa al input y normalizada al DMSO, tomado como el 100%. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

## 2.6. LA LIGASA E3 RNF111 Y LA LIGASA E2 UBE2M BLOQUEAN LA RESECCIÓN DEL ADN GENERANDO UN DESEQUILIBRIO EN EL RATIO NHEJ/HR.

Nuestros datos sugieren que la nedilación de proteínas es un importante inhibidor de la resección del ADN. Se ha demostrado previamente que RNF111, una ligasa E3 del tipo STUBL, está implicada en la respuesta al daño en el ADN porque facilita la nedilación y la ubiquitinación de varios genes importantes para este proceso (Ma et al. 2013; Poulsen et al. 2013). Como habíamos visto previamente, el efecto del tratamiento con el inhibidor de la nedilación MLN4924 es un aumento en la HR en el sistema SSR (Figura R16A). Quisimos analizar por tanto, el papel de RNF111 en el equilibrio NHEJ/HR mediante dicho sistema. En primer lugar, comprobamos el silenciamiento de RNF111 con 4 siRNAs diferentes mediante western blot y de ellos se seleccionan los siRNF111-2 y siRNF111-3 (Figura R21A) (Tabla M4). Se analizó sobre el sistema SSR el efecto de la depleción de los siRNAs contra RNF111. Como se puede observar en la Figura R21C la depleción de RNF111 conllevó un incremento de la HR sobre el NHEJ. Para determinar si el efecto de la depleción de RNF111 era debido a su implicación en los procesos de

nedilación y excluir su participación en los procesos de ubiquitinación que también cataliza RNF111, quisimos abordar el estudio de la proteína UBE2M, una enzima E2 que colabora con RNF111 específicamente en la nedilación de las proteínas (Ma et al. 2013; Cukras et al. 2014).

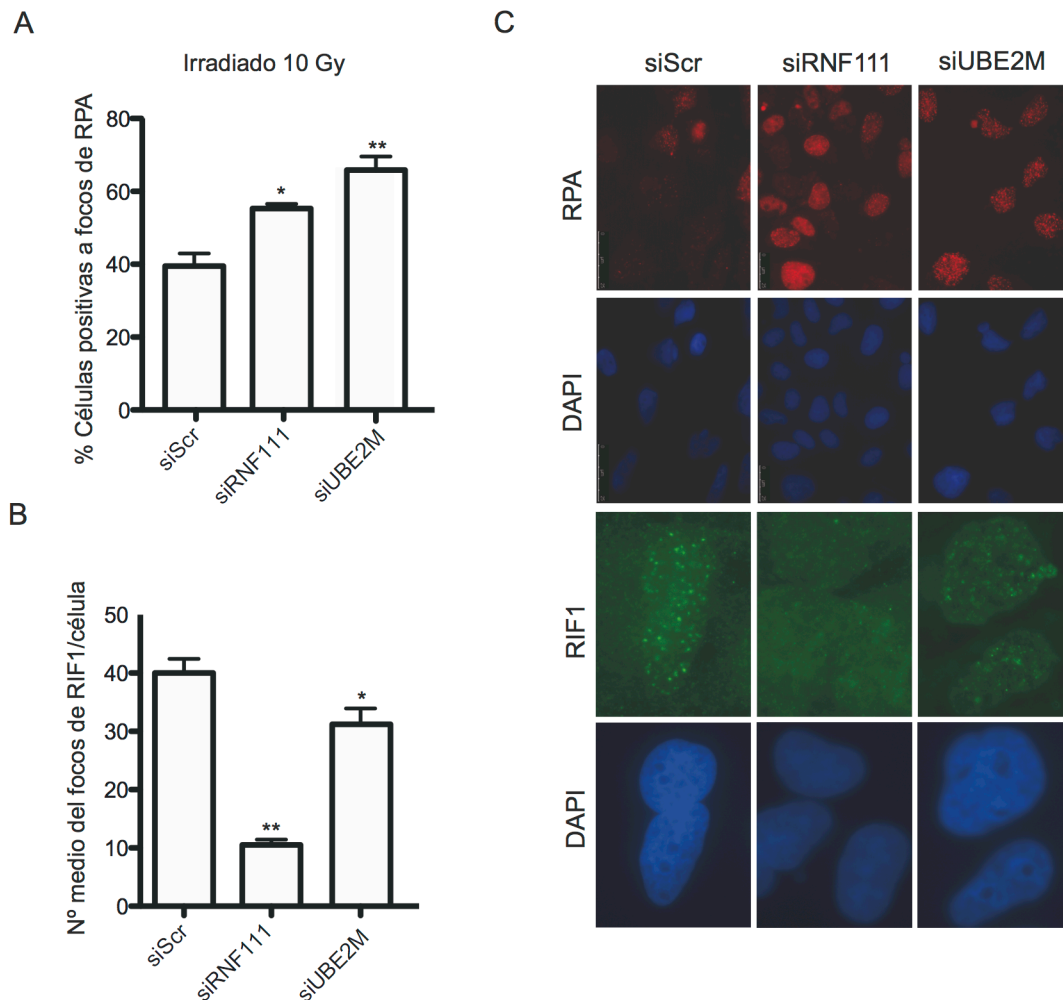


**Figura R21. Papel de RNF111/UBE2M en la elección de la ruta de reparación de los DSBs.** (A) Western blot para la comprobación de la depleción de RNF111 con cuatro siRNAs diferentes (1-4). Cultivos de U2OS fueron transfectados a una concentración de 30 nM con diferentes siRNAs para RNF111. Tras 48 horas de cultivo, las células se recogieron y se realizaron los extractos de proteínas. Se muestra un western blot representativo de las depleciones obtenidas con cada siRNA. Como control de carga se inmunodetectó la proteína alfa-tubulina. (B) Western blot para la comprobación de la depleción de UBE2M con dos siRNAs diferentes. Como en (A) pero utilizando un anticuerpo anti-UBE2M. (C) Efecto de las depleciones de RNF111 y UBE2M en el sistema SSR. Células con el sistema SSR fueron transfectadas con siRNAs contra RNF111 o UBE2M de manera independiente. Como control se empleó un siRNA sin diana conocida. Se calculó el equilibrio entre HR y NHEJ. Otros detalles como en la Figura R13.

Utilizamos dos siRNAs distintos para la proteína UBE2M (Tabla M4), que comprobamos disminuían los niveles de la proteína (Figura R21B). A

continuación analizamos el efecto sobre el sistema SSR de la depleción mediante estos siRNAs de UBE2M. Se pudo observar que dicha depleción inclinó el equilibrio NHEJ/HR hacia la recombinación homóloga. El efecto obtenido sobre el sistema SSR fue más llamativo en el caso de UBE2M que el obtenido para RNF111 (Figura R21C).

Para analizar la implicación de estas proteínas en la resección del ADN, realizamos el protocolo para la detección de focos de RPA (Figura R22)



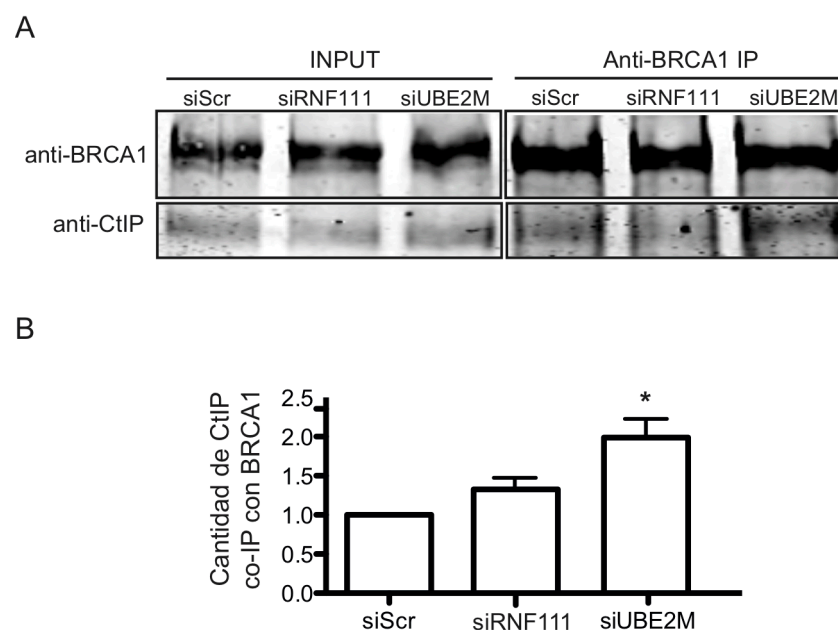
**Figura R22. Papel de RNF111/UBE2M en la resección del ADN.** (A) Análisis de la formación de focos de RPA en células con RNF111 y UBE2M deplecionados. Se incluyeron células transfectadas con un siRNA control (siScr). (B) Estimación del número de eventos de NHEJ mediante inmunodetección de focos de RIF1 en células tratadas igual que en A. (C) Se muestran unas imágenes representativas de las inmunofluorescencias realizadas en los apartados A y B. Otros detalles en la Figura R15.

deplecionando los genes RNF111 y UBE2M, en ambos casos se obtuvo un incremento significativo en el número de células con focos de RPA, reflejando

esto el aumento en la resección del ADN (Figura R22A). Este incremento en el porcentaje de células positivas para focos de RPA fue ligeramente superior para UBE2M corroborando el papel de la nedilación en la resección.

Para apoyar nuestros resultados, analizamos los focos de la proteína RIF1. Tras la inducción del daño celular por irradiación y habiendo deplecionado RNF111 o UBE2M se obtuvo una reducción en el número medio de focos en ambos casos si bien la reducción en el número medio de focos de RIF1 en el caso de RNF111 fue más marcada (Figura R22B). Estos resultados indican una función inhibitoria de la nedilación dependiente de RNF111/UBE2M en los sitios de rotura sobre la resección.

Habíamos observado que la interacción entre CtIP y BRCA1 era dependiente de la nedilación (Figura R20). Quisimos averiguar si la depleción de RNF111 y de UBE2M tenía algún papel en dicha interacción. Realizamos inmunoprecipitaciones de CtIP con el anticuerpo anti-BRCA1 en las condiciones control y deplecionando RNF111 o UBE2M (Figura R23A).



**Figura R23. Papel de RNF111 y UBE2M en la interacción entre CtIP y BRCA1.**

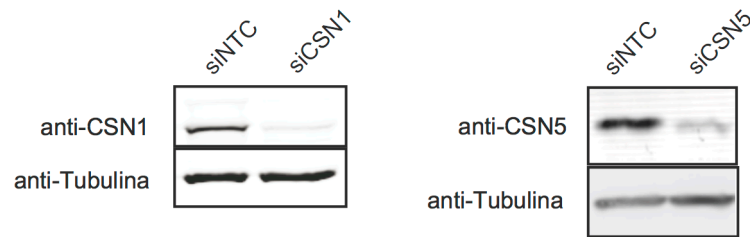
(A) Efecto de la depleción de RNF111 y UBE2M en la co-inmunoprecipitación de BRCA1 y CtIP. Extractos de proteínas de células previamente transfectadas con los siRNAs contra RNF111 y UBE2M fueron inmunoprecipitados con una mezcla de dos anticuerpos anti-BRCA1 y se realizó la inmunodetección con anticuerpos anti-CtIP y anti-BRCA1. Se muestra una imagen representativa de un western blot para CtIP y BRCA1. (B) Cuantificación de cinco experimentos independientes, la cantidad de CtIP co-inmunoprecipitado con anti-BRCA1 se calculó relativa a la cantidad co-inmunoprecipitada en el control (siScr).

Se realizaron un total de 5 repeticiones experimentales y se cuantificaron las proteínas inmunoprecipitadas de BRCA1 y CtIP. Se comprobó que la co-inmunoprecipitación de CtIP y BRCA1 aumentó de manera significativa en ausencia de UBE2M y lo mismo se observó en el caso de la depleción de RNF111 pero más ligeramente (Figura 23B). Sugerimos entonces que tanto RNF111 como UBE2M regulan la resección a través de la interacción entre BRCA1 y CtIP.

## 2.7. LAS DENEDILASAS CSN1 Y NEDP1 MEDIAN EN LA REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA DE LOS CORTES DE DOBLE CADENA.

Dado que nuestros datos estaban indicando un papel de la nedilación en el procesamiento del ADN durante la reparación por recombinación homóloga, quisimos saber la repercusión que tendría el mecanismo inverso, es decir, la denedilación de proteínas en la reparación de los DSBs y en concreto en la resección.

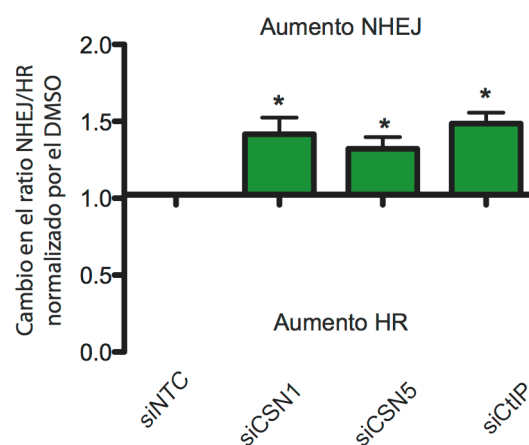
La denedilasa principal de la célula es el COP9 signalosoma que regula múltiples procesos celulares (Mundt et al. 1999). Su acción se basa en una actividad metaloproteolítica que elimina NEDD8 de su diana (Chung & Dellaire 2015). El complejo COP9 signalosoma está compuesto por 8 subunidades denominadas CSN1 a CSN8. Se ha descrito que la subunidad CSN5 es el núcleo de actividad catalítica del COP9 signalosoma y que la depleción de la subunidad CSN1 inactiva completamente el complejo. Realizamos las depleciones de las subunidades CSN1 y CSN5 del COP9 signalosoma mediante siRNAs específicos y comprobamos a través de western blot que eran eficientes utilizando anticuerpos específicos anti-CSN1 y anti-CSN5 (Figura R24A). En una primera aproximación analizamos el efecto que tendría la depleción de CSN1 y CSN5 sobre el sistema SSR. En estos experimentos incluimos como controles negativo y positivo un siRNA sin diana conocida y un siRNA de CtIP respectivamente. Como se puede ver en la Figura R25 la depleción de las subunidades CSN1 y CSN5 dieron como resultado un aumento hacia el NHEJ en el sistema SSR, es decir, el opuesto a un bloqueo de la nedilación (Figuras R13 y R21C). El control positivo con el siCtIP dió un



**Figura R24. Silenciamiento de las denedilasas COP9 signalosoma y NEDP1 mediante siRNAs.** Control de las depleciones de CSN1 y CSN5. Células U2OS fueron transfectadas con siRNAs para las subunidades CSN1 y CSN5 de la denedilasa COP9 signalosoma como se describe en los materiales y métodos. Se muestra un western blot representativo de las depleciones obtenidas. Como control interno se inmunodetectó la proteína alfa-tubulina.

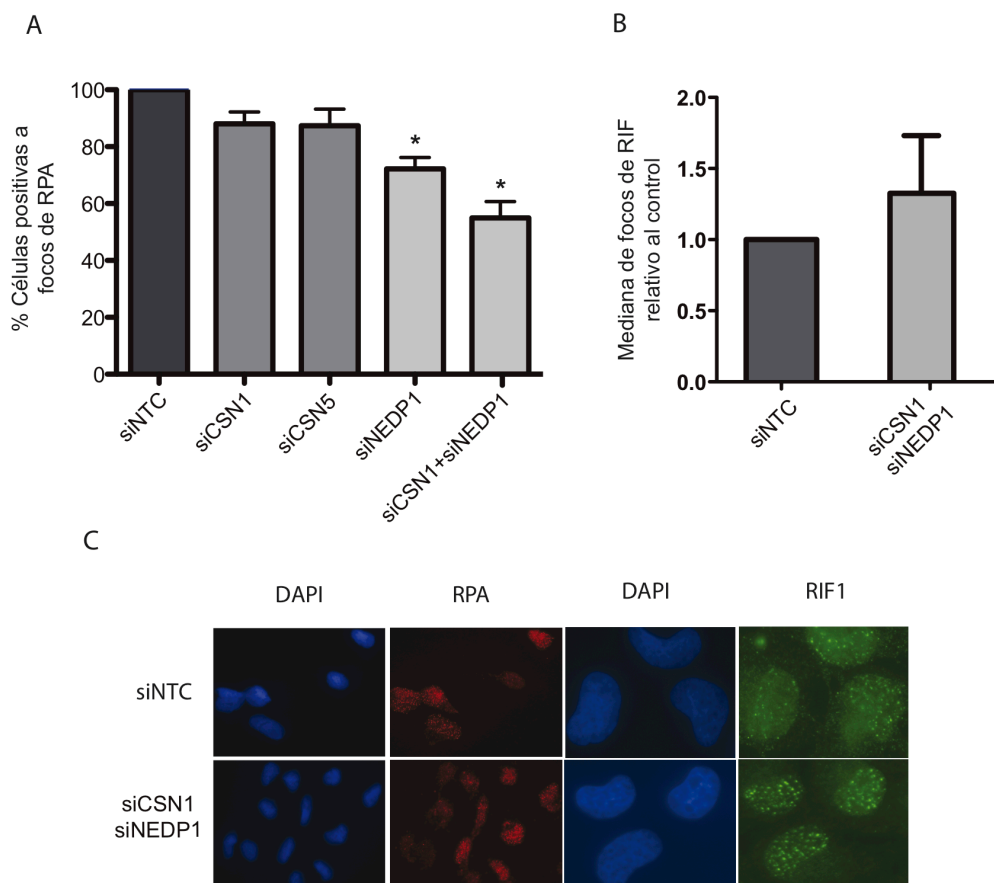
incremento en NHEJ como estaba descrito (Gomez-Cabello et al. 2013) (parte primera de esta tesis).

Para analizar el efecto que tenían sobre la resección las depleciones de estas proteínas realizamos experimentos de visualización de focos de RPA tras la inducción del daño por irradiación mediante inmunofluorescencia. Se deplecionaron con siRNAs específicos las subunidades del complejo COP9



**Figura R25. Papel del COP9 signalosoma en la elección de la ruta de reparación de los DSBs.** Células U2OS con el sistema SSR fueron transfectadas con siRNAs para las subunidades CSN1 y CSN5 de la denedilasa COP9 signalosoma. Como controles positivo y negativo se emplearon un siCtIP y un siRNA control sin diana conocida, respectivamente. Para medir la desviación en el balance entre NHEJ y HR, se midió el ratio entre células verdes y rojas, más detalles como en la Figura R13 y materiales y métodos.

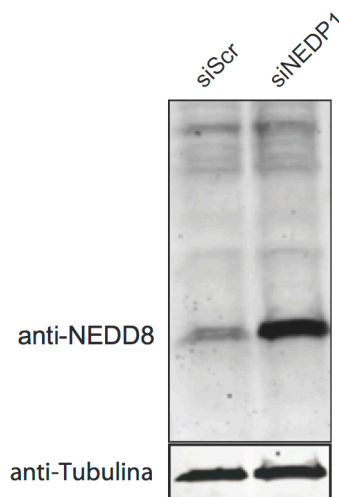
signalosoma CSN1 y CSN5. Se analizó el número de células positivas para focos de RPA y se pudo comprobar que aunque tanto en la depleción de CSN1 como la de CSN5 el número de focos disminuyó, en ambos caso lo hizo



**Figura R26. Papel del COP9 signalosoma y la denedilasa NEDP1 en la resección del ADN.** (A) Eficiencia de la resección medida como porcentaje de células positivas para focos de RPA en células U2OS con CSN1, CSN5, NEDP1 o CSN1 y NEDP1 deplecionados. Las células fueron transfectadas con siRNAs para CSN1, CSN5, NEDP1, una mezcla de CSN1 y NEDP1 y un control negativo. 48 horas después, las células fueron irradiadas a 10 Gy y, tras una hora de recuperación, sometidas a inmunofluorescencia para la detección de focos de la proteína RPA. La gráfica representa el porcentaje de células positivas a focos de RPA. (B) Efecto de la depleción de CSN1+NEDP1 en el número medio de focos de RIF1. Al igual que en (A), las células fueron transfectadas con la mezcla de siRNAs para CSN1 y NEDP1, irradiadas y se procedió a la inmunodetección de los focos de RIF1. Se cuantificó el número medio de focos de RIF1 por célula y se hizo relativo al control negativo. La gráfica representa la media y la desviación estándar del número de focos por célula de tres experimentos independientes. El asterisco representa una significancia estadística de una  $P < 0,05$  como se describe en materiales y métodos. (C) Imágenes representativas de las inmunofluorescencias realizadas para la detección de los focos de RPA (rojo) y RIF1 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

de manera sutil (Figura R26A). Este efecto reducido parecía indicar que otras denedilasas podrían compensar la falta del signalosoma COP9. La otra denedilasa mejor descrita e implicada en diversos procesos celulares es NEDP1 también llamada DEN1 (Mendoza et al. 2003). En el caso de la NEDP1

su actividad metaloproteolítica es dual ya que también participa en la transformación del precursor de NEDD8 en un NEDD8 activo además de retirarlo de las proteínas diana (Mendoza et al. 2003). Comprobamos, en extractos crudos de proteínas, que al deplecionar NEDP1 se incrementó el nivel global de proteínas nediladas mediante western blot con anti-NEDD8 (Figura R27).



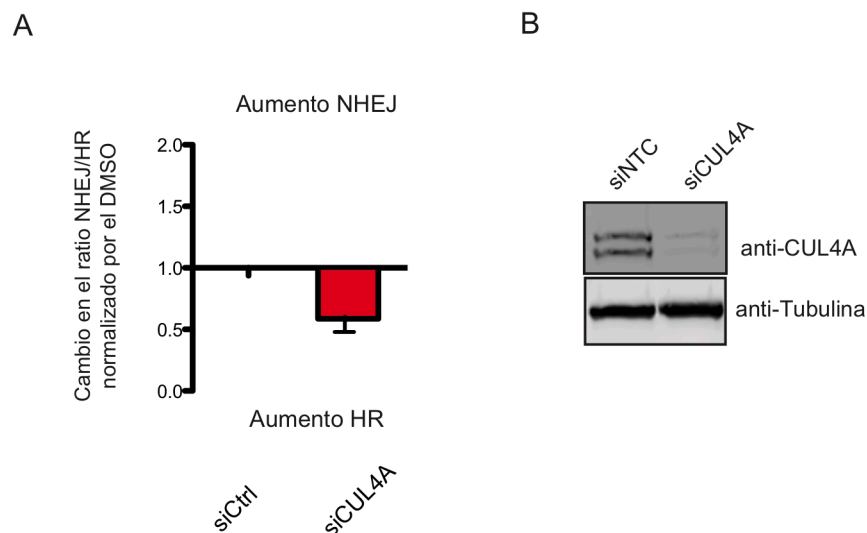
**Figura R27. Niveles de nedilación tras la depleción de NEDP1.** Mediante western blot se comprobaron los niveles de nedilación utilizando un anticuerpo anti-NEDD8. Las células fueron transfectadas con un siRNA para la denedilasa NEDP1 y con un siRNA control (siScr). Como control interno se inmunodetectó la proteína alfa-tubulina.

Analizamos la implicación que podría tener la denedilasa NEDP1 en la resección silenciando el gen en cuestión mediante un siRNA y realizando el protocolo para la detección de focos de RPA. Se observó que el porcentaje de células con focos de RPA disminuyó aproximadamente un 25% y por tanto la resección se vio desfavorecida (Figura R26). También quisimos comprobar el efecto que tendría la depleción simultánea de CSN1 y NEDP1 y pudimos comprobar que el número de focos de RPA disminuyó aproximadamente un 45% con respecto al control (Figura R26A). Para contrastar estos resultados analizamos el número de focos de la proteína RIF1 al realizar la doble depleción CSN1/NEDP1. Aunque se observó un ligero incremento en el número de focos de RIF1, éste no fue significativo (Figura R26B y R26C).

La nedilación tiene como sustratos principales las culinas (ver apartado 5 de la introducción). Quisimos comprobar si las culinas podrían tener una función en el equilibrio NHEJ/HR. Se ha descrito que la CUL4A se recluta al sitio de daño y que el tratamiento con MLN4924 atenúa dicho reclutamiento



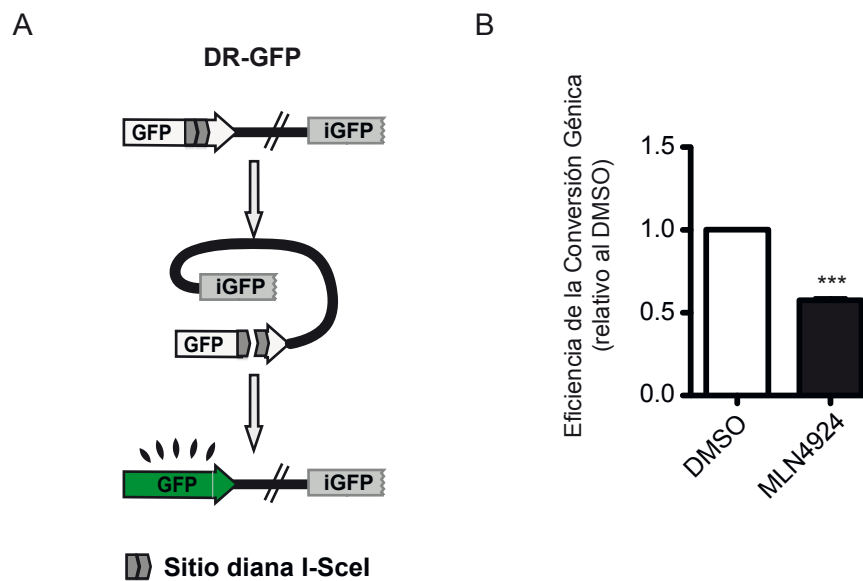
(Meir et al. 2015). Por tanto, mediante el sistema SSR analizamos el efecto que sobre el equilibrio NHEJ/HR causaría la depleción de CUL4A con un siRNA específico. Observamos que se inclinó el equilibrio hacia la reparación por HR y paralelamente comprobamos la depleción mediante western blot (Figura R28). Este estudio fue preliminar y debería ser completado más adelante.



**Figura R28. Efecto de la depleción de CUL4A sobre el sistema SSR.** (A) Análisis del efecto sobre el equilibrio entre NHEJ y HR de la depleción de CUL4A. Como control se empleó un siRNA sin diana conocida. Otros detalles como en la Figura R13. (B) Western blot para la comprobación de la depleción de CUL4A.

## 2.8. LA NEDILACIÓN ESTÁ IMPLICADA EN LA ELECCIÓN DE LA RUTA PARA REPARAR LOS DAÑOS PRODUCIDOS POR ROTURAS DE DOBLE CADENA.

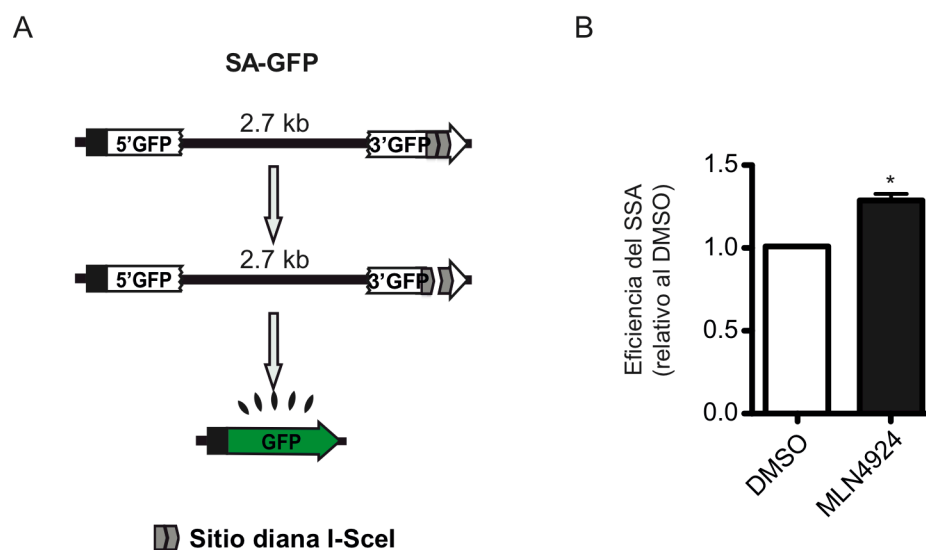
El conjunto de resultados obtenidos sugieren que la nedilación de algunas proteínas desempeña un papel en la resección del ADN y por tanto en la reparación por HR. Para estudiar cómo afecta la nedilación a dicha reparación utilizamos el sistema DR-GFP para medir específicamente reparación por HR *in vivo* (Pierce et al. 2001). En este sistema, dos repeticiones directas (DR) mutadas del gen de la GFP están separadas 3,7 kb por un gen de marcador de selección (Figura R29A). Al tratar con MLN4924, se observó una disminución acusada en la reparación por HR (Figura R28B). Esta aparente



**Figura R29. Efecto de la inhibición de la nedilación de proteínas en el sistema de reparación *in vivo* DR-GFP.** (A) Esquema representativo del sistema DR-GFP. Este sistema se compone de dos repeticiones directas (DR) mutadas del gen de la GFP y separadas 3,7 kb. Uno de los genes contiene un sitio de reconocimiento para la endonucleasa I-SceI. Como resultado de la reparación por recombinación homóloga la secuencia iGFP actúa de donador de información en un fenómeno de conversión génica. (B) Efecto del inhibidor MLN4924 sobre el sistema DR-GFP. Células U2OS con el sistema DR-GFP integrado fueron tratadas con 0,2  $\mu$ M del inhibidor de la nedilación MLN4924 y con DMSO como control. Se midió la eficiencia de la conversión génica por cuantificación del número de células verdes en la condición con MLN4924 y relativizado al control con DMSO. Las barras representan la media y las desviación estándar de tres experimentos independientes. Más información en la sección de materiales y métodos.

contradicción entre estos resultados y los datos que habíamos obtenido mediante el sistema SSR (Figura R13B) y el aumento en los focos de proteína RAD51 observados por otros autores (Cukras et al. 2014), nos hizo pensar que el inhibidor de la nedilación MLN4924 podría estar afectando a la reparación por recombinación homóloga dependiendo de la longitud del tramo de resección. La longitud del ADN reseccionado va a definir como de largo es el ADN que va a ser copiado durante el proceso de recombinación, el denominado tramo de conversión. En el sistema DR-GFP, sólo la reparación por recombinación homóloga de tramo corto sin entrecruzamiento genera un gen GFP funcional mediante conversión génica. El tramo de conversión observable está limitado por el tamaño de la zona de homología, de unos cientos de pares de bases. Sin embargo un evento de tramo más largo, haría

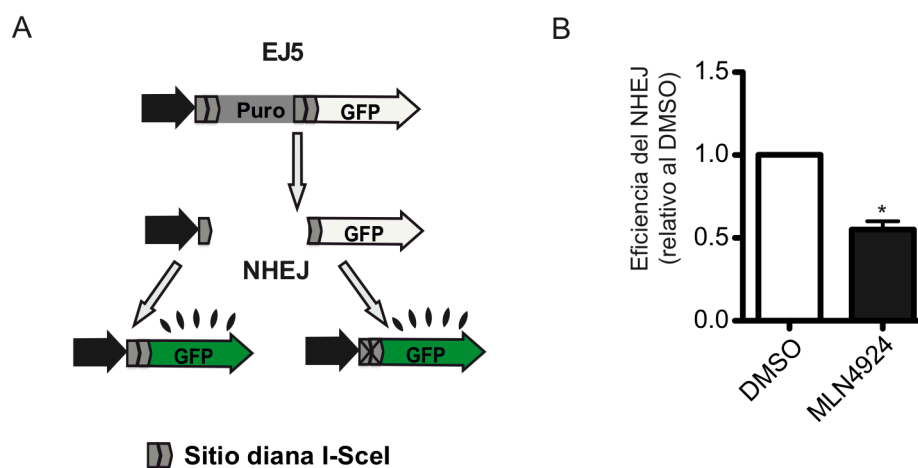
que se mantuviera sólo el extremo 5' de la GFP, y codificaría una proteína truncada. Es decir, un aumento de eventos de tramo largo (causados por una resección más larga) se observa como una caída en el número de células fluorescentes verdes en el sistema DR-GFP. Puede ser que éste fuera el motivo por el que el resultado en el sistema SSR nos indicara un aumento en la HR y sin embargo el sistema DR-GFP nos daba un resultado opuesto. Para comprobar esto, decidimos utilizar el sistema SA-GFP (Figura R30A), el cual mide directamente reparación por SSA (Bennardo et al. 2008).



**Figura R30. Efecto de la inhibición de la nedilación de proteínas en el sistema de reparación *in vivo* SA-GFP.** (A) Esquema representativo del sistema SA-GFP. Este sistema consiste en dos fragmentos del gen de la GFP separados 2,7 kb que comparten 266 pb de homología. La inducción del corte de doble cadena por la endonucleasa I-SceI y su reparación por SSA resulta en un gen funcional de la GFP y las células son verdes. (B) Efecto del inhibidor de MLN4924 sobre la reparación por SSA. Células U2OS con el sistema SA-GFP integrado fueron sometidas a tratamiento con 0,2  $\mu$ M de MLN4924 y con DMSO como control. Se midió la eficiencia en SSA al cuantificar el número de células verdes en la condición con MLN4924 y relativizar a la condición con DMSO. Las barras representan la media y las desviación estándar de tres experimentos independientes. Más información en la sección de materiales y métodos.

En este sistema dos repeticiones directas del gen de la GFP que comparten homología, tras la inducción del corte con I-SceI y su reparación por SSA, resultan en un gen funcional de la GFP. En este tipo de reparación la resección es de tramo largo. Como se aprecia en la Figura R30B, la inhibición de la nedilación incrementó de manera significativa esta ruta, por tanto, la nedilación estaba implicada en controlar la longitud del proceso de resección.

De manera inversa a lo que habíamos obtenido con el sistema SA-GFP, al tratar con MLN4924, la reparación por NHEJ debía estar perjudicada. Para comprobar esto, utilizamos el sistema de reparación EJ5 que detecta diversos tipos de reparación por NHEJ y que por tanto sirve para medir la reparación por NHEJ total (Bennardo et al. 2008). En este sistema, se forma un gen de la GFP funcional cuando las células reparan por NHEJ tanto si se restaura o no la diana I-SceI (Figura R31A). Como esperábamos, al tratar con MLN4924, la reparación por NHEJ disminuyó significativamente debido a un incremento en la resección del ADN (Figura R31A). Estos resultados en los que el tratamiento con el inhibidor de la nedilación incrementó la reparación por SSA y disminuyó



**Figura R31. Efecto de la inhibición de la nedilación de proteínas en el sistema de reparación *in vivo* EJ5.** (A) Esquema representativo del sistema EJ5. Este sistema consiste en un promotor separado del gen que codifica para la GFP por el gen para la puomicina y está flanqueado por dos sitios de corte para la endonucleasa I-SceI. Tras la inducción de los DSBs y su reparación por NHEJ se restaura la expresión de la GFP. Tanto si la diana es restaurada o no se obtiene la expresión del gen de la GFP. (B) Efecto del inhibidor MLN4924 sobre la reparación por NHEJ. Células U2OS con el sistema EJ5 fueron tratadas con 0,2  $\mu$ M del inhibidor de la nedilación MLN4924 y con DMSO como control. Se cuantificó el número de células verdes y se hizo relativo a las células tratadas con DMSO. Las barras representan la media y las desviación estándar de tres experimentos independientes. Más información en la sección de materiales y métodos.

la reparación mediante NHEJ corroboraba el desequilibrio observado en el sistema SSR hacia la reparación por recombinación homóloga por el aumento de la resección al inhibir la nedilación.

## DISCUSIÓN



Esta tesis se centra en el estudio de los mecanismos que regulan la elección entre la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ), y como eje de esta regulación el proceso de resección, el cual determina qué tipo de reparación se llevará a cabo. Para ello, diseñamos los sistemas SSR1.0 y SSR2.0, del inglés *SeeSaw Reporters* (SSR), sensibles a la resección y que son capaces de medir el equilibrio NHEJ/HR. Nuestro objetivo con estos sistemas fue detectar cambios en el equilibrio entre ambas rutas de reparación independientemente de si este cambio es causado por un incremento en la HR y disminución en el NHEJ, o viceversa. La alteración del equilibrio puede depender del aumento o disminución en un sentido de un mecanismo de reparación en concreto o bien de una combinación entre ambos.

La expresión constitutiva del gen de la GFP hace a estos sistemas diferentes a los convencionales (DR-GFP, SA y EJ) los cuales disponen de la diana I-SceI al comienzo del gen. Con estos sistemas sólo se pueden observar eventos de reparación cuando dicha reparación es mutagénica y se restaura la pauta abierta de lectura. Los sistemas SSR detectan la reparación por NHEJ clásico libre de errores y la mutagénica. La expresión de la proteína BFP (azul) en conjunción con la I-SceI permite seguir la eficacia del corte para que la detección de los eventos de reparación por NHEJ sea fiable.

Una posibilidad adicional de reparación es que venga mediada por alt-NHEJ, en cuyo caso tendría lugar la resección, pero las células podrían perder la región intermedia del gen de la GFP, dejando de ser funcional y además no se habría llegado a restaurar el gen de la RFP, por lo que las células no serían fluorescentes ni en el verde ni en el rojo.

A la hora de cuantificar los desequilibrios hacia la HR o hacia el NHEJ el sistema SSR2.0 presenta menos variabilidad experimental que el SSR1.0. Esto se debe a que, en el sistema SSR2.0, hay dos dianas para la enzima I-SceI con secuencias invertidas no palindrómicas y cuando se produce el corte, éste es reparado y la diana I-SceI queda destruida, es decir, sólo se da un fenómeno de reparación. Sin embargo en el sistema SSR1.0 hay una única diana para I-SceI que puede ser reparada y cortada sucesivas veces hasta que desaparece por HR o bien por NHEJ mutagénico. Así, en cada experimento realizado con el sistema SSR1.0, el porcentaje de células que pueden terminar reparando por

HR o por NHEJ puede oscilar en función de las veces que se ha cortado y reparado, y por tanto, aumentando la variabilidad intrínseca de las medidas. Eso explicaría las diferencias cuantitativas entre el sistema SSR1.0 y el SSR2.0, que en ningún caso se manifiestan como diferencias cualitativas entre ambos (Figura R4 y R7).

Se ha descrito en diversos organismos que las mutaciones en los genes implicados en la reparación por NHEJ o cuando los extremos del ADN están desprotegidos aumentan la resección y la recombinación homóloga (Huertas 2010; Chapman et al. 2013; Clerici et al. 2008; Escribano-Díaz et al. 2013; Munoz-Galvan et al. 2013). Por eso, empleamos shRNAs para deplecionar varios genes implicados en la reparación por NHEJ, como DNA-PKcs, Ku70, KU80 y LIG4, para validar la capacidad de estos sistemas de detectar desequilibrios entre las rutas de reparación. Como se esperaba, perjudicar la vía de reparación por NHEJ desplaza el equilibrio en el sistema SSR hacia la reparación por homología de secuencias (Figura R4).

Además, quisimos ver el efecto que tendrían en nuestros sistemas la depleción de genes implicados en la reparación por homología de secuencia y más concretamente en la resección. Realizamos las depleciones de los genes CtIP, MRE11, BLM y EXO1 con sistemas lentivirales (Figura R4). Tanto la depleción de CtIP, como la de BLM y EXO1 inclinaron el equilibrio fuertemente hacia la reparación por NHEJ, por tanto los sistemas SSR (en sus versiones 1.0 y 2.0) fueron sensibles a defectos en la resección tanto de tramo corto, causado por la depleción de CtIP, como a la resección de tramo largo, por la depleción de BLM y EXO1 (Figura R4).

MRE11 es el principal regulador de la ruta de reparación de los DSBs, (Ciccía & Elledge 2010; Huertas 2010; Gomez-Cabello et al. 2013; Jazayeri et al. 2008). MRE11 posee diferentes actividades catalíticas tales como las actividades exonucleasas 3'-5' y 5'-3' y endonucleasa. Sin embargo también se ha visto que MRE11 está implicado en la reparación por NHEJ, al sujetar ambos extremos de la rotura, detectar el daño y activar la cascada de señalización para el control del ciclo celular (Stracker & Petrini 2011). Por ello, *a priori* era difícil predecir cuál sería el mecanismo de reparación mayoritario al deplecionar MRE11. Con nuestro sistema se pudo aportar información específicamente en este sentido, ya que al deplecionar MRE11 lo que se



observó fue un incremento en la reparación por NHEJ (Figura R4), demostrando que el papel principal de MRE11 es favorecer la reparación por homología de secuencia. Este efecto está probablemente relacionado con la función que cumple MRE11 en la resección. Por otra parte, hemos empleado el compuesto Mirina, un inhibidor de la actividad exonucleasa 5'-3' de MRE11 (Dupre et al. 2008; Rozier et al. 2013). No observamos un efecto significativo en el sistema SSR al tratar las células con Mirina, a diferencia de lo que habíamos obtenido al deplecionar MRE11, por lo que concluimos que la actividad exonucleasa 5'-3' de MRE11 no era esencial para el procesamiento del extremo del ADN, sino su actividad endonucleasa. En concordancia con estos resultados, hay trabajos previos en los que se demuestra que la función del complejo MRN en resección está basada en la liberación de fragmento de ADN de cadena sencilla (oligos) producidos por la actividad endonucleasa de MRE11 y no por su actividad exonucleasa (Jazayeri et al. 2008; Cannavo & Cejka 2014).

Tal y como esperábamos, la depleción de otra nucleasa, EXO1 (5'-flap endonucleasa), implicada en extender la resección, y que actúa después de MRE11 activando la recombinación homóloga (Wang et al. 2013; Symington & Gautier 2011) inclinó el equilibrio hacia el NHEJ confirmando su función en la HR (Figura R4).

Como control de la información obtenida con los sistemas SSR, silenciamos RAD51 que es un factor fundamental en la reparación de los DSB mediante recombinación homóloga, ya que es esencial para la formación del nucleofilamento con la hebra de ADN que va a llevar a cabo la invasión para la formación de las estructuras de Holliday (Sarbjana & West 2014), pero no está implicada en la decisión entre reparación por NHEJ o HR y lo más importante, no está implicada en el mecanismo de reparación mediante SSA, por tanto, su depleción no debería afectar al sistema SSR. Como se esperaba, tras la depleción de RAD51 no se obtuvo desequilibrio en ambas versiones del sistema SSR (Figura R4).

Hay que tener en cuenta el contexto celular en el que se lleva a cabo la reparación, ya que éste puede determinar qué ruta se elige finalmente y para ello la reparación del ADN y el metabolismo celular deben coordinarse mediante una compleja cascada de señalizaciones como es la respuesta al

daño del ADN (DDR) (Ciccia & Elledge 2010; Jackson & Bartek 2009). Por tanto decidimos investigar el efecto de la depleción de diferentes factores de la DDR y cómo influirían en el equilibrio entre HR y NHEJ. La DDR se inicia con una serie de fosforilaciones llevadas a cabo por dos kinasas, ATM y ATR (ver apartado 4.1 de la introducción) (Ciccia & Elledge 2010; Jackson & Bartek 2009). La depleción de ATM y ATR mediada por shRNAs resultó en un pronunciado desequilibrio de los sistemas SSR hacia la reparación por NHEJ (Figura R6). Estos resultados estuvieron en concordancia con el papel que tienen ATM y ATR en favorecer la resección (Smith et al. 2010; Flynn & Zou 2011; Beucher et al. 2009). Por tanto, aunque ATM tiene una función importante en la reparación por NHEJ (Jeggo & Lobrich 2005), los datos obtenidos apoyan su función mayoritaria en favorecer la HR.

Una vez comprobada la aplicabilidad de los sistemas a la hora detectar desequilibrios en los mecanismos de reparación nos propusimos investigar el efecto que tendrían en dicho equilibrio ciertas pequeñas moléculas inhibitorias relacionadas con la DDR, la remodelación de la cromatina, la replicación del ADN y la degradación de proteínas. Las moléculas seleccionadas están siendo actualmente empleadas en ensayos clínicos o bien son interesantes por su posible utilidad en los tratamientos contra el cáncer y otras enfermedades (Tabla M3). Tras analizar los resultados obtenidos con el sistema SSR2.0 observamos que proteínas implicadas en la deacetilación de las histonas tienen un gran impacto en la elección de la ruta de reparación ya que el tratamiento con Tricostatina A (TSA) inclina la balanza hacia HR (Figura R13A). Estos resultados son compatibles con que el TSA alterara la estructura de la cromatina facilitando la resección del ADN mediante la activación de ATR (Murga et al. 2007), y por tanto incrementando el SSA y reduciendo el NHEJ. El TSA es un antibiótico antifúngico potente inhibidor de las histonas deacetilasas (HDACs) que provoca un aumento de la acetilación de las histonas, aumento de la expresión de genes específicos, cambios metabólicos y morfológicos. En concreto, inhibe específicamente las HDACs de clase I y II, tales como HDAC1 y HDAC2, pero no las de la clase III (como las sirtuinas). Se ha propuesto que HDAC1 y HDAC2 promueve el NHEJ facilitando la unión de los factores de NHEJ a los DSBs a través de modificaciones en la cromatina (Yoshida et al. 1990), sin embargo no se puede descartar que promuevan directamente la reparación del DSB por NHEJ porque sus dianas sean

directamente factores del NHEJ u otros reguladores como ATM (Miller et al. 2010). Así mismo, la doble depleción de HDAC1 y HDAC2 reduce la recombinación homóloga clásica (Miller et al. 2010). En nuestro laboratorio se ha analizado el efecto de la depleción de HDAC1 e HDAC2 en el sistema SSR y hemos podido comprobar que se altera el equilibrio del sistema concretamente el NHEJ (Cintia Checa, Pablo Huertas, trabajo de máster), en concordancia con nuestras observaciones con TSA.

Otra de las pequeñas moléculas que alteró el balance NHEJ/HR hacia la HR fue la afidicolina (Figura R13A) que es un inhibidor de la replicación. La afidicolina inhibe las ADN polimerasas  $\alpha$  y  $\epsilon$ , bloqueando la horquilla de replicación y como consecuencia, deteniendo las células en la fase S (Aguilera & Gómez-González 2008). El bloqueo de la horquilla de replicación conlleva la aparición de ssDNA y la activación de ATR, de hecho se ha descrito que la afidicolina activa a ATR (Flynn & Zou 2011). Teniendo en cuenta que la HR está restringida a las fases S y G2 (Huertas 2010), la acumulación en fase S explica el incremento neto de la HR sobre el NHEJ como se muestra en la Figura R13A.

También comprobamos el efecto del inhibidor de PARP (Olaparib) por su relación con la reparación de los DSBs (Farmer 2005) al ser un compuesto que produce sensibilidad a irradiación en las células defectuosas en recombinación homóloga. Además, se había descrito previamente, que PARP1 y PARP2 están directamente implicados en la elección entre NHEJ y HR (Ciccia & Elledge 2010). Más recientemente se ha comprobado que PARP3 controla la resección siendo por tanto importante en la decisión entre las reparaciones por HR, NHEJ y alt-NHEJ (Beck et al. 2014). Empleamos el inhibidor de PARP y no se observó un desequilibrio significativo en el sistema SSR (Figura R13A). Esta ausencia de efecto podría ser debido a una compleja mezcla de efectos positivos y negativos de diferentes proteínas PARP en la elección de la ruta de reparación. Por el contrario al utilizar como inhibidor la nicotinamida (NAM) encontramos un desequilibrio en el sistema SSR, ya sea por un incremento en el NHEJ o por una reducción en la reparación por HR. La nicotinamida es la amida del ácido nicotínico, también llamada vitamina B3 o niacina y se libera cuando PARP cataliza la polimerización de ADP en una reacción de ADP ribosilación empleando como sustrato  $\text{NAD}^+$  (Schreiber et al. 2006). La nicotinamida inhibe a PARP1 por ser un inhibidor competitivo del sustrato de

PARP1 y se ha visto que las células tumorales de mama (defectuosas en BRCA1) son sensibles a la inhibición de PARP1 probablemente porque al no poder reparar por HR el daño producido de manera endógena por la replicación mueren (Lord & Ashworth 2008). Esto puede explicar el incremento neto observado en el balance NHEJ/HR (Figura R13A).

Las modificaciones post-traduccionales tienen un importante papel en la DDR y en la reparación de los DSBs (Jackson & Durocher 2013). Esto incluye el reclutamiento de una serie de ligasas E3 de ubiquitina como RNF8, RNF168 y BRCA1, además de la ligasa E2 de ubiquitina UBC13, también llamada UBE2N (ver apartado 4.1 y 5.1.2 de la introducción) (Huen 2007; Kolas 2007; Mailand 2007). Las actividades de estas ligasas son esenciales para la DDR y la reparación del ADN y se comprobó que, tras su depleción, inclinaron el equilibrio en el sistema SSR hacia la reparación por NHEJ. Por tanto, y como en el caso de ATM y ATR, a pesar de que la depleción de estos factores pueden tener un fenotipo complejo y afectar a ambas rutas de reparación, la eliminación de cualquiera de ellas tiene un efecto mayor dificultando la HR. Por el contrario, la utilización de un inhibidor general del proteosoma MG-132, que causa una depleción general de la ubiquitina libre y, por tanto, un descenso generalizado de la ubiquitinación *de novo*, no resultó en un desequilibrio del sistema SSR. Eso nos hizo pensar que las actividades ubiquitinasa de estas ligasas eran específicas para la reparación por recombinación homóloga y que probablemente una inhibición general del proteosoma afectaría a ambas rutas de reparación y el equilibrio HR/NHEJ no se vería significativamente alterado (Figura R6).

Algo similar se había descrito para las ligasas de SUMO PIAS1, PIAS4 y UBC9 (Galanty et al. 2009; Brown, Jackson, et al. 2015). Estas proteínas son reclutadas al sitio de daño y participan del reclutamiento de otras proteínas importantes para la reparación como son 53BP1 y BRCA1 (ver introducción apartado 5.2) (Brown, Jackson, et al. 2015; Escribano-Díaz et al. 2013; Chapman et al. 2013). Por tanto, PIAS1 y PIAS4 son importantes tanto para la reparación por NHEJ como por HR, sin embargo los resultados que nosotros hemos obtenido mediante el sistema SSR es que tanto la depleción de PIAS1 como PIAS4 inclinan el equilibrio hacia la reparación por NHEJ y por tanto son cuantitativamente más importantes para la reparación por HR. Lo mismo

obtuvimos en el caso de UBC9, una enzima intermediaria en el ciclo de reacciones para la sumoilación de los sustratos, cuya depleción nos mostró su papel en la reparación por HR.

La nedilación es otra de las modificaciones post-traduccionales que hemos visto tiene un papel en la reparación, cuando empleamos el inhibidor MLN4924, el cual es un potente inhibidor de NAE ya que se une al sitio de unión del AMP, producto de la reacción llevada a cabo por NAE (Soucy et al. 2009). El empleo de inhibidores de la nedilación se está analizando en ensayos clínicos para el tratamiento contra el cáncer. Cuando las células cancerosas son tratadas con radioterapia, algunas de ellas se vuelven resistentes, por lo que es interesante encontrar químicos que hagan radiosensibles a estas células. Es el caso del MLN4924, el cual se ha descrito sensibiliza a las células de cáncer de mama de manera dependiente de p21 y por tanto es potencialmente un agente terapéutico (Yang et al. 2012). También se ha investigado que el mecanismo por el que el MLN4924 hace a las células sensibles a radiación es diferente según el tipo de cáncer (Wei et al. 2012)

Las modificaciones post-traduccionales mediante NEDD8 afectan sobretodo a las culinas, pero también se ha visto que afectan a diferentes histonas (H2A y H4), a los ribosomas, a ligasas de ubiquitina relacionadas con la DDR (RNF8, RNF168) y a proteínas como p21 y p53, siendo esta nedilación requerida para una correcta activación de la DDR (Li et al. 2014; Xirodimas et al. 2008; Xirodimas et al. 2004; Yang et al. 2012). Observamos que la inhibición de la nedilación mediante MLN4924 inclinó el equilibrio hacia la HR (Figura 13A), por tanto la nedilación parece ser un inhibidor de la HR. Por el contrario, y como esperábamos la sobreexpresión de NEDD8 invirtió el equilibrio en el sistema SSR hacia el NHEJ (Figura R13B).

En concordancia con el anterior resultado, al analizar las células tratadas con MLN4924 se vio un incremento en el número de focos de RPA lo que nos indicó que la nedilación inhibía de alguna forma la resección (Figura R15A) y esto correlacionó, con una disminución en el número de focos de RIF1 (Figura R15B) (ver introducción apartado 4.3.1). De hecho, utilizando una novedosa técnica que permite cuantificar de manera exacta la longitud del ADN reseccionado, Andrés Cruz-García en nuestro laboratorio ha observado que la inhibición de la nedilación no sólo aumenta el número de células que

resecionan, sino que incrementa la longitud de ADN resecionado (Jimeno et al. 2015). Mientras realizamos estos experimentos se publicó el artículo de Cukras et al. (2014) en el que se analizaba el impacto que tenía la ligasa E2 de NEDD8, UBE2M sobre la DDR y el papel de las culinas en este proceso. UBE2M es una de las dos ligasa E2 de NEDD8 descritas en mamíferos junto a UBE2F por Huang et al (2009). Cada una de ellas presentan patrones de nedilación distintos para las culinas. Dado que UBE2M se asoció con la DDR (Cukras et al. 2014), analizamos el efecto de la depleción de UBE2M en el equilibrio NHEJ/HR y en la aparición de los focos de RPA tras inducir daño mediante IR. Al igual que el tratamiento con MLN4924, la depleción de UBE2M inclinó el equilibrio hacia la reparación por HR e incrementó el número de células con los focos de RPA. Estos datos estaban de acuerdo con el incremento en focos de RAD51 que se había observado al tratar la células con MLN4924 (Cukras et al. 2014).

Dado el efecto que tiene la nedilación en resección y dado que la interacción entre BRCA1-CtIP es importante para dicho proceso (Yu & Chen 2004; Cruz-García et al. 2014), decidimos comprobar si la inhibición de la nedilación estabilizaba la interacción entre BRCA1 y CtIP (Figura R18, Figura R19 y Figura R20). Nuestros datos experimentales sugieren que la nedilación mediada por UBE2M de una o varias proteínas desconocidas regula la interacción entre CtIP y BRCA1. Esta hipótesis está en consonancia con la idea de que la interacción BRCA1-CtIP modula la extensión y la velocidad de la resección del ADN (Cruz-García et al. 2014). Aunque nuestros datos apoyan que la nedilación inhibe la resección mediada por CtIP, no podemos descartar que alguno de los fenotipos observados dependan además posibles funciones de la nedilación en otros pasos de la HR, tales como la resección de tramo largo dependiente de BLM/EXO1, la reacción de alineamiento de la cadena, etc. Por otro lado la inhibición de la nedilación al tratar con MLN4924 activa ATR y por tanto sería otra forma de incrementar la HR (Soucy et al. 2009)

Se ha descrito previamente que la nedilación en los sitios de daños del ADN depende de la actividad de RNF111, una ligasa E3 de ubiquitina que se ha propuesto actúa también como ligasa E3 de NEDD8 (Ma et al. 2013). La actividad de RNF111 aumenta tras el daño en el ADN y actúa localmente en las proximidades del mismo. Por un lado, RNF111 y NEDD8 se localizan

rápidamente en los sitios de daño, con un pico de reclutamiento a los 10 minutos después del daño y de manera dependiente de UBE2M (Ma et al. 2013). Después, su acumulación se disipa lentamente con el tiempo. Entonces, la nedilación de proteínas en el entorno del daño es una rápida respuesta que encaja bien con un papel en el mecanismo de reparación por NHEJ. Por otro lado, la depleción de RNF111 disminuye los focos de BRCA1 y de RAD51 tras el daño (Ma et al. 2013). Nosotros hemos comprobado además que la depleción de RNF111 incrementa la cantidad relativa de CtIP que co-inmunoprecipita con BRCA1 (Figura R23). Aunque no podemos excluir el papel de la ubiquitinación realizada por RNF111 en el fenotipo observado, el hecho es que efectos similares se observaron con la depleción de UBE2M, que es la E2 que se ha propuesto que actúa junto a RNF111 en nedilación, lo que nos conduce a proponer que la nedilación mediada por RNF111/UBE2M está implicada en la resección del ADN, y por consiguiente en la HR (Figuras R21 y R22). Además este incremento de la cantidad relativa de CtIP co-inmunoprecipitada observado al deplecionar RNF111 y UBE2M también se obtuvo cuando se inhibió la nedilación tratando las células con el MLN4924 (Figura R20). Cualitativamente, la depleción de RNF111 y UBE2M muestran fenotipos similares tanto en el sistema SSR como en la medición de focos de RPA y RIF1 (Figuras R21 y R22 respectivamente) pero, cuantitativamente, el efecto de UBE2M es mayor que el de RNF111, lo cual podría sugerir que ambas proteínas tienen papeles adicionales e independientes controlando la resección del ADN. Por ejemplo, la depleción de RNF111 disminuye los focos de NEDD8 y la cascada de ubiquitinación inducida por daño se ve afectada porque se afecta el reclutamiento de RNF168 al daño (Ma et al. 2013). El motivo es que RNF168 reconoce a la histona H4 polinedilada y si RNF111 es silenciado no es capaz de unirse a la cromatina (Ma et al. 2013). Existe cierta controversia sobre si RNF168 también actúa como una ligasa E3 de NEDD8 encargada de llevar a cabo la nedilación de la histona H2A (Li et al. 2014) o si su función en la DDR es exclusivamente a través de su actividad ligasa de ubiquitina y su relación con NEDD8 se limita a reconocer la histona H4 polinedilada (Ma et al. 2013).

Por otra parte, no podemos descartar la participación en DDR de los sustratos naturales de la nedilación: las culinas. Existe una correlación entre la CUL7 y CtIP en una determinada patología, el enanismo primoridal, de manera

que mutaciones específicas tanto en la CUL7 como en CtIP muestran fenotipos similares (Shaheen et al. 2014; Qvist et al. 2011). En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Yosef Shiloh hemos estudiado el papel del CSN y CUL4, en la reparación de los DSBs. CSN es reclutado al sitio de daño de una manera dependiente de nedilación y que este reclutamiento era acompañado por la CUL4A (Meir et al. 2015). El tratamiento con MLN4924 atenúa el reclutamiento de la CUL4A al DSB sin que se afecte el reclutamiento de otras proteínas como 53BP1 o RNF168 (Meir et al. 2015). En el sistema SSR observamos un desequilibrio hacia el NHEJ indicando una función del complejo CSN en la reparación por recombinación homóloga (Figura R25). Además comprobamos si obteníamos el mismo efecto al deplecionar la CUL4A y vimos una tendencia a la reparación por HR (Figura R28). Esto se debía a una reducción en el número de células positivas para focos de RPA al deplecionar las subunidades CSN1 y CSN5. El efecto fue más claro cuando realizamos el silenciamiento de otra de las denedilasas, NEPD1, y aún más cuando combinamos la depleción de la subunidad CSN1 con la de NEPD1 (Figura R26). Esto nos hizo pensar en un posible efecto epistático entre el complejo CSN y la denedilasa NEPD1. El resultado obtenido al analizar RPA fue coincidente con los datos obtenidos mediante el sistema SSR (Figura R25) y mediante el análisis de los focos de RIF1 (Figura R26). Estos datos indican que no sólo la nedilación está implicada en la reparación de los DSBs, sino que el proceso inverso también, la denedilación, tanto a nivel de la DDR como directamente en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga, como se ha podido observar a nivel de resección (Figura R26) y con el papel que tiene la nedilación en la interacción entre CtIP y BRCA1 (Figura R20) (Jimeno et al. 2015).

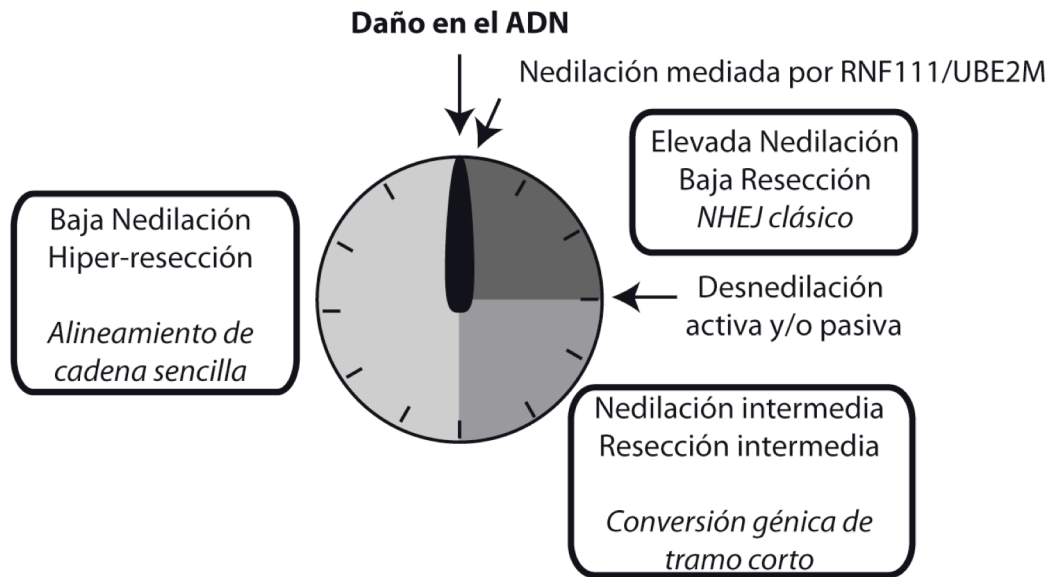
Posteriormente se ha relacionado la nedilación con la liberación del heterodímero Ku desde los sitios de daño (Brown, Lukashchuk, et al. 2015). La nedilación promueve la ubiquitinación de Ku y esto desencadena su salida del DSB. También observaron que la depleción de UBE2M reducía la supervivencia celular, del mismo modo que nosotros habíamos observado para los tratamientos con MLN4924 (Figura R17A). Mediante un ensayo de integración al azar de un plásmido deplecionando UBE2M describieron un defecto en el NHEJ, que sería compatible con nuestras observaciones de un aumento de la HR. El conjunto de nuestros experimentos señalan una función



de la nedilación/desnedilación en la resección y por tanto afectan a la reparación por HR, pero no es descartable que la reparación por NHEJ también se vea afectada al inhibir la nedilación y el resultado obtenido mediante el sistema SSR sea la suma de ambos efectos. En cuanto a la cinética de nedilación/desnedilación observan un rápido reclutamiento de NEDD8 al sitio de daño (Brown, Lukashchuk, et al. 2015), observación que cuadra con el modelo propuesto por nosotros y que se representa en la Figura D1, ya que planteamos que a través de RNF111 se da una rápida oleada de nedilación tras la inducción del daño, reduciéndose la resección y promoviendo el NHEJ.

Por tanto, proponemos un modelo de regulación de la reparación de los DSB basado en que la nedilación podría estar actuando como un reloj molecular (Figura D1). Tras la aparición del DSB, rápidamente, la acumulación de RNF111 podría obstaculizar la resección del ADN favoreciendo el NHEJ. Después, las proteínas nediladas perderían NEDD8 debido a mecanismos activos y pasivos. Por una parte, RNF111 sería excluido de la cromatina dañada (Ma et al. 2013). Por otra parte, la acción del complejo CSN y la denedilasa NEDP1 contribuirían activamente a la desnedilación de las proteínas. En consonancia con este modelo, se ha visto que ambas denedilasas se activan como respuesta al daño en el ADN. De hecho, dos de las subunidades de complejo COP9 signalosoma son sustrato de ATM (Matsuoka 2007). Además, RNF168 es nedilada después del daño, pero esta nedilación es transitoria y comienza a decaer a los 30 minutos debido a la acción de la denedilasa NEDP1 (Li et al. 2014).

Este reloj molecular dependiente de nedilación regularía el tipo de reparación del DSB que tendría lugar mediante el control de la extensión de la resección del ADN. Esto estaría de acuerdo con la idea de que la nedilación modula la interacción entre BRCA1-CtIP, interacción que controla la longitud de la resección (Cruz-García et al. 2014). Primero, la acumulación de la nedilación mediada por RNF111 favorecería el NHEJ clásico. Algunas de aquellas roturas que no fueran adecuadas para la reparación por NHEJ, probablemente debido a modificaciones en los extremos del ADN, permanecerían sin ser reparadas durante más tiempo. En estas roturas, es posible que la propia nedilación facilite la ubiquitinación y salida de Ku para permitir otros tipos de reparación (Brown, Lukashchuk, et al. 2015). Tan pronto como la nedilación de las proteínas comienza a desaparecer, probablemente



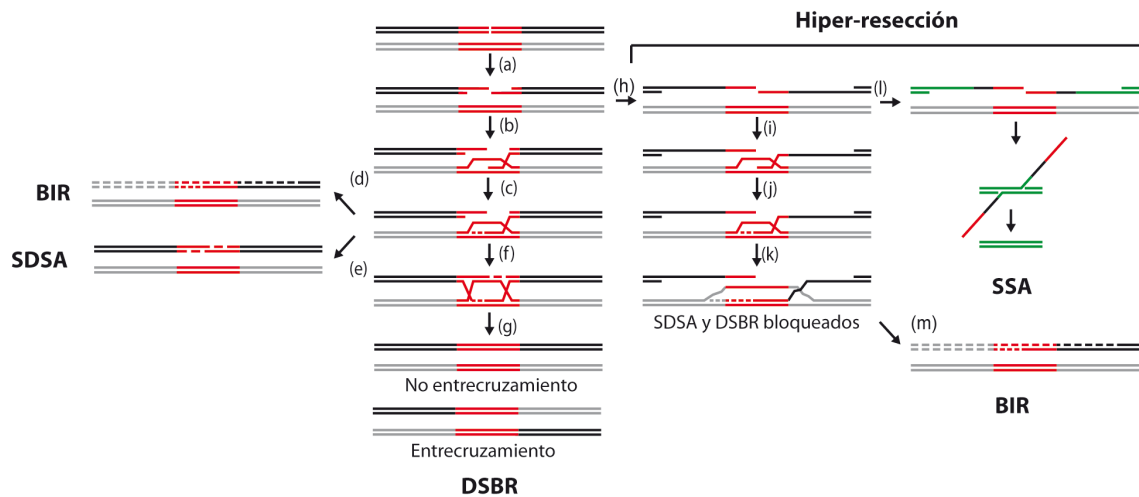
**Figura D1. La nedilación actúa como un reloj molecular para la resección y la elección de la ruta de reparación.** Primero, un alto nivel de nedilación, en el entorno de la rotura, debido a la actividad de RNF111 inhibe la resección favoreciendo el NHEJ. Después, la activación de NEDP1 y CSN reduce la nedilación permitiendo que tenga lugar la resección. La mayoría de las roturas serán reparadas por conversión génica. Finalmente, la nedilación es lo suficientemente reducida como para permitir la hiper-resección, favoreciendo mecanismos de reparación como el SSA que requiere tramos largos de ADN reseccionado.

debido a la retirada del DSB de RNF111 y la activación de CSN y NEDP1, comenzaría a tener lugar la resección en algunos extremos dañados del ADN. Este limitado procesamiento dejaría extremos “limpios” que permitiría su reparación mediante la reparación por MMEJ (Figura D1). Incluso entonces algunas roturas podrían quedar sin reparar. La progresiva caída en nedilación facilitaría la interacción entre CtIP y BRCA1, aumentando paulatinamente la procesividad y la longitud de la resección por la eliminación de RIF1 (Cruz-García et al. 2014). Sólo entonces los extremos de ADN de cadena sencilla serían tomados para la HR, primero por conversión génica de tramo corto y después por SSA.

Una caída total de los niveles de proteínas nediladas provocaría un proceso de hiper-resección de los extremos, lo que podría tener consecuencias mutagénicas. Durante la recombinación con una secuencia ectópica, como en la recombinación medida por el sistema DR-GFP, es esencial que la resección esté limitada a la región homóloga (Figura D2). Sólo entonces, tienen lugar los subtipos no mutagénicos de recombinación como el DSBR y el SDSA (Figura D2, ag-g,e). De otra forma, en ausencia completa de

nedilación, como con el tratamiento con MLN4924 se daría hiper-resección, siendo la resección del ADN más larga (Figura D2, h). Entonces tanto DSBR como SDSA serían bloqueados (Figure D2, i-k). Esto explica nuestra observación de que la conversión génica de tramo corto con el sistema DR-GFP se reduce al inhibir la nedilación (Figura R28). De acuerdo con esto, se ha mostrado que la depleción de RNF111 y UBE2M reduce la conversión génica en el sistema DR-GFP a pesar del aumento posterior de la formación de los focos de RAD51 (Ma et al. 2013; Cukras et al. 2014). Entonces, la hiper-resección causada por la pérdida de la nedilación reduciría no sólo el NHEJ sino la conversión génica de tramo corto, y cambiaría el perfil de reparación hacia rutas que son favorecidas por la resección de tramo largo como el SSA (Figura D2, l). Adicionalmente, la reparación por BIR podría ocurrir independientemente de la extensión del ADN reseccionado (Figura D2, d y m). En cualquier caso, la hiper-resección favorece las rutas de recombinación mutagénicas y podría potencialmente conducir a deleciones y pérdida de heterociguidad.

En principio, esta limitación en la extensión del ADN reseccionado requerida para la conversión génica no se aplicaría en la recombinación entre cromátidas hermanas, ya que las moléculas aceptoras y donadoras son idénticas. De cualquier forma, incluso en este caso, la hiper-resección reduciría las oportunidades de que el ADN sintetizado recientemente diera alcance al extremo 5' reseccionado para formar una HJ (Prado & Aguilera 2003). Además, aumentaría la probabilidad de que secuencias repetidas queden expuestas y puedan ser sustrato de la recombinación por SSA. Entonces, una fuerte denedilación, tal y como ocurre con la adición de MLN4924 no bloquearía completamente la conversión génica cuando la cromátida hermana es usada como molde, pero sí que facilitaría la ruta del SSA mutagénica incluso en esta situación. Por tanto, proponemos que la nedilación controla la elección de la ruta de reparación para los DSB, es decir, no sólo la decisión entre NHEJ y HR sino también la elección entre las diferentes rutas de recombinación homóloga. Acorde con resultados previos y con nuestras observaciones, proponemos que una ola de nedilación y desnedeilación controla los tiempos de la resección del ADN, estableciendo una organización temporal entre los diferentes tipos de reparación (Figura D1).



**Figura D2. La extensión de la resección determina la reparación por homología de secuencia realizada.** Un corte de doble cadena que va a ser reparado por recombinación es resecado (a) antes de que el extremo 3'OH sobresaliente sea usado para invadir (b) una región homóloga (líneas rojas) localizada en otro lugar (líneas grises). Para sintetizar el ADN (líneas discontinuas) se usará el ADN homólogo como molde (c) y se podría continuar hasta el final del cromosoma (d; BIR), el nuevo ADN sintetizado puede realinear (e; SDSA) o puede ser ligado con el ADN resecado para formar dos estructuras de Holliday (f; DSBR). Dependiendo de cómo estas estructuras sean resueltas, la recombinación conducirá o no a la formación de entrecruzamientos (g). De cualquier forma, la hiper-resección (a la derecha) podría conducir a la exposición de regiones de ADN de cadena sencilla muy largas (h; negro versus líneas grises). En tal escenario, aunque la invasión del ADN (i) y la síntesis de ADN (j-k) podrían ocurrir, un ADN no homólogo sería empleado como molde para la síntesis de ADN (k; líneas discontinuas grises). Entonces, el ADN sintetizado de *novo* no podría hacer un realineamiento más largo con el ADN aceptor (línea negra sólida), bloqueando de manera efectiva el SDSA y la formación de los HJ. Si existen secuencias repetidas localizadas en las proximidades de la rotura (líneas verdes), el corte puede ser sellado usando una ruta adicional de recombinación como es el SSA (l). Otra alternativa sería que la síntesis de ADN continúe hasta el final del cromosoma (m; BIR).

Esta relación entre nedilación y reparación de los DSB puede explicar la potente actividad anticancer mostrada por el MLN4924 en estudios pre-clínicos (Soucy et al. 2009). Además, considerando que la HR es defectiva en muchos tumores humanos, podríamos especular que el MLN4924 sería especialmente exitoso en el tratamientos de esos cánceres. En ellos, el MLN4924 canalizaría las roturas endógenas del ADN hacia una perjudicada HR. Entonces, pensamos que los tumores deficientes en HR serían hipersensibles a MLN4924. Por otra parte, esto no se aplicaría en aquellos cánceres cuyas células son defectuosas en los pasos de la HR que tienen lugar durante la resección del ADN. De hecho, nuestros datos sugieren que las

células que tienen perjudicada la resección del ADN, tales como las deplecionadas con CtIP, podrían ser resistentes a tratamientos con MLN4924 (Figura R17A). Interesantemente, se ha observado una reducción en la toxicidad del MLN4924 cuando otras proteínas implicadas en la resección del ADN como BLM o BRCA1 son deplecionadas (Blank et al. 2013; Liao et al. 2011). Además, nuestros datos sugieren que en fondos deficientes en resección el MLN4924 protege a las células de la irradiación (Figura R17B). Entonces, postulamos que los tratamientos con MLN4924 en tumores con cantidades reducidas de proteínas implicadas en resección como CtIP o BRCA1 reducirían la eficacia de la radioterapia. Como se conoce que ambas proteínas están disminuidas en ciertos tumores (Narod & Foulkes 2004; Soria-Bretones et al. 2013), sería importante conocer la contribución genética de los diferentes genes de recombinación para cada tumor específicamente y así poder evaluar el efecto potencial del MLN4924 como droga anticáncer.



## CONCLUSIONES





1. Los sistemas de reparación SSR permiten analizar desequilibrios en el balance NHEJ/HR. Por tanto, son herramientas que permiten encontrar y caracterizar nuevos factores implicados en la regulación de las rutas de reparación de los DSBs.
2. Se estableció el flujo de trabajo para el escrutinio de una librería de esiRNAs y el sistema SSR mediante un sistema automatizado con el robot Microlab Star de Hamilton.
3. La nedilación inhibe la resección del ADN mediada por CtIP y, por tanto la recombinación homóloga. Dicha nedilación depende de las actividades de RNF111 y UBE2M.
4. El tratamiento con el inhibidor de la nedilación MLN4924 causa letalidad celular debido a un fenotipo de hiper-resección, que puede suavizarse con una reducción en los niveles de CtIP.
5. La formación de un complejo CtIP y BRCA1 está modulada por su interacción con proteínas nediladas y depende de UBE2M/RNF111.
6. Las denedilasas COP9 signalosoma y NEDP1 son necesarias para la resección del ADN y modulan al equilibrio entre NHEJ y recombinación homóloga.
7. La regulación de la nedilación/denedilación está implicada en la elección del tipo de ruta de reparación de los cortes de doble cadena. Esto ocurre no sólo a nivel de la decisión entre la NHEJ y la recombinación homóloga, sino que controla la prevalencia de los diferentes subtipos de recombinación.



## MATERIALES Y MÉTODOS



# 1. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

## 1.1 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron U2OS (osteosarcoma humano), 293T (embrionaria humana de riñón) y derivadas de las mismas (Tabla M1). En todos los casos fueron cultivadas en medio DMEM (D6546, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (F7524, Sigma), 2 mM de L-glutamina (25030024, Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml streptomycin (15140122, Gibco), e incubadas en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C de temperatura.

Las líneas derivadas de la U2OS que expresan diferentes sistemas para analizar la reparación de los cortes de doble cadena *in vivo*, se cultivaron en las mismas condiciones indicadas anteriormente más 0,5 mg/ml de G-418 (A1720, Sigma), para los sistemas SSR1.0 y SSR2.0 o de 1 µg/ml de puromicina (P8833, Sigma) para los sistemas DRGFP, SAGFP y EJ5 (Tabla M1).

Además, mediante la infección con partículas lentivirales se crearon líneas derivadas de la U2OS que expresan shRNAs para diferentes genes (Tabla M2). Dichas líneas se cultivaron en el mismo medio indicado usando como selección puromicina (1 µg/ml). Para ello, se plaquearon 20.000 células/pocillo en placas de 24-pocillos con 2 ml de medio. A las 24 horas, se cambió el medio por 500 µl de medio con hexadimetrina (8 µg/ml) y procedió a añadir 10 µl partículas lentivirales de cada tipo en cada pocillo. También se añadieron como control, partículas lentivirales que contenían el mismo plásmido con una secuencia de shRNA control (sin diana conocida). A las 24 horas se cambió el medio. Después de 24 horas más, las células se pasaron a una placa de 6-pocillos y se añadió en el medio el antibiótico de selección. A las 48 horas las células se utilizaron para realizar los ensayos correspondientes o se recogieron para su conservación en nitrógeno líquido. También se añadieron como control, partículas lentivirales que contenían el mismo plásmido con una secuencia de shRNA control (sin diana conocida). A las 24 horas se cambió el medio. A las 24 horas las células se pasaron a una placa de 6-pocillos y se añadió en el medio el antibiótico de selección.

Línea Celular	Características	Resistencias	Referencia
U2OS	Línea de osteosarcoma humano	Ninguna	ATCC HTB-96
293T	Embrionaria de riñón humano	Neomicina Kanamicina	ATCC CRL-11268
U2OS-SSR1.0	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema SSR1.0 (Balance HR/NHEJ)	G-418 Kanamicina	Generada en nuestro laboratorio por el Dr. Gómez-Cabello (Gomez-Cabello, Jimeno et al. 2013)
U2OS-SSR2.0	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema SSR2.0 (Balance HR/NHEJ)	G-418 Kanamicina	Generada en nuestro laboratorio por el Dr. Daniel Gómez-Cabello (Gomez-Cabello, Jimeno et al. 2013)
U2OS-DRGFP	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema DR-GFP (Conversion Génica)	Puromicina Ampicilina	Cedida por Dra. María Jasin (Pierce et al. 1999)
U2OS-SAGFP	Línea de U2OS que lleva integrado el sistema SAGFP (Qvist, Huertas et al.)	Puromicina Ampicilina	Generada en nuestro laboratorio por Ana López-Saavedra a partir 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 a partir del plásmido pimEJ5GFP (Addgene 44026)

**Tabla M1. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.**

A las 48 horas las células se utilizaron para realizar los ensayos de correspondientes o se recogieron para su conservación en nitrógeno líquido.

### 1.1.1. Subcultivado

Las células fueron plaqueadas en diferentes formatos de placa (6-pocillos, 24-pocillos, 96-pocillos, 6 cm, 10 cm y 15 cm) y dependiendo del ensayo, el nº del que se partía oscilaba entre 4000-250.000 indicándose en cada caso. Para cuantificar el número de células, se empleó un contador celular automático (Cell Counter Z2 de Beckman Coulter). Los pases se realizaban según las necesidades experimentales o cada dos días de crecimiento para el mantenimiento de los cultivos.

Gen diana	Descripción	Comercial	Referencia
Scramble	pLKO.1-puro shRNA sin diana conocida (Plásmido control)	Sigma	SHC016
CtIP (RBBP8)	TRCN0000005403	Sigma	NM_0022894.1-3008s1c1
DNAPKcs	TRCN0000006255	Sigma	NM_006904.6- 12460S1C1
Ku70	TRCN0000009846	Sigma	NM_001469.X2578S1C1
Ku80	TRCN0000010467	Sigma	NM_021141.X-1707S1C1
LIG4	TRCN0000009847	Sigma	NM_002312.X-1633S1C1
MRE11A	TRCN0000039872	Sigma	NM_005591.2-598s1c1
BLM	TRCN0000004906	Sigma	NM_000057.1-3578s1c1
EXO1	TRCN0000010331	Sigma	NM_130398.x-2736s1c1
RAD51	TRCN0000018877	Sigma	NM_002875.2-1224s1c1
ATM	TRCN0000010299	Sigma	NM_000051.x-9530s1c1
ATR	TRCN0000010300	Sigma	NM_001184.x-1254s1c1
BRCA1	TRCN0000009823	Sigma	NM_007294.x-7048s1c1
PIAS1	TRCN0000010853	Sigma	NM_016166.x-1699s1c1
PIAS4	TRCN0000004118	Sigma	NM_015897.x-467s1c1
RNF168	TRCN0000034136	Sigma	NM_152617.2-757s1c1
RNF8	TRCN0000003438	Sigma	NM_003958.x-1079s1c1
UBC13	TRCN0000007213	Sigma	NM_003348.3-2012s1c1
UBC9	TRCN00000320374	Sigma	NM_003345.3-373s21c1
HDAC1	TRCN0000004814	Sigma	NM_004964.2-1717s1c1
HDAC2	TRCN0000004819	Sigma	NM_001527.1-1678s1c1
PARP3	TRCN0000052983	Sigma	NM_001003931.1- 2109s1c1

**Tabla M2. shRNAs utilizados en esta tesis.**

Para pasar las células de una placa a otra, se empleó tripsina al 0,25% (T4049, Sigma) en una proporción 1/10 del volumen final de la placa y se neutralizó con 9/10 de volumen de medio completo.

### 1.1.2. Crioconservación

Para la conservación de las células, un mínimo de  $10^6$  células/ml fueron tripsinizadas y centrifugadas a 500g durante 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas en 1 ml de solución de congelación (suero fetal bovino y DMSO al 10%), se realizaron alícuotas en tubos y se depositaban en contenedores MrFrosty (C1562, Sigma). Los contenedores se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (este sistema permite el descenso gradual de la temperatura  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ) lo que permitió una congelación óptima de los cultivos para su almacenamiento durante largos periodos de tiempo. Finalmente los viales se trasladaron a tanques con nitrógeno líquido para la conservación a largo plazo.

Los viales de células congelados se descongelaron en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ , e inmediatamente tras su descongelación se añadieron 10 ml de medio de cultivo completo para diluir el DMSO. Tras su centrifugación se pasaron a una placa con medio nuevo.

### 1.1.3. Cultivo en presencia de inhibidores

Se realizaron una serie de ensayos en la línea U2OS con el sistema SSR2.0 para analizar una minilibrería de inhibidores en las condiciones que se reflejan en la Tabla M3. Todos los inhibidores fueron preparados en DMSO.

## 1.2. TRANSFECCIÓN

### 1.2.1. siRNAs

Se procedió a silenciar diversos genes objeto de estudio para lo cual, se empleó el sistema de silenciamiento génico mediante siRNAs y el reactivo de transfección Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, 13778). El listado de los siRNA utilizados aparece en la Tabla M4.



Inhibidor	Diana	Concentración	Marca	Referencia
Tricostatina A (TSA)	Deacetilasas de histonas I y II	1.3 mM	Sigma	T8552
Afidicolina	ADN polimerasas A y D	1 mM	Sigma	A0781
MLN4924	NAE	1 mM	Vitro	I-502-01M
Mirina	Mre11	25 mM	Tocris	3190
PARPi	PARP	1 mM	AstraZeneca	Olaparib
NAM	PARP-1	25 mM	Sigma	N0636

**Tabla M3. Información sobre los inhibidores que componen la minilibrería de compuestos químicos con potencial terapéutico utilizados en esta tesis.**

Para transfectar se emplearon diferentes volúmenes para placas de 96-pocillos, 6 cm o 10 cm de diámetro, según las necesidades experimentales. En el caso concreto de la placa de 6 cm, el día anterior a la transfección se sembraron 250.000 células en 3 ml de medio DMEM completo. Al día siguiente se procedió a cambiar el medio y se añadieron 2 ml de medio DMEM completo sin los antibióticos. Se prepararon 150  $\mu$ l de Opti-MEM (Gibco, 31985-062) y 9  $\mu$ l de lipofectamina. Por otro lado, se prepararon 150  $\mu$ l de Opti-MEM y 9  $\mu$ l de siRNA (10  $\mu$ M). Se procedió a mezclar 150  $\mu$ l de cada tubo para la formación de los complejos siRNA-lipofectamina y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se mezcló una vez por pipeteo y se añadió 250  $\mu$ l de la mezcla sobre la placa gota a gota, y la placa se mantuvo en agitación para conseguir una distribución homogénea y minimizar la toxicidad de la lipofectamina. Los cultivos se incubaron durante 6 horas en el incubador tras lo cual se retiró el medio de cultivo que contenía la solución de transfección y se añadió 3 ml de medio DMEM completo. Las células se recogieron a las 24 o 48 horas de la transfección.

Gen diana	Descripción	Comercial	Referencia
Control	ON-Targetplus Non-targeting pool	Dharmacon	D-001810-10
GFP	esiRNA1	Sigma	EHUEGFP
RNF111-1	GCGCUUCCAUAACAAUUC	Dharmacon	J-007002-07
RNF111-2	GAGUUGAGAUGAUUAAUAG	Dharmacon	J-007002-07
hUBE2M-1	CAGAGGUCCUGCAGAACAA	Sigma	(Ma et al. 2013)
hUBE2M-2	GGGCUUCUACAAGAGUGGGAAGUUU	Sigma	(Cukras et al. 2014)
CSN1	On-Targetplus Human Smartpool	Dharmacon	L-012272-00
CSN5	ACUGUCUUUCAGGUAAGUACUUCUCA	Sigma	Yosef Shiloh
NEDP1	ON-Targetplus Human SENP8	Dharmacon	L-004071-00
CtIP	GCUAAAACAGGAACGAAUC	Sigma	(Huertas & Jackson 2009)
CUL4A	On-Targetplus Human Smartpool	Dharmacon	L-012610-00

**Tabla M4.** siRNAs utilizados en esta tesis.

### 1.2.2 ADN plasmídico

Los plásmidos usados en esta tesis se describen en la Tabla M5.

Se utilizaron dos métodos de transfección diferentes:

#### 1.2.2.1. Fugene

Las células U2OS fueron transfectadas con los plásmidos necesarios en cada caso. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células en una placa de 100 mm y se incubaron 24 horas. Se realizó una mezcla de 336  $\mu$ l de OptiMEM (Gibco, 11058-021) con 7,2  $\mu$ g de ADN, al que posteriormente se le añadió 21  $\mu$ l de Fugene HD Transfection Reagent (Promega, E2312). Se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla se añadió gota a gota sobre el medio con las células mientras la placa era agitada suavemente para conseguir una distribución homogénea y minimizar el efecto tóxico del reactivo de transfección.

Plásmido	Características	Resistencias	Referencia
pVSVG	Expresión proteínas envuelta viral	Ampicilina	Cedido por el Dr. Felipe Cortés
p8.91	Expresión proteínas cápsida	Ampicilina	Cedido por el Dr. Felipe Cortés
pRRLEF1aHA.NL S.SceOPT.T2A.Ta gBFP (pBFP- ISceI)	Expresión la proteína azul fluorescente y la enzima de restricción I-SceI	Ampicilina	Cedido por el Dr. Andrew M. Scharenberg
HA-pcDNA3.1(-)	Expresión del antígeno HA	Ampicilina	Cedido por el Dr. Steve Jackson
HA-NEDD8	Expresión del gen Nedd8 con el antígeno HA	Ampicilina	Addgene 18711

**Tabla M5. Plásmidos utilizados en esta tesis.**

#### 1.2.2.2. Fosfato Cálcico

Se sembraron  $2,7 \times 10^6$  células de la línea 293T en placas de 100 mm veinticuatro horas antes de la transfección. Las células debían tener una confluencia del 40-50% en el momento de la transfección. El medio de cultivo se renovó 30 minutos antes de comenzar la transfección. Se preparó una mezcla con tres plásmidos (Tabla M5, el vector de interés (pBFP-ISceI), el vector con los genes de la cápsida del virus (p8.91) y el vector con los genes de la envuelta del virus (pVSVG) en un ratio 3:2:1 respectivamente y hasta tener 30  $\mu\text{g}$  de ADN total. Se añadió 64  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  y se completó el volumen hasta 500  $\mu\text{l}$  con agua milliQ. Por otro lado, se prepararon tubos de 15 ml con 500  $\mu\text{l}$  de una solución 2XHBS (Tampón Hepes Salino, Sigma 51558). El resto del procedimiento se realizó en la sala de cultivos P2. Se añadió la mezcla de los plásmidos y el  $\text{CaCl}_2$  gota a gota sobre la solución 2XHBS mientras se burbujeaba. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El precipitado que apareció se resuspendió con golpes suaves y se fue añadiendo a las células gota a gota mientras la placa se mantenía en agitación, así la mezcla de transfección se distribuyó de manera homogénea. Los cultivos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en la sala de cultivos P2 hasta el día siguiente. Se procedió a lavar las células con 10 ml de PBS y a añadir 8 ml de medio nuevo. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

### 1.3. PRODUCCIÓN Y TRANSDUCCIÓN VIRAL

Para introducir un corte de doble cadena en el ADN y realizar diferentes ensayos de reparación *in vivo* se utilizó el plásmido pRRLEF1aHA.NLS.SceOPT.T2A.TagBFP (Tabla M4), en adelante pBFP-I-SceI, que sirve para expresar la enzima de restricción I-SceI y la proteína fluorescente azul (BFP). Para ello, se produjeron partículas lentivirales que llevaban el mencionado plásmido mediante la cotransfección en células 293T con los plásmidos pVSVG (para la envuelta) y p8.91 (para la cápsida viral). Estas células tienen una alta capacidad para producir elevados títulos (nº unidades infectivas/ml) y alta transfectabilidad. Se caracterizan por tener una baja adherencia y para mejorar su eficiencia en la producción viral deben ser cultivadas como mínimo una semana antes de su uso.

Los plásmidos fueron transfectados como se describe el apartado 1.2.3 (Transfección con Fosfato Cálcico). Después de incubar las células 293T durante 48 horas, se procedió a recoger los virus presentes en el medio de cultivo mediante ultracentrifugación (Avanti 301 Rotor JS 24-15). Para ello, se recogió el medio de cultivo con jeringas y se procedió a filtrarlo con filtros de PVDF de 0,45 µm. Las muestras se centrifugaron a 22.000 rpm durante 1.5 horas a 4°C, tras lo cual se procedió a retirar el sobrenadante y a resuspender el pellet (no visible) en 500 µl de DMEM por placa de 100 mm. Se realizaron alícuotas de 50, 100, 200 y 500 µl. Se conservaron hasta su empleo a -80°C.

Se realizaron dos protocolos de transducciones diferentes según las necesidades experimentales:

#### 1.3.1. Transducción en dos pasos

Las células fueron sembradas 24 horas antes de la transducción. El día de la transducción se preparó una mezcla de medio DMEM con hexadimetrina a 8 µg/ml, en 1/3 del volumen final, y partículas lentivirales a una MOI (*Multiplicity of Infection*; ver titulación lentiviral 1.6.2) de 5 o 10 (según los ensayos). Es decir, se utilizaron 5 o 10 veces el número de partículas necesarias para infectar el 100% de las células utilizadas. A las 6 horas de incubación se

completó el volumen final con medio DMEM completo. Al día siguiente se procedió a realizar un lavado con PBS y a añadir medio nuevo.

### 1.3.2. Transducción en un paso

Las células fueron sembradas 24 horas antes de la transducción. El día de las transducción se preparó una mezcla de medio DMEM con partículas lentivirales a una MOI de 5 o 10 (según los ensayos) y hexadimetrina a 4 µg/ml, se añadió el volumen total de esta mezcla y se incubó toda la noche. Al día siguiente se procedió a realizar un lavado con PBS y a añadir medio nuevo.

## 1.4. ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR (CLONOGÉNICOS)

Se realizaron dos tipos de tratamiento (agudo o crónico) para el estudio de la supervivencia celular. Para ambos, se sembraron las células U2OS que expresaban un shRNA de CtIP y células que expresaban un shRNA control (shScr) en placas de 6 pocillos a razón de 500 y 1000 células por triplicado. Al día siguiente, en el ensayo de tratamiento agudo se preincubaron durante 1 hora con MLN4924 (0.2 µM) o con DMSO antes de irradiar con 2 Gy, a continuación se incubaron durante 2 horas más en presencia del inhibidor. Posteriormente, se cambió el medio y se mantuvieron en medio normal sin inhibidores durante 12 días. En el tratamiento crónico, las células que expresaban un shRNA de CtIP o shRNA control fueron tratadas durante 12 días con 0,1 µM de MLN4924 o bien con DMSO.

Tras la formación de las colonias, se procedió a su visualización mediante una tinción con cristal violeta. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se tiñeron las células con una solución de cristal violeta al 0,5% y etanol al 20%. Cuando las colonias se habían teñido, la solución de cristal violeta fue retirada y se realizaron varios lavados con agua destilada.

Cuando las placas estuvieron secas, se contaron las colonias de los tratamientos con MLN4924 y se referenciaron a los tratamientos con DMSO (100%). Para cada ensayo se hicieron tres réplicas.

## 1.5. CITOMETRÍA DE FLUJO

### 1.5.1. Análisis del Ciclo Celular

Se sembraron 50.000 células de U2OS en placas de 12 pocillos en medio de cultivo normal. Tras ser sometidas a los tratamientos experimentales necesarios, las células fueron recogidas por tratamiento con tripsina (Sigma, T4049). Las muestras se centrifugaron a 500g durante 5 minutos y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS frío y se fijaron añadiendo 5 ml de etanol al 70% gota a gota agitando suavemente el tubo. Se incubaron durante al menos 2 horas a 4°C y a continuación se centrifugaron a 500g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en un volumen de 200  $\mu$ l de dicho tampón. Se procedió a tratar las muestras con RNasa A a 0,2 mg/ml (Sigma, R5503) y yoduro de propidio a 1  $\mu$ g/ml (P4864). Se incubaron a 37°C durante 15-30 minutos y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis. Se empleó un citómetro de flujo "BS FACSCalibur™ Flow Cytometer" (BD Biosciences, 342975) y el software "Cell Quest Pro".

### 1.5.2. Titulación de la producción lentiviral

Tras la producción lentiviral, se calculó la cantidad de virus producidos para lo cual se cultivaron 25.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Al día siguiente se realizó una dilución 1/10 del stock lentiviral en medio DMEM. Se preparó medio de cultivo DMEM completo con 8  $\mu$ g/ml de hexadimetrina (Sigma, H9268). Se retiró el medio anterior y se añadió 300  $\mu$ l de dicha mezcla a todos los pocillos. A continuación se añadieron 0, 5, 10 y 20  $\mu$ l de la dilución 1/10 del stock lentiviral. Se mezcló suavemente y se incubaron durante 6 horas, tras las cuáles se completó hasta un volumen de 1 ml con medio DMEM completo. Al día siguiente se realizó un lavado con PBS y se dejaron incubando hasta un total de 72 horas desde el día de la transducción. El análisis del número de células infectadas se cuantificó mediante citometría con el equipo FACS Aria (Shaheen, Faqeih et al.). Se contaron 10.000 eventos (células) y se cuantificó cuántas expresaban la proteína fluorescente azul (BFP).

El título (nº de unidades infectivas/ml) se calculó en base al número de partículas infectivas en el rango de 25-50% azules.

### 1.5.3. Análisis de proteínas fluorescentes por FACs

Se sembraron 50.000 células en cada pocillo. Al día siguiente, las células fueron infectadas con partículas lentivirales que contenían el plásmido pBFP-*I*Scel el cual expresaba la proteína azul fluorescente y la enzima de restricción *I*-Scel (BFP-*I*Scel). La infección se realizó a una MOI 5 y hexadimetrina a 8 µg/ml tal como se describe en los apartados 1.3.1 y 1.3.2.

Para los experimentos con los diferentes inhibidores se empleó como control el DMSO que fue el vehículo de los mismos. En los ensayos con los diferentes shRNAs, el control fue un shRNA sin diana conocida (scramble). Después de 16-18 horas de la infección, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas, neutralizadas con medio DMEM completo y centrifugadas en tubos para citometría a 500g. Se realizó un lavado con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron, se realizaron dos lavados con PBS y finalmente, se resuspendieron en 100-200 µl de PBS para su análisis mediante citometría en un equipo BD FACSAria. Los datos fueron recogidos y analizados mediante el software FACSDiva v5.0.3. Se consideraron 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 contabilizaron 10.000 eventos azules (células que expresaban la proteína BFP) y se cuantificó el número de células fluorescentes verdes y rojas del total de células positivas para la fluorescencia azul. Se realizaron duplicados de cada condición experimental y se realizaron triplicados de cada experimento.

### 1.6. ENSAYOS DE REPARACIÓN *IN VIVO*

Se emplearon varios sistemas con construcciones genéticas diferentes para tratar de identificar el tipo de mecanismo de reparación implicado según la condición experimental. Los sistemas SSR1.0 y SSR2.0 fueron utilizados con diferentes inhibidores y también realizando silenciamientos génicos para su

caracterización y para el estudio del efecto en reparación de genes de interés. Además, se emplearon los sistemas DR-GFP, SAGFP (Stark et al. 2004) y EJ5 (Bennardo et al. 2009) para estudiar el papel del inhibidor MLN4924 sobre los diferentes mecanismos de reparación. Un esquema de los Sistema de Reparación empleados en esta tesis aparece en la Figura M1.

### 1.6.1. Descripción de los Sistemas de Reparación *in vivo*

En los sistemas SSR1.0 y SSR2.0, el gen de la GFP está flanqueado por dos repeticiones directas truncadas del gen de la RFP, las cuales comparten 302 pb de homología en sus secuencias. Una diana de la enzima de restricción I-SceI en el sistema SSR1.0 y dos dianas en orientación opuesta en el sistema SSR2.0 se ubican a continuación del extremo 3' de la GFP. En el sistema con un único sitio, el corte de la enzima I-SceI genera un extremo 3' libre religable de manera sencilla por NHEJ regenerando el sitio diana de la I-SceI, el cuál puede ser cortado de nuevo por la enzima. Este ciclo se puede repetir hasta que la secuencia diana de la enzima desaparezca ya sea por reparación dependiente de homología o por unión mutagénica de los extremos. La versión del sistema con dos sitios de corte para la enzima I-SceI, uno al lado del otro y con orientación inversa, es el sistema SSR2.0. El sitio diana para la I-SceI no es palindrómico, y una vez reparadas las dos secuencias invertidas, la secuencia diana para la endonucleasa se destruye. La reparación por NHEJ permite que las células continúen expresando la GFP (las células fluorescen en verde), mientras que la reparación por recombinación homóloga, conlleva la delección del gen de la GFP y la generación de una copia del gen de la RFP activa por lo que las células fluorescen en rojo.

El sistema DR-GFP se compone de dos repeticiones directas (DR) mutadas del gen de la GFP y separadas 3,7 kb por un marcador de selección, el gen de la puomicina N-acetiltransferasa. Uno de los genes de GFP, SceGFP, contiene una secuencia para el sitio de reconocimiento de la endonucleasa I-SceI (18 pb), que durante su clonación generó un cambio de la fase de lectura dando dos codones de parada y finalizando así la traducción. Cuando la enzima de restricción se expresa *in vivo*, en el gen 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

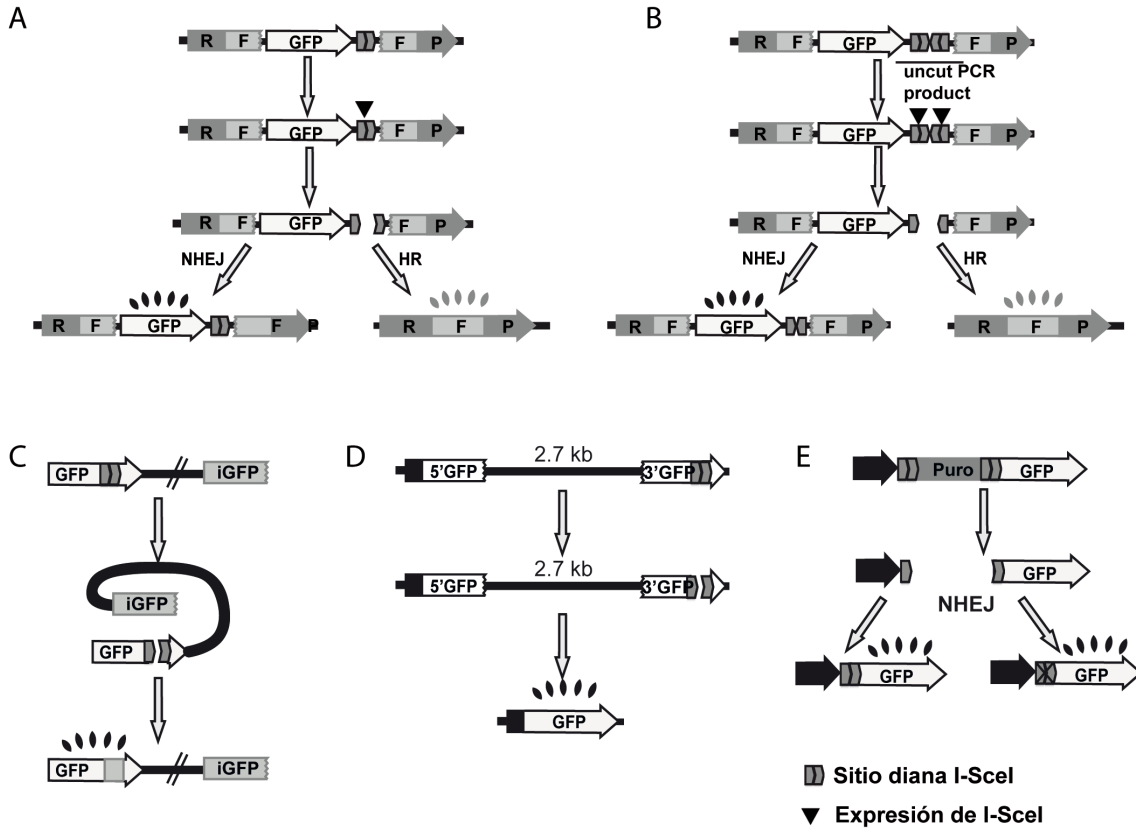


Figura M1. Representación gráfica de los Sistemas de Reparación *in vivo* utilizados en esta tesis. A, Sistema SSR1.0 (SeeSaw Reporter 1.0). B, Sistema SSR2.0 (SeeSaw Reporter 2.0). C, Sistema DRGFP (Direct-repeat GFP). D, Sistema SA-GFP. E, Sistema EJ5.

productos de recombinación: una conversión génica de tramo corto sin entrecruzamiento dentro de la región homóloga (STGC) o una deleción del producto. En ambos casos, la secuencia iGFP actúa como donador de información. La deleción 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 (Qvist et al. 2011) 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 deleción por el que se mantiene sólo el extremo 5' de la GFP codifican una proteína carboxilo terminal truncada.

El sistema SA-GFP consiste en dos fragmentos del gen GFP, el 5'GFP y el SceGFP3', 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 deletiona 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.

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 las 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.

### **1.6.2 Ensayos de Reparación con el sistema SSR.**

#### **1.6.2.1 Con inhibidores**

Se sembraron 50.000 células de la línea celular U2OS-SSR2.0 que llevaba el sistema SSR2.0 integrado. Al día siguiente se procedió a la infección con lentivirus que contenían una construcción que expresaba la meganucleasa I-SceI y la proteína BFP para el seguimiento de la expresión de la I-SceI (Tabla M4) tal como se describe en el apartado 1.3.1. Además se modificó el último paso del protocolo al completar el volumen final con el medio de cultivo al que se le había añadido la cantidad correspondiente de cada inhibidor para los ensayos y para el control idéntico volumen de DMSO. Las concentraciones empleadas en los diferentes ensayos se detallan en la Tabla M3. Al día siguiente, se realizó un lavado con PBS y se dejaron en medio DMEM

completo 24 horas más. Las células se tripsinizaron y se trataron para su análisis por citometría como se describe en el apartado 1.5.3. Para calcular el ratio entre la reparación dependiente de homología y la reparación independiente de homología (NHEJ) se tuvieron en cuenta las células que expresaban BFP y se procedió a dividir el número de células que expresaban GFP (verdes) entre las que expresaban RFP (rojas). Para eliminar los eventos previos a la expresión de la I-SceI que pudieran dar la expresión de RFP, se llevaron en paralelo experimentos sin infección lentiviral con I-SceI. El ratio NHEJ/HR de los experimentos con líneas infectadas con I-SceI se normalizó con el mismo ratio de las células no infectadas. Con los datos obtenidos se calculó el cambio en el ratio entre NHEJ/HR normalizado mediante las muestras tratadas con DMSO.

#### 1.6.2.2. shRNAs

Las líneas que llevaban integrados los sistemas SSR1.0 y SSR2.0 (Tabla M1) fueron transducidas mediante partículas lentivirales que contenían los diferentes shRNA (Tabla M2) según el protocolo previamente descrito en el apartado 1.4.1. Se emplearon 20.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. A las 48 horas de la infección se añadió puromicina como medio de selección y se sembraron en una placa de 6 pocillos. Se incubaron 72 horas. Las células fueron tripsinizadas y tratadas para su análisis por citometría como se describe en el apartado 1.6.3. El resto de células se conservaron en nitrógeno líquido como se describe en el apartado 1.1. El ratio NHEJ/HR se calculó normalizando los resultados obtenidos en células infectadas con I-SceI frente a sus controles sin infectar como se describe en el apartado anterior. De igual modo, los resultados para cada shRNA se normalizaron con el shRNA control.

En el caso del shRNA para CtIP, también se realizaron ensayos en los que se trató con el inhibidor MLN4924 a las concentraciones de 0.05, 0.2 y 1 mM, siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 1.6.2.1.

#### 1.6.2.3 siRNAs

Se realizaron ensayos con diferentes siRNAs sobre la línea celular U2OS-SSR2.0. Se emplearon placas de 96 pocillos negras para su lectura en el

microscopio de alto rendimiento ImageXpress (Molecular Devices). En este formato, se sembraron 4000 células por pocillo, al día siguiente se llevó a cabo el protocolo de transfección como se describe en el apartado 1.2.2. A las 24 horas de la transfección se realizó la transducción con partículas lentivirales que contenía la construcción BFP::I-SceI como se describe en el apartado 1.3.2. Al día siguiente, se realizó un lavado con PBS y se mantuvo en incubación 24 horas más. Las células fueron fijadas mediante PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas con PBS y los núcleos de las células fueron teñidos con una solución a 2 mg/ml en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Todo el proceso se realizó en oscuridad. Tras dos lavados con PBS las placas se conservaron selladas con parafilm en oscuridad a 4°C. Posteriormente, las placas se analizaron en el microscopio de alto rendimiento ImageXpress como se describe en el apartado 3.1.

### **1.6.3. Ensayos de Reparación con los Sistemas DR-GFP, EJ5 y SA-GFP en presencia de MLN4924**

Se sembraron 4000 células en placas de 96 pocillos negras. Al día siguiente, se llevó a cabo la transducción con partículas lentivirales que contenían la construcción BFP::I-SceI como se describe en el apartado 1.3.1. Además, se añadió el inhibidor en el último paso del protocolo al completar el volumen final con el medio de cultivo. A las 16 horas se realizó un lavado con PBS y se añadió medio nuevo. Finalmente, las células fueron fijadas con 4% de PFA y teñidas con una solución a 2 mg/ml de Hoechst 33258 a las 48 horas de haberse realizado la transducción. Todo el proceso se realizó en oscuridad. Se realizaron dos lavados con PBS y las placas se conservaron selladas con parafilm en oscuridad a 4°C hasta su visualización al microscopio de alto rendimiento ImageXpress como se describe en el apartado 3.1. La frecuencia de reparación fue calculada como el porcentaje de células que expresaban la BFP (azules) y que expresaban GFP (verdes) para el DR-GFP (conversión génica), SA-GFP (Qvist et al. 2011) y EJ5 (NHEJ). Para eliminar los eventos de reparación espontáneos previos a la infección con I-SceI, a esos datos se restó el valor obtenido en un experimento en paralelo sin infección con la nucleasa. Para facilitar la comparación entre experimentos, este valor fue normalizado

con un control tratado con DMSO. Se realizaron un mínimo de tres repeticiones de experimentos duplicados.

## 1.7. INDUCCIÓN DEL DAÑO CELULAR MEDIANTE IRRADIACIÓN

Para inducir el daño en las células se ha empleado un dispositivo irradiador emisor de rayos gamma, BIOBEAM GM 8000 (Gamma-Service Medical GmbH), basado en la exposición de las muestras a una fuente radioactiva encapsulada (Cs-137). Las células fueron irradiadas en placas de cultivo en medio de cultivo. El irradiador está ajustado de tal modo que la tasa de dosis en la superficie de la carcasa no sobrepasa 3  $\mu\text{Sv/h}$ . La dosis de irradiación que se utilizó fue de 10 Gy o 2 Gy según las necesidades experimentales.

Tras la irradiación, los cultivos fueron incubados durante 30 o 60 minutos según el experimento y sometidos a diferentes tratamientos según el ensayo a realizar.

## 2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1. MANIPULACIÓN DEL ADN

#### 2.1.1. Amplificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se amplificó en *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  competentes (producidas por el Servicio de Organismos Modelos del centro). Para ello, se transformaron por choque térmico. Brevemente, se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de células competentes con 50-100 ng de ADN y se incubaron en hielo 30 minutos. A continuación, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos, tras lo cual se añadió 1 ml de medio LB (Luria-Bertani) y se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación. Se recogieron por centrifugación y se sembraron en LB suplementado con el antibiótico de selección. El ADN fue purificado con el kit "Pure Yield Plasmid Maxiprep System" (A2392, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La

concentración del ADN en solución fue estimada por el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop) según la absorbancia a 260 nm.

### **2.1.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La electroforesis del ADN se realizó en geles de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X teñido con RedSafe (21141, Intron Biotechnology). A las muestras se les añadió tampón de carga (10X Loading buffer, Takara). La imagen fue visualizada mediante el software Quantity One (Bio-Rad).

### **2.1.3. Digestión del ADN con enzimas de restricción**

Para la digestión de fragmentos de ADN se usaron endonucleasas de restricción de la empresa Takara siguiendo las instrucciones del fabricante. Las digestiones se emplearon para comprobar por análisis de los fragmentos de restricción los plásmidos que aparecen en la Tabla M5. En concreto, para comprobar el plásmido BFP-IScel, se diseñó una digestión con la enzima *PvuII* que daba como resultado cinco fragmentos de ADN de 2574, 2518, 1576, 776 y 477 pares de bases.

## **2.2. ANÁLISIS DEL ARN**

### **2.3.1. Extracción de ARN**

Las células cultivadas en placas fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. Posteriormente centrifugadas a 500g durante 5 min. El pellet fue congelado a -80°C o directamente se procedió a la extracción mediante el kit RNeasy mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.3.2. Cuantificación de ARN total**

La concentración del ARN en solución fue estimada por el espectrofotómetro ND-100 (Nanodrop) según la absorbancia a 260 nm. Para visualizar la calidad del ARN, se realizaron geles de agarosa al 0,8% en tampón

TAE1X teñidos con RedSafe y se sometieron a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de longitud del gel.

### 2.3.3. Síntesis de cDNA

Para la obtención del cDNA a partir del ARN se utilizó el kit Quantitec Reverse Transcription Kit (Qiagen) y el sistema Super-Script™ First strand (Invitrogen) siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

### 2.3.4. PCR Cuantitativa

Para comparar el nivel de expresión de diversos ARN mensajeros, se realizaron PCRs cuantitativas en un equipo ABI 7500FAST. Se utilizó 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 cDNAs se encuentran en la Tabla M6.

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

## 2.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 2.3.1. Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Para la realización de la técnica se obtuvieron 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 había realizado dos lavados con PBS frío. Los extractos fueron recogidos mediante rascadores y, para romper la cromatina, fueron pasados al menos 10 veces por unas jeringas con aguja de 0,5x16 mm (BD Platipak).

Nombre Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Fw DNA-PKcs	CCGGACGGACCTACTACGACT
Rv DNA-PK	AGAACGACCTGGGCATCCT
Fw Ku70	CCTTTTGACATGAGCATCCA
Rw Ku70	ATACCGTGGCTCTTTCTGTT
Fw Ku80	CCTTTTGACATGAGCATCCA
Rw Ku80	AGCATGGTGGACATCTGCTTT
Fw LIG4	GCTGTGCTCTTCATCTAGACCCA
Rw LIG4	CTCGTTTAACTAGCTGGCCTCGG
human_CtIP_Q-PCR.Forward	AGAAATTGGCTTCCTGCTCAAG
human_CtIP_Q-PCR.Reverse	GAAAACCAACTTCCCAAAAATTCTC
Fw MRE11A	CGAAAGGGGTTGATTTTGAA
Rv MRE11A	CTTGCATGTTTCTCAGTGCC
Rv BLM	TGTTCTGGCTGAGTGACGTT
Fw BLM	AGTTTGGATCCTGGTTCCGT
Rv Exo1	AGGCTGGATGCTCACTTTGT
Fw Exo1	AGTGGTGCAGTTGTGGTTCC
Rv Rad51	TATCCAGGACATCACTGCCA
Fw Rad51	GGTGAAGGAAAGGCCATGTA
Rv ATM	TTCAAAGGATTCATGGTCCAG
Fw ATM	GCTGTGAGAAAACCATGGAA
Rv ATR	AACATTCGTGGCATTGACTG
Fw ATR	CCCATGGTCACAGACAACAA
Rv BRCA1	TGTGAAGGCCCTTTCTTCTG
Fw BRCA1	TCCCATCTGTCTGGAGTTGA
Rv RNF168	CCCCAGGTTTACTGAGCAGA
Fw RNF168	AACACTATCCCAGGGAGTGC
Rv RNF8	CTCGCACTACCTGGCAGTCT
Fw RNF8	TCAGAAGTGAAAGAACGACGAA
Rv UBC13	CTCTCATCTGGTTCGGCTTT
Fw UBC13	CTCGGGTTCTGACAAGATGG
Rv Pias1	CGCTGACTGTTGTCTGATGC
Fw Pias1	CAGCTCTTCACCCAGTCCAT
Rv Pias4	AAGCTTCTCGTTGTTCTGTGG
Fw Pias4	CAAGACCCTCAAGCCAGAAG
Rv UBC9	AAGGGTACACATTCGGGTGA
Fw UBC9	GTGGGAAGGAGGCTTGTTTA
Fw ActB	ACGAGGCCAGAGCAAGA
RV ActB	GACGATGCCGTGCTCGAT

**Tabla M6.** Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.



### 2.3.2. Extracción de proteínas en condiciones nativas

Las proteínas extraídas en condiciones nativas, se utilizaron en los protocolos de inmunoprecipitación de proteínas. Se preparó un tampón de lisis (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7.5 y 0,2% Tritón) con inhibidores de proteasa (11873580001, Roche), inhibidores de fosfatasas (P0044, Sigma) e inhibidor de proteasas de sumo N-Ethylmaleimide (NEM) a 3,125 mg/ml (34115, Calbiochem). Las células fueron recogidas desde una placa de 15 cm de diámetro al 50-70% de confluencia para impedir que estuvieran en G<sub>0</sub>. Se realizaron dos lavados de PBS frío y se retiró asegurándose de eliminar el mayor volumen de lavado y evitar la dilución del extracto. Se añadieron 150 µl de tampón de lisis con los inhibidores y las células se levantaron de la placa mediante rascadores. El extracto se pasó 10 veces por una jeringa con aguja de 0,5x16 mm (BD Platipak). Se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante.

### 2.3.3. Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop

La cuantificación de las proteínas se realizó con 1 µl de muestra mediante el espectrofotómetro ND-100 (Nanodrop), el cual daba el resultado de cuantificación en µg/µl directamente.

### 2.3.4. Cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford

Se partió de una solución de BSA (albúmina serobovina) a 1 mg/ml con la que se prepararon muestras con 0, 1, 2, 5, 10 y 20 µg de BSA en 100 µl de agua destilada y se añadieron 900 µl del reactivo Bradford (B6916, Sigma). De igual forma, se prepararon muestras con 3 µl de los extractos a cuantificar. La medición de la densidad óptica se llevó a cabo a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter). Con las muestras de cantidad conocida de BSA se realizó una recta de regresión para obtener una curva patrón que se utilizó para calcular la concentración de proteína en µg/µl de cada extracto.

### 2.3.6. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Para separar las proteínas por tamaño se utilizó el método de geles de SDS-poliacrilamida desarrollado por Laemmli. Los geles se prepararon con una solución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) a diferentes porcentajes según el tamaño de las proteínas a analizar. La zona de empaquetamiento se preparó 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 añadió APS a una concentración final de 0,1% y 0,04% (v/v) de TEMED. Las muestras se prepararon con tampón de carga 4X y en cada gel se cargaron 50-70 µg de proteína total, previamente hervidos a 100°C durante 5 minutos. Los geles se corrieron en un tampón 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS, a un voltaje constante de 200V en un sistema Mini-Protean TetraCell (Bio-Rad).

### 2.3.7. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Las proteínas separadas en geles de SDS-poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF de baja fluorescencia (Immobilon-FL, IPFL00010) previamente activada con metanol durante 5 minutos y equilibrada en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol) al menos 5 minutos. Se utilizó el sistema Mini Trans-Blot de Bio-Rad. La transferencia se realizó a 400 mA durante 1 hora a 4°C o bien, a 30 V durante toda la noche.

### 2.3.8. Inmunodetección de proteínas (Western blot)

La inmunodetección de proteínas se realizó utilizando el sistema Odyssey de Li-Cor para lo cual la membrana de PVDF se incubó con una solución de bloqueo comercial (Solución de Bloqueo para Odyssey, 927-40003) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos primarios (Tabla M7) se prepararon en la solución de bloqueo con 0,1% de Tween y se incubaron a 4°C en agitación toda la noche. (Cruz-Garcia, Lopez-Saavedra et al. 2014).

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1% y la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios (Tabla M8) diluidos en solución de bloqueo durante 40 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1%.

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

### 2.3.9. Inmunoprecipitación (IP) de proteínas

Las células U2OS se sembraron en una placa de 10 cm al 10-15% de confluencia para cada condición experimental. Al día siguiente, se realizó la transfección de diversos siRNAs (apartado 1.2.2) o bien, se trataron con 0,2  $\mu$ M de MLN4924 o DMSO durante 1 h. Según las necesidades experimentales, pasadas 24 horas, las células fueron recogidas y sembradas en una placa de 15 cm para evitar la confluencia de las células en el momento de la realización de los extractos de proteínas para la IP. En los experimentos en los que las células eran irradiadas con 10 Gy, la irradiación se efectuó a 0, 30 y 60 minutos antes de la realización de los extractos de proteínas. Se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS frío antes de recoger las células y extraer las proteínas. La extracción de proteínas en estado nativo se realizó como se describe en el apartado 2.3.3. La cuantificación de la concentración de proteínas de los diferentes extractos se realizó como se describe en el apartado 2.3.4.

Para las IPs, se utilizaron bolitas magnéticas Dynabead Protein A (70  $\mu$ l por ensayo, Novex for Life Technologies) previamente pre-equilibradas en 1 ml de tampón de lisis. Se incubaron en rotación durante 5 minutos a 4°C, tras lo cual se eliminó el sobrenadante mediante el uso de un rack magnético. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 ml de tampón de lisis y tras el último lavado, se resuspendieron en 70  $\mu$ l por muestra de tampón de lisis con inhibidores.

Se prepararon los extractos con 1 mg de proteína total a los que se añadieron 20  $\mu$ l de bolitas equilibradas. Se incubaron en rotación durante 1

hora a 4°C para eliminar as proteínas que interaccionaban de manera inespecífica con las bolitas (pre-clarado). Se recuperó el sobrenadante mediante el gradilla magnética, y se le añadió 10 µl de una mezcla 1:1 de dos anticuerpos anti-Brca1, 10 µl de un anticuerpo anti-Nedd8 o, como control para las interacciones inespecíficas, 1 µg de IgG (ratón y/o conejo según el caso; Tabla M7).

Proteína diana	Aplicación	Fuente	Referencia	Dilución
NEDD8	IP, WB	GeneTex	GTX61205	10 µl, 1:500
RNF111	WB	Abnova	H00054778-M05	1:5000
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
Tubulina	WB	Sigma	T9026	1:25.000
RPA32	IF	Abcam	ab2175	1:500
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	Grupo de Invest.	R. Baer	1:5000
CSN1	WB	Bethyl Laboratories	A300-26A	1:1000
CSN5	WB	Bethyl Laboratories	A300-014A	1:5000
UBE2M	WB	Bostom Biochem	A-655	1:500
CUL4A	WB	Grupo de Invest.	Thimo Kurz	1:3500

**Table 7. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.** IF, inmunofluorescencia. WB Western blotting. IP, Inmunoprecipitación

Las muestras se incubaron en rotación durante 30 minutos a 4°C. Se añadieron 50 µl de bolitas preequilibradas y se incubaron durante toda la noche a 4°C en

rotación. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con 1 ml tampón de lisis con inhibidores durante 5 minutos a 4°C con la ayuda de un gradilla magnética. Finalmente las bolitas se resuspendieron en 30  $\mu$ l de tampón de carga 4X (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,008% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. 50  $\mu$ g de los extractos de proteínas iniciales (input) y el total de los extractos resultantes de la IP fueron sometidos a electroforesis e inmunodetección como se describen en los apartados 2.3.5 y 2.3.7, respectivamente.

Anticuerpos	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

**Tabla M8. Anticuerpos Secundarios usados en esta tesis.** IF, Inmunofluorescencia, WB Western blotting.

### 3. TÉCNICAS DE MICROSCOPÍA

#### 3.1. INMUNOFLUORESCENCIA PARA FOCOS DE RPA Y $\gamma$ H2AX

Para detectar los focos de RPA y  $\gamma$  H2AX, se sembraron 200.000 células de U2OS en placas de 6 cm de diámetro en las que previamente se habían

depositado varias lamelas. El número de células sembradas se estimó para que al irradiar el cultivo no se encontrara confluyente. Si procedía, al día siguiente, se transfectaron las células como se describe en el apartado 1.2.2. Se incubaron 24 horas. Se realizó el tratamiento con radiación ionizante con una dosis de 10 Gy (ver apartado 1.7) y tras una hora de incubación, se realizaron dos lavados con PBS frío. Cuando el experimento lo requirió, 1 hora antes de la irradiación las células se trataron con MLN4924 o DMSO.

Para la detección de los focos fue necesario realizar un tratamiento de pre-extracción para eliminar la fracción de proteína no unida a cromatina. Las lamelas fueron cubiertas con 500  $\mu$ l de Tampón de pre-Extracción (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 3 mM  $MgCl_2$ , 300 mM sacarosa, 0,2% Tritón X-100) y se incubaron durante 5 minutos en hielo. Se realizó un lavado con PBS frío, se añadió PFA al 4%, para fijar las células y se incubó durante 15-20 minutos en frío. Se realizaron tres lavados con PBS. Se añadieron 500  $\mu$ l de una Solución de Bloqueo (5% suero fetal bovino y PBS) y se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió entre 20-30  $\mu$ l por lamela de los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo, anti-RPA (1:500) y anti  $\gamma$  H2AX (1:500). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en cámara húmeda con las lamelas hacia abajo en una superficie recubierta por parafilm y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las lamelas se ubicaron en una placa de 24 pocillos con las células hacia arriba y se realizaron tres lavados con PBS frío. Los anticuerpos secundarios, anti-ratón Alexa Fluor 594 (1:1000) para RPA y anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:1000) para  $\gamma$  H2AX, se prepararon en solución de bloqueo y se incubaron también en cámara húmeda durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Para terminar, se realizaron 3 lavados con PBS frío, un lavado con etanol 50%, un lavado con etanol 70% y un lavado con etanol 100% para deshidratar la muestra progresivamente. El montaje de la muestra se realizó con 4  $\mu$ l por lamela de una solución de Vectashield con Dapi (H-1200, Vector Laboratories) sobre portaobjetos. Se retiró el exceso de solución de montaje y se sellaron los bordes de los cristales con esmalte de uñas. Las muestras se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su observación.

Para visualizar las señales de fluorescencia de los focos de  $\gamma$  H2AX y RPA se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DM6000, con un objetivo

HCX PL APO 63x/1.4 húmedo. Las imágenes se obtuvieron y procesaron con el software LASAF.

### 3.2. INMUNOFLUORESCENCIA PARA FOCOS DE RIF1

Para detectar los focos de RIF1, las células se prepararon como se describe en el apartado anterior. Después de una hora de incubación tras la irradiación, se realizó un lavado con PBS a temperatura ambiente. Se retiraron las lamelas de las placas de cultivo y se pasaron a una placa de 12 pocillos. El resto del cultivo fue recogido y se realizó una extracción de proteínas como se describe en el apartado 2.3.1.

Se realizó un lavado de las lamelas con PBS y las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 2-3 lavados con PBS y se añadió una solución de Tritón X-100 al 0,25% en PBS para permeabilizar las células. Se incubaron en la solución de permeabilización durante 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron 2-3 lavados con PBS. Se añadió una solución de bloqueo (5% suero fetal bovino en PBS) y se incubó durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Las incubaciones con los anticuerpos primario anti-RIF1 (1:100), anticuerpo secundario anti-cabra Alexa Fluor 594 (1:1000) y el montaje de los cristales en portaobjetos para su visualización al microscopio, se realizaron como se ha descrito previamente en el apartado 3.1. para las inmunofluorescencias de RPA y  $\gamma$  H2AX, (ver Tablas 7 y 8).

Para la visualización de las imágenes, se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DM6000, con un objetivo HCX PL APO 63x/1.4 húmedo. Las imágenes se obtuvieron y procesaron con el software LASAF. La cuantificación de los focos de RIF1 se realizó mediante el software Metamorph utilizando el módulo *Granularity*. Se estableció una máscara para cuantificar los núcleos exclusivamente y se fijaron los valores para los parámetros *min with*, *max with* y *Intensity above local background*.

### 3.3. ESCRUTINIO MASIVO EN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES IMAGEXPRESS MICRO (MOLECULAR DEVICES) .

#### 3.3.1. Adquisición de imágenes en el microscopio IMAGEXPRESS

Este microscopio para escrutinios masivos forma parte de un sistema integrado (hardware y software) para la adquisición y análisis celular automatizado de imágenes para rastreo de alto contenido (*High Content Screening*). Permite la obtención de imágenes de muestras en placas multipocillos de varios formatos (16, 96, 384...), con diferentes canales fluorescentes (DAPI, GFP, Cy5, Texas Red, Rhodamina/TRITC, FURA-2 340x/387x) y diferentes objetivos (10x, 20x, 40x, 100x). Emplea una lámpara de xenón (340-708 nm). La adquisición de las imágenes se realizó a partir de cultivos en placas de 96 pocillos CellCarrier específicas para microscopia (6005550, PerkinElmer). El equipo fue calibrado para la lectura en este soporte quedando establecidos los parámetros para este tipo de placa. Las imágenes se tomaron con un objetivo 10X Plan Fluor 0.3 NA, *binning* 1 y ganancia 2. En la zona central de cada pocillo se establecieron 9 sitios de escaneo equidistantes distribuidos de manera uniforme, siendo el tamaño de la imagen 899,23x671,84  $\mu\text{m}$ . Se estableció una secuencia de adquisición de imágenes con dos longitudes de onda (azul y verde) para los sistemas DR-GFP, EJ5 y SA-GFP y con tres longitudes de onda (azul, verde y roja) para el sistema SSR. La combinación de filtros que se utilizó en el equipo fue DGTTxC5. El autofocus se realizó en base al láser y en base a la imagen en el fondo del pocillo y estableciéndose siempre en el centro de cada pocillo. Para la longitud de onda del azul (Hoechst 33258) el tiempo de exposición fue de 100 ms y el *z-offset* de la imagen 8.3. El tiempo de exposición para la longitud de onda verde (GFP) y para la roja (RFP) fueron 300 y 500 ms respectivamente. El *z-offset* para el verde fue de 8.26 y 8.32 para el rojo. El equipo escanea pocillo a pocillo los 9 sitios (s1-s9) en las 2-3 longitudes de ondas de manera secuencial. Las imágenes fueron almacenadas en la base de datos interna IXM137239 del sistema en el equipo conectado al microscopio.



### 3.3.2. Flujo de trabajo para el procesamiento y almacenaje de datos

La adquisición de las imágenes al microscopio a partir de placas de 96 pocillos conlleva la generación de un alto número de imágenes que va en función del número de sitios escaneados en cada pocillo y del número de longitudes de ondas en las que se escanea. Durante el escrutinio se emplearon 9 sitios de escaneo por pocillo y tres longitudes de onda resultando un total de 2.592 imágenes que ocupaban un espacio de 7,0 GB por placa. Teniendo en cuenta que el escrutinio se iba a realizar por triplicado sobre un total de 170 placas de la librería la memoria mínima que se necesitaba fue de 3,5 TB para almacenar todas las imágenes. Se adquirió un equipo de almacenamiento (servidor) en el que se fueron almacenando todas las imágenes. Para ello, se estableció un protocolo de exportación/importación de las imágenes utilizando las herramientas del propio software MetaXpress desde la base de datos incluida en el equipo conectado al microscopio hasta nuestro servidor y posterior importación a la base de datos instalada en nuestro equipo para así realizar el análisis y cuantificación de las imágenes. Además se llevó un registro de las placas escaneadas y del paso dentro del proceso en el que se encontraban.

### 3.3.3. Análisis de imágenes mediante el software MetaXpress

Este software basado en Metamorph, dispone de una gran variedad de módulos pre-diseñados y protocolos personalizados para diferentes aplicaciones que permiten el análisis automatizado de las imágenes. Tras la adquisición de las imágenes, éstas fueron procesadas mediante el módulo *Multi Wavelength Cell Scoring*, una herramienta flexible de segmentación para el análisis de hasta siete longitudes de onda,  $W$  (incluida una tinción nuclear). En la configuración de los ajustes para llevar a cabo la cuantificación se tienen en cuenta una serie de parámetros para cada una de las longitudes de onda empleadas. Así, se define lo que es célula, núcleo o citoplasma con una herramienta de medida y se establece la anchura mínima y máxima de estas estructuras. También, se establece el *Intensity above local background (ILB)*, un fondo de señal a partir del cuál se va a considerar positiva o negativa la

emisión de fluorescencia. Según el sistema de reparación *in vivo* ensayado, se establecieron valores para estos parámetros (Tabla M9). La longitud de onda para la cuantificación de los núcleos fue *W1*, la longitud de onda para señal azul de la proteína BFP fue *W2* y para las proteínas GFP y RFP fueron *W3* y *W4* respectivamente. Los sistemas DR-GFP, SA y EJ5 necesitaron *W1*, *W2* y *W3*, mientras que el sistema SSR2.0 necesitó para su análisis una cuarta longitud de onda (*W4*) para la detección de la fluorescencia en el rojo.

Una vez se realiza la cuantificación, el *software* permite la exportación a una tabla en formato Excel de los valores de cuantificación de diferentes parámetros que permite obtener el módulo de análisis. Exportamos sólo los valores de los parámetros relevantes para cada pocillo. Los utilizados fueron: el recuento del número total de células (*Total Cells*), el número medio absoluto de células positivas a la fluorescencia azul (*Positive W2*), el número medio absoluto de células positivas a la fluorescencia verde (*Positive W3*), y el número medio absoluto de células positivas a la fluorescencia roja (*Positive W4*).

		Longitudes de onda (W)			
		Todos los núcleos	BFP (W2)	GFP (W3)	RFP (W4)
DR-GFP	Anchura mín.	10	10	10	x
	Anchura máx.	50	50	50	x
	ILB	20	20	20	x
SA	Anchura mín.	10	10	10	x
	Anchura máx.	50	50	50	x
	ILB	100	100	20	x
EJ5	Anchura mín.	10	10	10	x
	Anchura máx.	36	36	36	x
	ILB	100	100	8	x
SSR2.0	Anchura mín.	5	5	5	5
	Anchura máx.	18	18	200	40
	ILB	150	150	15	25

Tabla M9. Valores para los parámetros de cuantificación del sistema SSR en el software MetaXpress

Se calculó el porcentaje de células verdes y de células rojas en base al número total de células, teniendo en cuenta que este valor hacía referencia al valor medio del número de células por pocillo, es decir, la media del número de células entre los 9 sitios escaneados dentro de un pocillo.

#### **4. AUTOMATIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO CELULAR MEDIANTE EL ROBOT MICROLAB STAR DE HAMILTON**

Para realizar el escrutinio de genes mediante una librería de esiRNA se utilizó un robot, disponible en el centro, para el manejo automático de líquidos (Robot Microlab Star de Hamilton). El diseño de los diferentes procedimientos para el uso del robot fue realizado por los técnicos del Servicio de Genómica de CABIMER según las necesidades planteadas.

Se diseñaron un total de cuatro protocolos para el procesamiento de las muestras con el robot para los días 0, 1, 3 y 4. El día 3 del escrutinio (Transducción Viral) se realizó como se describe en el apartado 1.3.2:

##### **4.1. PROTOCOLO DÍA 0: DILUCIÓN DE LOS esiRNA EN MEDIO OPTI-MEM**

Con este protocolo se prepararon las placas de 96 pocillos de fondo V, a partir de las placas de la librería comercial de esiRNA, a una concentración adecuada para llevar a cabo el protocolo de transfección reversa a partir de ella. La librería de esiRNAs de Sigma se encontraba a una concentración de 50 ng/ $\mu$ l. Se alicuotaron 40  $\mu$ l de medio Opti-MEM en cada uno de los pocillos y posteriormente se transfirieron 10  $\mu$ l de esiRNA desde la placa de la librería a la placa de uso.

##### **4.2. PROTOCOLO DÍA1: TRANSFECCIÓN REVERSA**

En este protocolo, el robot dispensaba en cada pocillo 5  $\mu$ l de una mezcla preparada. La mezcla se componía del agente de transfección lipofectamina RNAimax y Opti-MEM (0,3  $\mu$ l y 4,7  $\mu$ l). La concentración final de los esiRNA en la transfección fue de 30 nM. Trascorrido el tiempo de formación de los

complejos (mínimo de 15 minutos para cada placa), se procedió en la sala de cultivo a dispensar manualmente 7.000 células por pocillo con ayuda de una pipeta multicanal.

#### 4.3. PROTOCOLO DÍA 3: RENOVACIÓN MEDIO DE CULTIVO

A las 6 horas de haber realizado la transfección reversa se cambió el medio de cultivo para disminuir la toxicidad del agente de transfección. Esta renovación del medio se automatizó mediante el uso del robot. Se procedió a retirar el medio de cultivo y añadir 100  $\mu$ l de medio fresco.

#### 4.4. PROTOCOLO DÍA 4: LAVADOS DE LOS CULTIVOS Y FIJACIÓN

El último paso del procesamiento de las placas fue la preparación de éstas para su visualización a través del microscopio. El robot retiró medio de cultivo, se realizaron dos lavados con 100  $\mu$ l de PBS y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos. Se retiró el PFA y se realizó un lavado con PBS. A continuación se retiró el PBS y se añadió una solución de Hoechst 33258 a 2 mg/ml para teñir los núcleos. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se retiró la solución y se realizó un lavado con PBS. Las placas se conservaron selladas con parafilm y protegidas de la luz a 4°C hasta la adquisición de las imágenes.

### 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística se determinó con un test *t*-student por pares usando el software PRISM (Graphad Software, Inc.) en los experimentos para la cuantificación de los focos de RPA y de RIF1. Las diferentes significaciones estadísticas se anotó con uno, dos o tres asteriscos si  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  o  $P < 0.001$  respectivamente. En los ensayos con el sistema SSR el análisis estadístico se realizó mediante el análisis doble de la varianza (Two-ways ANOVA).

## BIBLIOGRAFÍA



- Aguilera, A. & Gómez-González, B., 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature reviews. Genetics*, 9(3), pp.204–217.
- Al-Hakim, A. et al., 2010. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA repair*, 9(12), pp.1229–1240.
- Aparicio, T., Baer, R. & Gautier, J., 2014. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA repair*, 19, pp.169–175. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4051845/>.
- Bartek, J. & Lukas, J., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*, 3(5), pp.421–429.
- Beck, C. et al., 2014. PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic acids research*, 42(9), pp.5616–5632.
- Bekker-Jensen, S. et al., 2010. HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat Cell Biol*, 12(1), pp.80–86. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2008>.
- Bennardo, N. et al., 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics*, 4(6).
- Bennardo, N. et al., 2009. Limiting the Persistence of a Chromosome Break Diminishes Its Mutagenic Potential G. P. Copenhaver, ed. *PLoS Genetics*, 5(10), p.e1000683. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2752804/>.
- Berndsen, C.E. & Wolberger, C., 2014. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nature structural & molecular biology*, 21(4), pp.301–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699078>.
- Beucher, A. et al., 2009. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO journal*, 28(21), pp.3413–27. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2009.276>.
- Bhatia, S. et al., 2016. A phase I study of the investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (TAK-924/MLN4924) in patients with metastatic melanoma. *Investigational new drugs*.
- Blank, J.L. et al., 2013. Novel DNA damage checkpoints mediating cell death induced by the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924. *Cancer Research*, 73(1), pp.225–234.
- Brandsma, I. & Gent, D.C., 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome integrity*, 3(1), p.9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3557175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brown, J.S., Lukashchuk, N., et al., 2015. Neddylation promotes ubiquitylation and release of Ku from DNA-damage sites. *Cell reports*, 11(5), pp.704–

714.

- Brown, J.S., Jackson, S.P. & Jackson, S.P., 2015. Ubiquitylation , neddylation and the DNA damage response.
- Caldecott, K.W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Rev. Genet.*, 9, pp.619–631. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2380>.
- Cannavo, E. & Cejka, P., 2014. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, 514(7520), pp.122–125. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13771>.
- Carmona, L.M., Fugmann, S.D. & Schatz, D.G., 2016. Collaboration of RAG2 with RAG1-like proteins during the evolution of V(D)J recombination. *Genes & development*, 30(8), pp.909–917.
- Cary, R.B. et al., 1997. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4267–4272. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207111/>.
- Chamovitz, D.A. & Deng, X.-W., 1995. The novel components of the arabidopsis light signaling pathway may define a group of general developmental regulators shared by both animal and plant kingdoms. *Cell*, 82(3), pp.353–354. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867495904239> [Accessed September 11, 2015].
- Chan, D.W. et al., 2002. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes & Development*, 16(18), pp.2333–2338. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC187438/>.
- Chapman, J.R. et al., 2013. RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*, 49(5), pp.858–871.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G. & Boulton, S.J., 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell*, 47(4), pp.497–510.
- Chung, D. & Dellaire, G., 2015. The Role of the COP9 Signalosome and Neddylation in DNA Damage Signaling and Repair. *Biomolecules*, 5(4), pp.2388–2416.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), pp.179–204. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510007471>.
- Ciehanover, a, Hod, Y. & Hershko, a, 1978. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 81(4), pp.1100–1105.



- Clerici, M. et al., 2008. The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO reports*, 9(8), pp.810–818.
- Corneo, B. et al., 2007. Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature*, 449(7161), pp.483–486.
- Cruz-García, A., López-Saavedra, A. & Huertas, P., 2014. BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell reports*, 9(2), pp.451–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124714007682> [Accessed July 29, 2015].
- Cukras, S. et al., 2014. Inactivating UBE2M impacts the DNA damage response and genome integrity involving multiple Cullin ligases. *PLoS ONE*, 9(7), pp.1–13.
- Danielsen, J.R. et al., 2012. DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger. *The Journal of cell biology*, 197(2), pp.179–187.
- Deans, A.J. & West, S.C., 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(7), pp.467–480. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3560328/>.
- DeFazio, L.G. et al., 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The EMBO Journal*, 21(12), pp.3192–3200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126055/>.
- Deng, X.-W. et al., 2000. Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends in Genetics*, 16(7), p.289. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952500020710> [Accessed September 11, 2015].
- Dickey, J.S. et al., 2009. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma*, 118(6), pp.683–692.
- Dinkelmann, M. et al., 2009. Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nature structural & molecular biology*, 16(8), pp.808–813. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721910/>.
- Dou, H. et al., 2010. Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex. *Molecular cell*, 39(3), pp.333–345.
- Douglas, P. et al., 2005. DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining. *DNA repair*, 4(9), pp.1006–18. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156878640500114X> [Accessed September 15, 2015].
- Douglas, P. et al., 2002. Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase.

- Biochemical Journal*, 368(Pt 1), pp.243–251. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222982/>.
- Draviam, V.M., Xie, S. & Sorger, P.K., 2004. Chromosome segregation and genomic stability. *Current opinion in genetics & development*, 14(2), pp.120–5. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X04000292>  
[Accessed August 22, 2015].
- Drost, R. et al., 2011. BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer cell*, 20(6), pp.797–809. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610811004387>  
[Accessed September 10, 2015].
- Dudley, D.D. et al., 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Advances in immunology*, 86, pp.43–112.
- Dupre, A. et al., 2008. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature chemical biology*, 4(2), pp.119–125.
- Esashi, F. et al., 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 434(7033), pp.598–604.
- Escribano-Díaz, C. et al., 2013. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 49(5), pp.872–883.
- Falck, J., Coates, J. & Jackson, S.P., 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434(7033), pp.605–611.
- Farmer, H., 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, pp.917–921. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature03445>.
- Fekairi, S. et al., 2009. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*, 138(1), pp.78–89.
- Fernandez-Capetillo, O. et al., 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair*, 3(8-9), pp.959–967.
- Flynn, R.L. & Zou, L., 2011. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends in biochemical sciences*, 36(3), pp.133–140.
- Fousteri, M. & Mullenders, L.H.F., 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*, 18(1), pp.73–84. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2008.6>.
- Fradet-Turcotte, A. et al., 2013. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-

- induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*, 499(7456), pp.50–4. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3955401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Frit, P. et al., 2014. Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA repair*, 17, pp.81–97.
- Galanty, Y. et al., 2009. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature*, 462(7275), pp.935–939.
- Garcia, K. et al., 2014. Nedd8-Activating Enzyme Inhibitor MLN4924 Provides Synergy with Mitomycin C through Interactions with ATR, BRCA1/BRCA2, and Chromatin Dynamics Pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13 (6), pp.1625–1635. Available at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/13/6/1625.abstract>.
- Gibbs-Seymour, I. et al., 2015. Ubiquitin-SUMO circuitry controls activated fanconi anemia ID complex dosage in response to DNA damage. *Molecular cell*, 57(1), pp.150–64. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514009496> [Accessed September 10, 2015].
- Gomez-Cabello, D. et al., 2013. New Tools to Study DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *PLoS ONE*, 8(10).
- Gong, L. & Yeh, E.T.H., 1999. Identification of the Activating and Conjugating Enzymes of the NEDD8 Conjugation Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), pp.12036–12042. Available at:  
<http://www.jbc.org/cgi/content/long/274/17/12036> [Accessed September 10, 2015].
- Goodarzi, A.A. et al., 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *The EMBO Journal*, 25(16), pp.3880–3889. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1553186/>.
- Gottlieb, T.M. & Jackson, S.P., 1993. The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), pp.131–142. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749390057W> [Accessed June 29, 2015].
- Grawunder, U. et al., 1997. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641), pp.492–495.
- Gu, J., Lu, H., Tsai, A.G., et al., 2007. Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 35(17), pp.5755–5762. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2034460/>.

- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., et al., 2007. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *The EMBO journal*, 26(4), pp.1010–1023.
- Haince, J.-F. et al., 2008. PARP1-dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (2), pp.1197–1208. Available at: <http://www.jbc.org/content/283/2/1197.abstract>.
- Hannss, R. & Dubiel, W., 2011. COP9 signalosome function in the DDR. *FEBS letters*, 585(18), pp.2845–52. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579311002742> [Accessed September 11, 2015].
- Hartlerode, A.J. & Scully, R., 2009. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *The Biochemical journal*, 423(2), pp.157–168.
- Heisig, P., 2009. Type II topoisomerases—inhibitors, repair mechanisms and mutations. *Mutagenesis*, 24 (6), pp.465–469. Available at: <http://mutage.oxfordjournals.org/content/24/6/465.abstract>.
- Hentges, P. et al., 2006. Evolutionary and Functional Conservation of the DNA Non-homologous End-joining Protein, XLF/Cernunnos. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (49), pp.37517–37526. Available at: <http://www.jbc.org/content/281/49/37517.abstract>.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T. & Liu, J., 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics*, 44, pp.113–139. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4114321/>.
- Hoeijmakers, J.H.J., 2009. DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), pp.1475–1485. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0804615>.
- Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, pp.366–374. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35077232>.
- Hopfner, K.-P. et al., 2002. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418(6897), pp.562–566. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature00922>.
- Huang, D.T. et al., 2009. E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Molecular cell*, 33(4), pp.483–95. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276509000380> [Accessed September 10, 2015].
- Huber, A. et al., 2004. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA repair*, 3(8-9), pp.1103–1108.
- Huen, M.S., 2007. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*, 131, pp.901–914.

- Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.041>.
- Huen, M.S.Y., Sy, S.M.H. & Chen, J., 2010. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), pp.138–148. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2831>.
- Huertas, P. et al., 2008. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature*, 455(7213), pp.689–692. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2635538/>.
- Huertas, P., 2010. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature structural & molecular biology*, 17(1), pp.11–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850169/>.
- Huertas, P. & Jackson, S.P., 2009. Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(14), pp.9558–9565. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666608/>.
- Ira, G. et al., 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, 431(7011), pp.1011–1017.
- Jackson, S.P. & Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), pp.1071–1078. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>.
- Jackson, S.P. & Durocher, D., 2013. Regulation of DNA Damage Responses by Ubiquitin and SUMO. *Molecular Cell*, 49(5), pp.795–807. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.017>.
- Jasin, M. & Rothstein, R., 2013. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), p.a012740.
- Jazayeri, A. et al., 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*, 8(1), pp.37–45.
- Jazayeri, A. et al., 2008. Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *The EMBO journal*, 27(14), pp.1953–1962.
- Jeggo, P.A. & Lobrich, M., 2005. Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(3), pp.359–362.
- Jimeno, S. et al., 2015. Neddylation inhibits CtIP-mediated resection and regulates DNA double strand break repair pathway choice. *Nucleic Acids Research*, 43(2), pp.987–999. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4333419/>.
- Jiricny, J., 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, pp.335–346. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1907>.
- Johnson, R.D. & Jasin, M., 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The*

- EMBO journal*, 19(13), pp.3398–3407.
- Jones, J. et al., 2008. A Targeted Proteomic Analysis of the Ubiquitin-Like Modifier Nedd8 and Associated Proteins. *Journal of Proteome Research*, 7(3), pp.1274–1287. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/pr700749v>.
- Kamitani, T. et al., 1997. Characterization of NEDD8, a Developmentally Down-regulated Ubiquitin-like Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), pp.28557–28562. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/long/272/45/28557> [Accessed September 10, 2015].
- Kamura, T. et al., 1999. The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes & Development*, 13(22), pp.2928–2933. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317157/>.
- Koinuma, D. et al., 2003. Arkadia amplifies TGF- $\beta$  superfamily signalling through degradation of Smad7. *The EMBO Journal*, 22(24), pp.6458–6470. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/22/24/6458.abstract>.
- Kolas, N.K., 2007. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, 318, pp.1637–1640. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1150034>.
- Komander, D., 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), pp.937–953. Available at: <http://www.biochemsoctrans.org/content/37/5/937.abstract>.
- Kracker, S. & Durandy, A., 2011. Insights into the B cell specific process of immunoglobulin class switch recombination. *Immunology letters*, 138(2), pp.97–103. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247811000447> [Accessed August 30, 2015].
- Kumar, S., Tomooka, Y. & Noda, M., 1992. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185(3), pp.1155–1161. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X9291747E> [Accessed September 10, 2015].
- Lee, D.-H. et al., 2010. A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nature structural & molecular biology*, 17(3), pp.365–372.
- Lee, H.-S. et al., 2010. A cooperative activation loop among SWI/SNF,  $\gamma$ -H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *The EMBO Journal*, 29(8), pp.1434–1445. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2010.27>.
- Lee, J. & Dunphy, W.G., 2013. The Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex has a specific role in the activation of Chk1 in response to stalled replication

- forks. *Molecular biology of the cell*, 24(9), pp.1343–1353. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=23468519&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/doi/10.1091/mbc.E13-01-0025>.
- Lee, J.-H. & Paull, T.T., 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), pp.551–554.
- Leidecker, O. et al., 2012. The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell Cycle*, 11(6), pp.1142–1150. Available at: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.6.19559>.
- Li, T. et al., 2014. RNF168-mediated H2A neddylation antagonizes ubiquitylation of H2A and regulates DNA damage repair. *Journal of Cell Science*, 127(10), pp.2238–2248. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/127/10/2238.abstract>.
- Liakopoulos, D. et al., 1998. A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *The EMBO Journal*, 17(8), pp.2208–2214. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/17/8/2208.abstract>.
- Liao, H. et al., 2011. Quantitative Proteomic Analysis of Cellular Protein Modulation upon Inhibition of the NEDD8-Activating Enzyme by MLN4924. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 10(11), p.M111.009183. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226404/>.
- Lieber, M.R., 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.*, 283, pp.1–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R700039200>.
- Lima, J.F. et al., 2005. The csnD/csnE Signalosome Genes Are Involved in the *Aspergillus nidulans* DNA Damage Response. *Genetics*, 171(3), pp.1003–1015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456808/>.
- Lin, S.-Y., Liang, Y. & Li, K., 2010. Multiple roles of BRIT1/MCPH1 in DNA damage response, DNA repair, and cancer suppression. *Yonsei medical journal*, 51(3), pp.295–301.
- Lindahl, T. & Barnes, D.E., 2000. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 65, pp.127–134. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>.
- Lisby, M. et al., 2004. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 118(6), pp.699–713. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404007974> [Accessed September 15, 2015].
- Lord, C.J. & Ashworth, A., 2008. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Current opinion in pharmacology*, 8(4), pp.363–369.
- Lydeard, J.R., Schulman, B.A. & Harper, J.W., 2013. Building and remodelling

- Cullin–RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO reports*, 14(12), pp.1050–1061. Available at: <http://embor.embopress.org/content/14/12/1050.abstract>.
- Ma, T. et al., 2013. RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Molecular cell*, 49(5), pp.897–907. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276513000397> [Accessed September 10, 2015].
- Ma, Y. et al., 2004. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell*, 16(5), pp.701–713.
- Ma, Y. et al., 2002. Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell*, 108(6), pp.781–794. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867402006712> [Accessed July 14, 2015].
- Mahaney, B.L., Meek, K. & Lees-Miller, S.P., 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal*, 417(3), pp.639–650. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2975036/>.
- Mailand, N., 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131, pp.887–900. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.040>.
- Mailand, N. et al., 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131(5), pp.887–900. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407012718> [Accessed September 4, 2015].
- Maizels, N., 2005. Immunoglobulin Gene Diversification. *Annual Review of Genetics*, 39(1), pp.23–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.110544>.
- Matsuoka, S., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316, pp.1160–1166. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1140321>.
- Mattiroli, F. et al., 2012. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell*, 150(6), pp.1182–95. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412010008> [Accessed September 9, 2015].
- Mattiroli, F. & Sixma, T.K., 2014. Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(4), pp.308–316. Available at: <http://www.nature.com/nsmb/journal/v21/n4/full/nsmb.2792.html> \n <http://www.nature.com/nsmb/journal/v21/n4/pdf/nsmb.2792.pdf>.
- McVey, M. & Lee, S.E., 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.*, 24,



- pp.529–538. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.007>.
- Meek, K., Dang, V. & Lees-Miller, S.P., 2008. DNA-PK: the means to justify the ends? *Advances in immunology*, 99, pp.33–58. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277608006020> [Accessed August 1, 2015].
- Meir, M. et al., 2015. The COP9 signalosome is vital for timely repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 43(9), pp.4517–4530.
- Mendoza, H.M. et al., 2003. NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *The Journal of biological chemistry*, 278(28), pp.25637–43. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/long/278/28/25637> [Accessed September 10, 2015].
- Miller, K.M. et al., 2010. Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA non-homologous end-joining. *Nature structural & molecular biology*, 17(9), pp.1144–1151. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018776/>.
- Modesti, M., Hesse, J.E. & Gellert, M., 1999. DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *The EMBO journal*, 18(7), pp.2008–2018.
- Morris, J.R. et al., 2009. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*, 462(7275), pp.886–890. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08593>.
- Moshous, D. 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), pp.177–186. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867401003099> [Accessed July 3, 2015].
- Motycka, T.A. et al., 2004. Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *The Journal of biological chemistry*, 279(14), pp.13634–13639.
- Mundt, K.E. et al., 1999. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Current Biology*, 9(23), pp.1427–1433. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982200800913> [Accessed September 11, 2015].
- Munoz-Galvan, S. et al., 2013. Competing roles of DNA end resection and non-homologous end joining functions in the repair of replication-born double-strand breaks by sister-chromatid recombination. *Nucleic acids research*, 41(3), pp.1669–1683.
- Murga, M. et al., 2007. Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *The Journal of cell biology*, 178(7), pp.1101–1108.

- Nagaraju, G. et al., 2009. XRCC2 and XRCC3 regulate the balance between short- and long-tract gene conversions between sister chromatids. *Molecular and cellular biology*, 29(15), pp.4283–4294.
- Narod, S.A. & Foulkes, W.D., 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), pp.665–676.
- Nick McElhinny, S.A. et al., 2000. Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends. *Molecular and Cellular Biology*, 20(9), pp.2996–3003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85565/>.
- Nick McElhinny, S.A. & Ramsden, D.A., 2004. Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunological reviews*, 200, pp.156–164.
- O'Driscoll, M. et al., 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature genetics*, 33(4), pp.497–501.
- O'Driscoll, M. et al., 2004. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA repair*, 3(8-9), pp.1227–1235.
- Panier, S. et al., 2012. Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *Molecular cell*, 47(3), pp.383–95. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109727651200490X> [Accessed August 19, 2015].
- Pardo, B., Gómez-González, B. & Aguilera, A., 2009. DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), pp.1039–1056. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3>.
- Peterson, S.E. et al., 2011. Cdk1 uncouples CtlP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair. *The Journal of Cell Biology*, 194(5), pp.705–720. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171114/>.
- Petroski, M.D. & Deshaies, R.J., 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), pp.9–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1547>.
- Peuscher, M.H. & Jacobs, J.J.L., 2011. DNA-damage response and repair activities at uncapped telomeres depend on RNF8. *Nat Cell Biol*, 13(9), pp.1139–1145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2326>.
- Pierce, A.J. et al., 2001. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes & Development*, 15(24), pp.3237–3242. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312854/>.
- Pierce, A.J. et al., 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development*, 13(20), pp.2633–2638. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317094/>.
- Postow, L. et al., 2008. Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *The Journal of Cell Biology*, 182 (3), pp.467–479. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/182/3/467.abstract>.
- Poulsen, M. et al., 2012. Human RNF169 is a negative regulator of the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology*, 197(2), pp.189–199. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/197/2/189.abstract>.
- Poulsen, S.L. et al., 2013. RNF111/Arkadia is a SUMO-targeted ubiquitin ligase that facilitates the DNA damage response. *The Journal of cell biology*, 201(6), pp.797–807.
- Prado, F. & Aguilera, A., 2003. Control of cross-over by single-strand DNA resection. *Trends in genetics : TIG*, 19(8), pp.428–431.
- Puget, N., Knowlton, M. & Scully, R., 2005. Molecular analysis of sister chromatid recombination in mammalian cells. *DNA repair*, 4(2), pp.149–161.
- Qvist, P. et al., 2011. CtIP mutations cause Seckel and Jawad syndromes. *PLoS Genetics*, 7(10).
- Rabut, G. & Peter, M., 2008. Function and regulation of protein neddylation. *EMBO reports*, 9(10), pp.969–976. Available at: <http://embor.embopress.org/content/9/10/969.abstract>.
- Rai, R. et al., 2011. The E3 ubiquitin ligase Rnf8 stabilizes Tpp1 to promote telomere end protection. *Nat Struct Mol Biol*, 18(12), pp.1400–1407. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2172>.
- Rass, E. et al., 2009. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), pp.819–824. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1641>.
- Reinhardt, H.C. & Yaffe, M.B., 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current opinion in cell biology*, 21(2), pp.245–255.
- Rieser, E., Cordier, S.M. & Walczak, H., 2013. Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. *Trends in biochemical sciences*, 38(2), pp.94–102. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000412001909> [Accessed September 10, 2015].
- Rizzardi, L.F. & Cook, J.G., 2012. Flipping the Switch from G1 to S Phase with E3 Ubiquitin Ligases. *Genes & Cancer*, 3(11-12), pp.634–648. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636747/>.
- Rogakou, E.P. et al., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), pp.5858–5868.
- Rojas-Fernandez, A. et al., 2014. SUMO chain-induced dimerization activates

- RNF4. *Molecular cell*, 53(6), pp.880–92. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514002032> [Accessed September 10, 2015].
- Rozier, L. et al., 2013. The MRN-CtIP pathway is required for metaphase chromosome alignment. *Molecular Cell*, 49(6), pp.1097–1107.
- Sale, J.E., 2012. Competition, collaboration and coordination – determining how cells bypass DNA damage. *Journal of Cell Science*, 125 (7), pp.1633–1643. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/125/7/1633.abstract>.
- Sancar, A. et al., 2004. MOLECULAR MECHANISMS OF MAMMALIAN DNA REPAIR AND THE DNA DAMAGE CHECKPOINTS. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), pp.39–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- Sarbajna, S. & West, S.C., 2014. Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends in biochemical sciences*, 39(9), pp.409–419.
- Sarikas, A., Hartmann, T. & Pan, Z.-Q., 2011. The cullin protein family. *Genome biology*, 12(4), p.220. Available at: <http://genomebiology.com/2011/12/4/220> [Accessed September 10, 2015].
- Sartori, A.A. et al., 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), pp.509–514. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06337>.
- Savic, V. et al., 2009. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Molecular cell*, 34(3), pp.298–310.
- Schreiber, V. et al., 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), pp.517–528. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1963>.
- Schulman, B.A. & Harper, J.W., 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(5), pp.319–331. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2712597/>.
- Scott, D.C. et al., 2010. A dual E3 mechanism for Rub1 ligation to Cdc53. *Molecular cell*, 39(5), pp.784–96. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276510006404> [Accessed September 10, 2015].
- Seeger, M. et al., 1998. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *The FASEB Journal*, 12 (6), pp.469–478. Available at: <http://www.fasebj.org/content/12/6/469.abstract>.

- Shaheen, R. et al., 2014. Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome research*, 24(2), pp.291–299.
- Shanbhag, N.M. et al., 2010. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell*, 141(6), pp.970–81. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410004927> [Accessed September 10, 2015].
- Sharon, M. et al., 2009. Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure (London, England : 1993)*, 17(1), pp.31–40. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212608004176> [Accessed September 10, 2015].
- Shiloh, Y., 2014. ATM: expanding roles as a chief guardian of genome stability. *Experimental cell research*, 329(1), pp.154–161.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P. & Nickoloff, J.A., 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, 18(1), pp.134–147. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.111>.
- Silverman, J. et al., 2004. Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes & development*, 18(17), pp.2108–2119.
- Smith, J. et al., 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*, 108, pp.73–112.
- Soria-Bretones, I. et al., 2013. Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer. *Cancer medicine*, 2(6), pp.774–783.
- Soucy, T. a et al., 2009. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, 458(7239), pp.732–736.
- Stark, J.M. et al., 2004. Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Molecular and cellular biology*, 24(21), pp.9305–9316.
- Stiff, T. et al., 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research*, 64(7), pp.2390–2396.
- Stracker, T.H. & Petrini, J.H.J., 2011. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(2), pp.90–103.
- Stracker, T.H., Usui, T. & Petrini, J.H.J., 2009. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA repair*, 8(9), pp.1047–1054.
- Stucki, M., 2009. Histone H2A.X Tyr142 phosphorylation: a novel sWItCH for apoptosis? *DNA repair*, 8(7), pp.873–876.
- Stucki, M. & Jackson, S.P., 2006. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA repair*, 5(5), pp.534–543.

- Sung, P. & Klein, H., 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(10), pp.739–750.
- Symington, L.S. & Gautier, J., 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics*, 45, pp.247–271.
- Takai, H. et al., 2002. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO journal*, 21(19), pp.5195–5205.
- Takata, M. et al., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 17(18), pp.5497–5508. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170875/>.
- Tauchi, H. et al., 2002. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 420(6911), pp.93–98. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01125>.
- Teng, G. & Papavasiliou, F.N., 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual review of genetics*, 41, pp.107–120.
- Tomoda, K. et al., 2004. Multiple Functions of Jab1 Are Required for Early Embryonic Development and Growth Potential in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (41), pp.43013–43018. Available at: <http://www.jbc.org/content/279/41/43013.abstract>.
- Uziel, T. et al., 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*, 22(20), pp.5612–5621. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213795/>.
- Di Virgilio, M. et al., 2013. Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6120), pp.711–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3815530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Walker, J.R., Corpina, R.A. & Goldberg, J., 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), pp.607–614. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35088000>.
- Wang, H. et al., 2013. The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *PLoS Genetics*, 9(2), pp.25–27.
- Wang, J. et al., 2005. Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA repair*, 4(5), pp.556–70. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786405000522> [Accessed August 27, 2015].
- Wang, M. et al., 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double

- strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic acids research*, 34(21), pp.6170–6182.
- Wang, Y.-G. et al., 2004. Phosphorylation and Regulation of DNA Ligase IV Stability by DNA-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (36), pp.37282–37290. Available at: <http://www.jbc.org/content/279/36/37282.abstract>.
- Watson, I.R., Irwin, M.S. & Ohh, M., 2011. NEDD8 Pathways in Cancer, *Sine Quibus Non. Cancer Cell*, 19(2), pp.168–176.
- Wei, D. et al., 2012. Radiosensitization of human pancreatic cancer cells by MLN4924, an investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor. *Cancer research*, 72(1), pp.282–293.
- Wei, N. & Deng, X.-W., 1998. Characterization and Purification of the Mammalian COP9 Complex, a Conserved Nuclear Regulator Initially Identified as a Repressor of Photomorphogenesis in Higher Plants. *Photochemistry and Photobiology*, 68(2), pp.237–241. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb02495.x>.
- West, S.C., 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(6), pp.435–445.
- Whitby, F.G., 1998. Crystal Structure of the Human Ubiquitin-like Protein NEDD8 and Interactions with Ubiquitin Pathway Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), pp.34983–34991. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/long/273/52/34983> [Accessed September 10, 2015].
- Williams, R.S. et al., 2008. Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell*, 135(1), pp.97–109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681233/>.
- Williams, R.S., Williams, J.S. & Tainer, J.A., 2007. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 85(4), pp.509–520.
- Wold, M.S., 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual review of biochemistry*, 66, pp.61–92.
- Wu, J. et al., 2012. Skp2 E3 Ligase Integrates ATM Activation and Homologous Recombination Repair by Ubiquitinating NBS1. *Molecular cell*, 46(3), pp.351–361. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518281/>.
- Wu, K. et al., 2003. DEN1 Is a Dual Function Protease Capable of Processing the C Terminus of Nedd8 and Deconjugating Hyper-neddylated CUL1. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (31), pp.28882–28891. Available at: <http://www.jbc.org/content/278/31/28882.abstract>.

- Wu, L. & Hickson, I.D., 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), pp.870–874. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02253>.
- Wyatt, H.D.M. et al., 2013. Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday junction resolution in human cells. *Molecular cell*, 52(2), pp.234–247.
- Xirodimas, D.P. et al., 2004. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, 118(1), pp.83–97. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404005859> [Accessed September 14, 2015].
- Xirodimas, D.P. et al., 2008. Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Reports*, 9(3), pp.280–286. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2267383/>.
- Xu, L. & Blackburn, E.H., 2004. Human Rif1 protein binds aberrant telomeres and aligns along anaphase midzone microtubules. *The Journal of cell biology*, 167(5), pp.819–830.
- Yamaguchi-Iwai, Y. et al., 1999. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 18(23), pp.6619–6629. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171725/>.
- Yan, C.T. et al., 2007. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, 449(7161), pp.478–482.
- Yan, J. et al., 2003. COP9 Signalosome Subunit 3 Is Essential for Maintenance of Cell Proliferation in the Mouse Embryonic Epiblast. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19), pp.6798–6808. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193933/>.
- Yaneva, M., Kowalewski, T. & Lieber, M.R., 1997. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *The EMBO Journal*, 16(16), pp.5098–5112. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170144/>.
- Yang, D. et al., 2012. The p21-Dependent Radiosensitization of Human Breast Cancer Cells by MLN4924, an Investigational Inhibitor of NEDD8 Activating Enzyme. *PLoS ONE*, 7(3), p.e34079. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034079>.
- Yin, Y. et al., 2012. SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 is required for the response of human cells to DNA damage. *Genes and Development*, 26(11), pp.1196–1208.
- Yoo, S. & Dynan, W.S., 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 Research*, 27(24), pp.4679–4686. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC148766/>.



- You, Z. & Bailis, J.M., 2010. DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends in cell biology*, 20(7), pp.402–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892410000759> [Accessed September 14, 2015].
- Yu, X. & Chen, J., 2004. DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), pp.9478–9486. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC522253/>.
- Yu, Y. et al., 2008. DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. *DNA Repair*, 7(10), pp.1680–1692. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350819/>.
- Yu, Y. et al., 2003. DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair*, 2(11), pp.1239–1252. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786403001435> [Accessed September 15, 2015].



## ANEXO



# **New Tools to Study DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice**

PLoS ONE 8(10): e77206. Doi: [10.1371/journal.pone.0077206](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077206)

Daniel Gomez-Cabello, Sonia Jimeno, María Jesús Fernández-Ávila, and  
Pablo Huertas

Fecha de publicación: 14 Octubre del 2013



# New Tools to Study DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice

Daniel Gomez-Cabello<sup>1</sup>, Sonia Jimeno<sup>1,2</sup>, María Jesús Fernández-Ávila<sup>1</sup>, Pablo Huertas<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla, Spain, <sup>2</sup> Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

## Abstract

A broken DNA molecule is difficult to repair, highly mutagenic, and extremely cytotoxic. Such breaks can be repaired by homology-independent or homology-directed mechanisms. Little is known about the network that controls the repair pathway choice except that a licensing step for homology-mediated repair exists, called DNA-end resection. The choice between these two repair pathways is a key event for genomic stability maintenance, and an imbalance of the ratio is directly linked with human diseases, including cancer. Here we present novel reporters to study the balance between both repair options in human cells. In these systems, a double-strand break can be alternatively repaired by homology-independent or -dependent mechanisms, leading to the accumulation of distinct fluorescent proteins. These reporters thus allow the balance between both repair pathways to be analyzed in different experimental setups. We validated the reporters by analyzing the effect of protein downregulation of the DNA end resection and non-homologous end-joining pathways. Finally, we analyzed the role of the DNA damage response on double-strand break (DSB) repair mechanism selection. Our reporters could be used in the future to understand the roles of specific factors, whole pathways, or drugs in DSB repair pathway choice, or for genome-wide screening. Moreover, our findings can be applied to increase gene-targeting efficiency, making it a beneficial tool for a broad audience in the biological sciences.

**Citation:** Gomez-Cabello D, Jimeno S, Fernández-Ávila MJ, Huertas P (2013) New Tools to Study DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. PLoS ONE 8(10): e77206. doi:10.1371/journal.pone.0077206

**Editor:** Michael Lichten, National Cancer Institute, United States of America

**Received:** July 16, 2013; **Accepted:** September 6, 2013; **Published:** October 14, 2013

**Copyright:** © 2013 Gomez-Cabello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work has been funded by a R+D+I grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2010-14877) and an European Research Council (ERC) Starting Grant (DSBRECA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: pablo.huertas@cabimer.es

## Introduction

DNA is under the constant attack of many agents, physical and chemical, that alter its structure [1,2]. Although those alterations are usually repaired, genomes are never completely stable [3]. This low level of genomic instability does not compromise cell or organismal survival and is the main force driving evolution [3]. However, if the cellular DNA repair pathways are mutated, genomes become increasingly unstable, a phenomena tightly related to several human pathologies, including cancer [1–3]. There are many types of DNA damage and, correspondingly, many DNA repair pathways [1,2]. Many of these take advantage of the double-stranded nature of DNA to use an intact strand to recover the information lost in the damaged strand. This is not possible when a break occurs simultaneously on both strands, a so-called double-strand break (DSB). As a consequence, DSB DNA lesions are extremely difficult to repair and are highly cytotoxic and mutagenic [1–8]. While there are several cellular pathways that repair DSBs [4,9], all can be grouped into one of two categories: homology-independent (non-homologous end joining; NHEJ) [6] or homology-mediated repair [8]. While the former mechanistically consists of a simple ligation of two ends, the latter is more complex and requires that a homologous sequence is used as a template for repair. There are various NHEJ repair pathways. The majority of NHEJ repairs use the classical NHEJ repair pathway, which is mediated by the DNA-PKcs-Ku70–Ku80 complex and ligase 4 [6]. However, in some circumstances DSBs

are repaired by a Ku-independent repair mechanism that use microhomology as an intermediate and is dependent on ligase 3 [10,11]; this is termed Alt-NHEJ. Similarly, there are four different homology-mediated mechanisms: the three core homologous recombination subpathways (double Holliday junction, synthesis-dependent strand annealing, and break-induced replication) and the intramolecular mechanism single-strand annealing (SSA) [9]. All of these mechanisms use a homologous molecule during the repair process, but whereas the first three require Rad51-mediated DNA invasion of the homologous partner, SSA is Rad51 independent. However, all of these are initiated by the same mechanism, a licensing step known as DNA-end resection [5]. Therefore, despite the different mechanisms and outcomes of these pathways, all can be grouped and analyzed as a single category of homology-mediated repair (HR).

DNA-end resection in human cells is controlled by the action of several proteins [5]. First, the MRN complex (Mre11-Rad50-Nbs1) recognizes the break [5]. If the break will be repaired by HR, the coordinated action of the MRN complex and CtIP protein activates a 5'-to-3' nucleolytic degradation of both ends, close to the break (short-range resection) [5]. In a second wave (termed long-range resection), the exonuclease Exo1 and/or the helicase BLM act together with an unknown nuclease in higher eukaryotes (budding yeast BLM homologue Sgs1 acts with the nuclease Dna2), to extend the resected DNA by several kilobases [5]. Resected DNA is an essential intermediate of all homology-mediated repair pathways and also inhibits classical NHEJ due to

the inability of core NHEJ proteins to bind single-stranded DNA (ssDNA) [12]. As in homology-mediated repair, Alt-NHEJ requires resected DNA to expose the microhomologies used during repair. Hence, the Alt-NHEJ pathway mechanistically shares steps with both HR and classical NHEJ.

Appropriate DSB repair is essential for cellular and organismal survival. In humans, many diseases are related to mutations in DSB repair protein-coding genes [2,7]. However, in many cases these conditions are not caused by a specific impairment in one type of repair, but by an imbalance between homology-driven versus homology-independent repair mechanisms [9,13]. Whereas our knowledge of the mechanisms of repair is quite extensive, how the decision between NHEJ and HR is made is still unknown. Here, we present two different systems that we specifically designed to tackle this question. We created a construct in which the formation of DSBs can be induced using the meganuclease I-SceI. In contrast to previously reported systems, which can measure either classical NHEJ or specific HR subtypes, our reporters allow us to monitor the ratio between homology-driven and homology-independent repair by emitting the distinct fluorescent signals of red for HR and green for NHEJ. We validated these reporter systems by manipulating either NHEJ or DNA-end resection. Finally, we analyzed the effect of downregulating different DNA damage checkpoint proteins on the balance between these repair pathways.

## Materials and Methods

### Cloning of SSR Systems

Both SSRs (Figure 1A and 1B) were derived from the pEGFP-C1 plasmid. For nuclease-cleavage-sequence cloning, two annealed oligonucleotides bearing either one (SSR 1.0; 5'-AATT-CAGTTACGCTAGGGATAACAGGGTAATATAG<sub>taaat</sub>C-TATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACT-3') or two (SSR 2.0; 5'-AATTCAGTGGGATAACAGGGTAATAA-TAATTACCCTGTTATCCCTATG-3' and 5'-AATTCAGTGGGATAACAGGGTAATTATTATTACCCTGT-TATCCCTAGTG-3') inverted I-SceI target sequences were inserted at the 3' end of the *GFP* gene. Both *RFP* repeats were obtained from the Hc-Red plasmid by PCR. An *AgeI-AgeI* fragment harboring the 5' end of the gene (RF) was obtained using the oligonucleotides 5'-ATGTCGTAACAACCTCCGCC-3' and 5'-GGACTTACCGGTCCGCTCTTGTTCATC-3' and cloned at an *AgeI* restriction site located between the CMV promoter and the *GFP* gene, maintaining the reading frame. A *SalI-BamHI* PCR product bearing the 3' end of the *RFP* gene (FP) was obtained using the oligonucleotides 5'-GGACTTGTGCA-CACCCAGAGCATGAGAATCCAC-3' and 5'-GTCGACG-GATCCTGCAGAAATCGAAGCTTGAGCTCGAGA-3' and cloned at *SalI* and *BamHI* sites, just behind the I-SceI site(s). The RF and FP fragments share 302 bp of homology (Figure 1A and 1B). The original SSR 1.0 reporter showed low GFP expression. To boost it, we inserted a PCR fragment containing the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE) at *KpnI-SalI* restriction site to stabilize the mRNA.

### Cell Culture and Drug Treatments

Both SSR reporters were integrated in U2OS osteosarcoma cells (ATCC #HTB-96) by plasmid transfection using Fugene6 Transfection Reagent (Roche) according to the manufacturers instructions. Cells were cultured in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM Glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.5 mg/ml G418 at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. U2OS stably

expressing SSR systems were selected with 0.5 mg/ml G418 antibiotics. Single clones of both reporter systems were obtained by plating 1000 cells in 15 cm diameter plates and selection of isolated colonies.

### Southern Blot

Southern blot analyses were performed according to standard procedures with <sup>32</sup>P-radiolabelled probes. The DNA probe of a *GFP* fragment obtained by PCR amplification (using the primers 5'-CACGAACTCCAGCAGGACCATG-3' and 5'-CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG-3') was labeled with <sup>32</sup>P. The product was labeled with 500 µg/ml N6 random primers, 0.03 mM each of dATP, dGTP, and dTTP, 0.01 dCTP, 1 mCi/ml [<sup>32</sup>P]dCTP, and Klenow polymerase during 2 hr at 37°C. The labeled product was purified with G25 columns (Amersham, NAP5). To obtain the DNA cells were grown in 10 cm plates to confluence, collected by trypsinization, and resuspended in 300 µl of lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, and 5 mM EDTA) with 20 µg/ml proteinase K, and incubated overnight at 55°C with agitation. DNA was precipitated with 1 volume of isopropanol and centrifuged at 13000 g. The DNA pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in 40 µl H<sub>2</sub>O. DNA (40 µg) was digested with *EcoRI* overnight at 37°C, resolved on a 0.8% agarose gel, and transferred to a Hybond N+membrane (Amersham) by capillarity blotting. The membrane was hybridized with the GFP-labeled fragment in hybridization buffer (0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 7% SDS, and 1 mM EDTA) overnight at 65°C, washed three times at 50°C with washing buffer (0.1% SSC, 1% SDS), and quantified in a FUJI FLA5000.

### Genomic DNA PCR

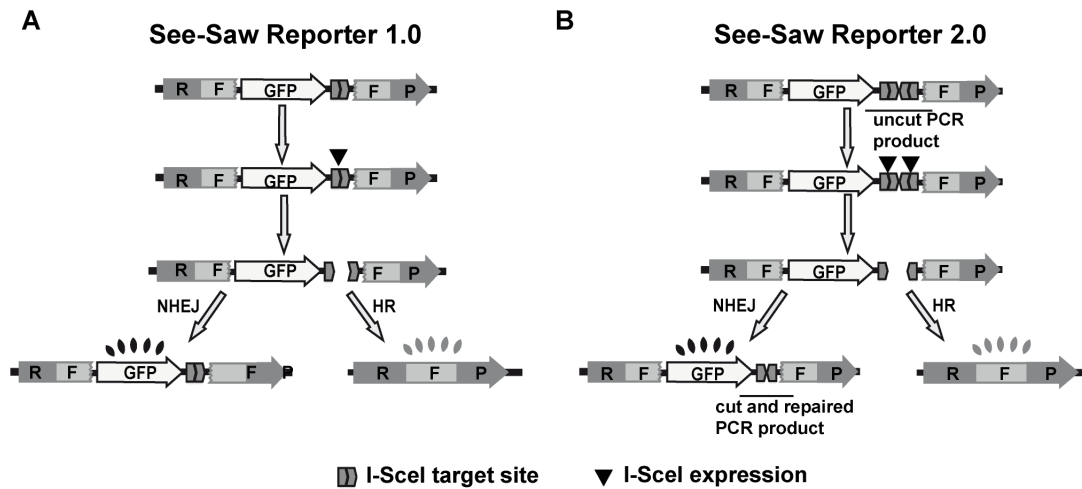
Genomic DNA was extracted from U2OS cells stably transfected with the SSR2.0 system, as indicated in the Southern blot section. Samples were collected 24, 48, and 72 hr after I-SceI lentiviral transduction. PCR was performed using primers flanking the I-SceI target site (Fw 5'-CACGAACTCCAGCAGGAC-CATG-3' and Rv 5'-ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGG-3') or inside the actin gene for 30 amplification cycles. PCR products were resolved in 4% native acrylamide/bisacrylamide gel (I-SceI target site) or 1.5% agarose (actin PCR), stained with RedSafe (Intron Biotechnology, ref 21141) for 10 min, visualized with UV light, and documented using a Gel-Doc XR+System (BioRad). The resultant image was quantified using the Quantity One software (BioRad). The ratio between the density of the band from the reporter and the one from the actin gene was normalized to the time 0 (e.g. before I-SceI infection).

### Lentiviral Production and Infection

Lentiviral particles harboring the *I-SceI* gene were generated using 10 µg p8.91, 5 µg pVSV-G, and 15 µg pRRL<sub>s</sub>EF1a<sub>-</sub>HA.NLS.SceOPT.T2A.TagBFP vectors (Andrew Scharenberg) by calcium phosphate transfection in A293T cells. After 48 hr, lentiviruses were collected from the media by 100,000 g centrifugation for 2 hr at 4°C. The virus titer was calculated by infecting U2OS cells with fixed amounts of the virus suspension and analyzing the percentage of BFP-expressing cells by FACS.

Lentiviral particles bearing short hairpin RNA (shRNA) against different messenger RNAs (see Table S1 for the list and access numbers) were obtained from Sigma Aldrich. Infection was performed according to the manufacturers manual. U2OS cells stably expressing the shRNAs were selected by adding 1 µg/ml puromycin to the medium after infection.





**Figure 1. Graphical representation and experimental validation of the HRNH1.0 reporter.** Schematic representation of the SeeSaw reporter (SSR) 1.0 (A) and SSR 2.0 (B). A GFP gene is flanked by two truncated parts of the RFP gene (RF and FP) that share 302 bp of homologous sequence. One I-SceI target site in SSR 1.0 (A), and two in opposite orientation in SSR 2.0 (B), were cloned at the 3' end of the GFP gene. Expression of I-SceI generates a DSB; if the damage is resolved by NHEJ, cells will express the GFP protein, while if it is repaired using homologous sequence by HR, cells express the RFP gene. The PCR products used in Figure 2F are depicted as “uncut PCR fragment” and “cut and repaired PCR fragment”. doi:10.1371/journal.pone.0077206.g001

### Flow Cytometry

Inhibitor-treated or shRNA-depleted samples were prepared for FACS analysis as following. Cells were seeded in 12-well plate (50,000 cells per well) in duplicate. The next day, cells were infected with lentivirus particles containing I-SceI-BFP expression construct at MOI 5 using 8  $\mu$ g/ml polybrene in 300  $\mu$ l DMEM. After 6 hr, media was exchanged with fresh DMEM. For inhibitor-treated samples, drugs or, as a control, the vehicle DMSO was added at this point. After 16–18 hr, cells were washed with PBS, trypsinized, neutralized in DMEM, and centrifugated at 800 g. Cells were resuspended, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, and collected by centrifugation. Pellets were then washed twice with PBS and resuspended in 200  $\mu$ l PBS. Samples were analyzed with a BD FACSAria with the BD FACSDiva Software v5.0.3. Five different parameters were considered: side scatter (SSC), forward scatter (FSC), blue fluorescence (407 nm violet laser BP, Filter 450/40), green fluorescence (488 nm blue laser BP Filter 530/30), and red fluorescence (488 nm blue laser BP Filter 575/26). The number of green and red cells from 10,000 events positives for blue fluorescence (infected with the I-SceI-BFP construct) was measured. The average of both duplicates was calculated for each experiment. At least two completely independent experiments were carried out for each condition.

### Microscopy

About 4000 U2OS cells stably transfected with the SSR system bearing different shRNAs were seeded. I-SceI-BFP Lentiviral transduction were performed using an MOI 5, changing the media after 24 hr. Cells were grown during 48 hr, fixed with 4% paraformaldehyde, and washed with PBS prior visualization with a fluorescent microscope.

### Homology-dependent and Homology-independent Ratio Quantification

The HR/NHEJ ratio was calculated by dividing the number of cells expressing GFP from the subpopulations expressing BFP by the number of cells expressing RFP from the subpopulations expressing BFP. To avoid noise due to the random events that

create RFP-expressing cells prior to I-SceI induction, a parallel experiment without I-SceI infection was performed for each shRNA-infected cell line and used as background. The HR/NHEJ ratio was normalized to the cells expressing the shRNA control.

## Results and Discussion

### A Novel Set of Reporters to Study the Balance between Homology Dependent and Independent Repair

As DNA resection dictates the way a DSB is going to be repaired [5,9], we have designed a resection-sensitive set of reporters to measure the balance between NHEJ and HR. The goal was to detect changes in the ratio between repair pathways, irrespective if they were caused by increase and/or decrease of HR or NHEJ. We called this constructs the SeeSaw Reporters (SSR), as a deviation towards any directions does not depend on one repair mechanism but rather on the combination of both. Hence, a net bias towards HR or NHEJ in our reporters does not necessarily reflect an increase or decrease of either one but rather an imbalance between both (Figure 1).

The SSR consists of the GFP gene flanked by a 3'- and a 5'-end truncated portion of the RFP gene that share 302 bp of homology with each other (Figure 1a and 1b). The sequence recognized by the meganuclease I-SceI was inserted at the 3' end of the GFP gene. It is worth noting that the reporters were designed to express the GFP gene constitutively. We decided to use this approach rather than the conventional approach, which is to place the I-SceI at the beginning of the gene and disrupt the reading frame, so that cells with the reporters do not express any fluorescent signal prior to repair. Our rationale was that the conventional way would allow us to observe only those NHEJ events in which mutagenic repair restored the reading frame. In other words, conventional reporters do not detect classical error-free NHEJ or the majority of mutagenic end-joining (e.g. those events that do not restore the appropriate reading frame). In contrast, our reporters allow us to observe both error-free and error-prone NHEJ.

We designed two different reporters: SSR 1.0 with a single I-SceI target site (Figure 1A) and SSR 2.0 with two I-SceI target site (Figure 1B). In the single-site reporter, I-SceI cleavage generates

ligatable, 3'-overhanging ends that can be joined accurately by NHEJ to re-create the I-SceI target site, which can in turn be cut again by the enzyme. This cycle can be repeated endlessly until the I-SceI site disappears either by homology-mediated repair or mutagenic end-joining. Thus, one caveat this system shares with previously published reporters is that it is biased to mutagenic repair. To study the extent of this bias in our reporter, we generated the version with two I-SceI sites, which are close to each other in an inverted orientation (Figure 1B). The I-SceI target site is not palindromic, and hence the repair of two inverted I-SceI-mediated breaks by NHEJ always destroys the target sequence and the intervening sequence if they occur simultaneously. Indeed, when we analyzed the break repair of SSR 2.0 by PCR, we only observed the cut-and-repair band corresponding to a double-cleavage event (Figure 2F). Thus, in this new See-Saw Reporter 2.0, both NHEJ and HR destroy the I-SceI site, and the majority of the repair events represent a single cycle of breakage-repair.

Infection with a lentivirus harboring the I-SceI gene creates DSBs. When cells repair such breaks through a classical NHEJ-type of repair, the *GFP* gene is restored and the cells fluoresce green (Figure 1A, 1B, 2A–2E). When resection takes place, thereby inhibiting classical NHEJ, the homologous regions of the *RFP* gene are exposed and used to repair the break by SSA [5,8,9]. In this case, the repair creates a functional *RFP* gene and eliminates the *GFP* gene, and the cells fluoresce red (Figure 1A, 1B, 2A–2E). One additional possibility is that resection takes place but the repair is mediated by alt-NHEJ. In this case, cells might lose the intervening region, e.g. the *GFP* gene, without creating a functional *RFP* gene [4,9,10]. In this case, cells would fluoresce neither green nor red and should thus be invisible in our system. Unfortunately, in all our stably transfected cells, there were always a significant percentage of cells that fit this condition (see tables S2–S7). We reasoned that these cells represent a heterogeneous population formed by: *i*) cells that have not yet repaired the break, or that have repaired it too recently for the fluorescent protein to accumulate to large enough levels to be visualized by FACS; *ii*) cells that maintain resistance but have lost the reporter and thus express neither GFP nor RFP; or *iii*) cells that have repaired the break in a way that hamper both *RFP* and *GFP* expression, such as alt-NHEJ.

One possible caveat of this approach is that those cells in which I-SceI is not present will remain green, affecting the measurement of NHEJ events. To analyze only cells that were infected with I-SceI, and therefore in which a DSB had been induced, we used a blue-fluorescent protein (BFP)–I-SceI construct (Figure 2B) and restricted the analysis to those cells that fluoresce blue. Also, cells in which I-SceI was present but in which the DNA had not been cleaved continued to express GFP. However, as can be seen in Figure 2F for SSR 2.0, the percentage of cells in which this happened was negligible: 24 hr after infection, 40% of the cells with the reporter were uncut, while after 48 hr, less than 1% of the report was uncut. In addition, at 48 hr, a smaller band corresponding to the joined molecule that had lost one copy of the I-SceI site as well as the intervening sequence began to accumulate (Figure 2F). It can be argued that any GFP protein produced before I-SceI cleavage would still be present in the cells. However, if this were true, RFP-positive cells would also be positive for GFP expression, at least in some cases. As can be seen in Figure 2E, we never observed such cells, implying that GFP expression measured in our reporters corresponded to GFP that was expressed after DNA repair had occurred.

Therefore, these reporters allow us to analyze the balance between homology-dependent and -independent repair by determining the percentage of green versus red cells in the population

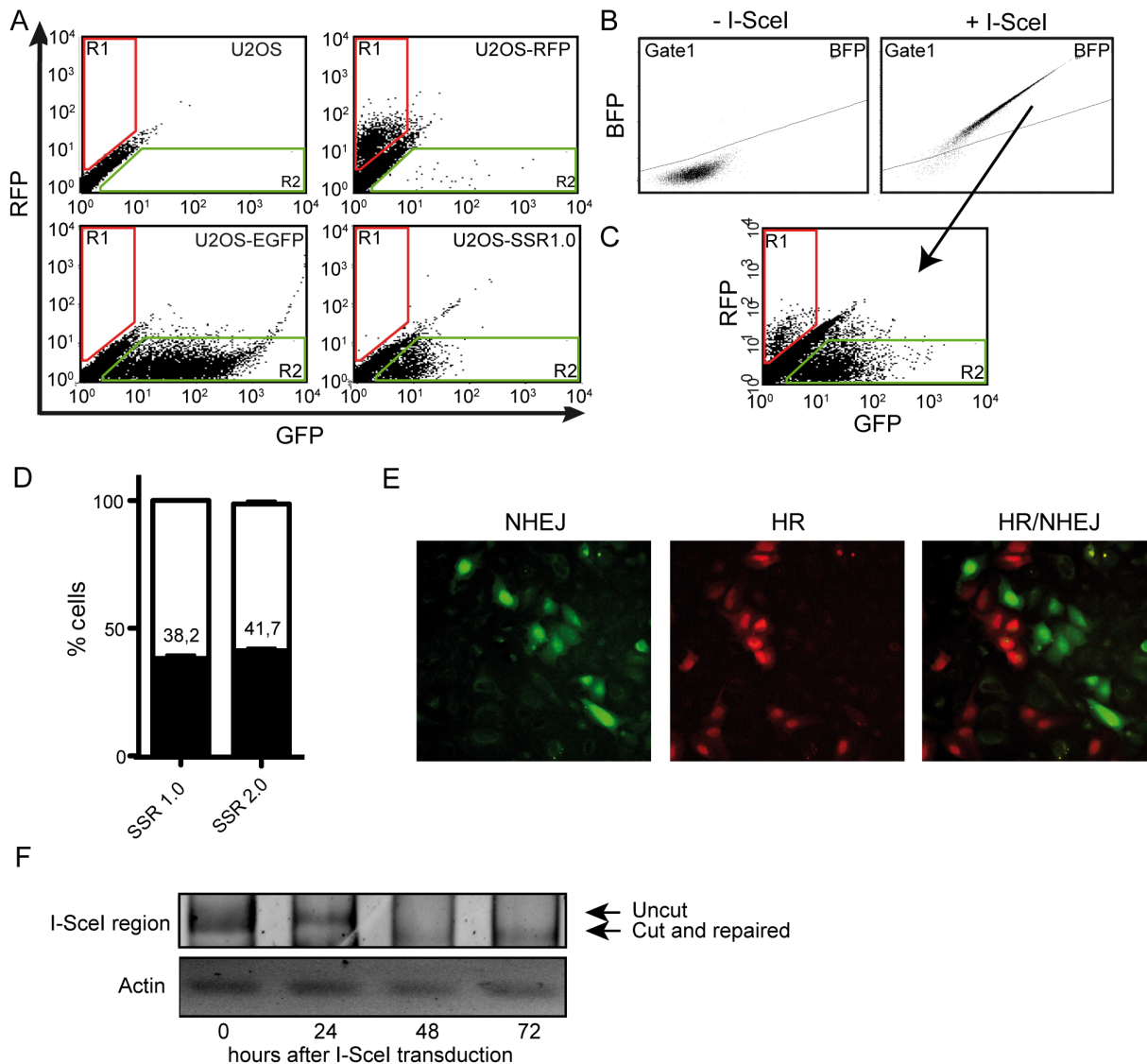
by FACS (Figures 2A–2D) or microscopy (Figure 2E). We decided to use a SSA reporter as an indicator of homology-mediated repair, rather than a classical recombination reporter, mainly due to its increased efficiency. Rad51-mediated recombination is a rare event, and we reasoned that it would be difficult to observe changes when compared with NHEJ. To analyze the effects of different cellular processes in the balance between DSB repair pathways, we stably integrated the reporter into U2OS cells. For our studies, we used clones that harbored single-copy integration of the reporters (Figure S1).

In a population of U2OS cells stably transfected with the SSR reporters, we observed cells that expressed green fluorescence above background levels even without I-SceI transfection (compare U2OS with U2OS-SSR 1.0 cells) Figure 2A; region 2, R2) These depicts cells with the SSR that constitutively expressed GFP. We also observed a low number of cells (less than 1%) that emitted red fluorescence (Figure 2A; region 1, R1), which we interpreted to be spontaneous SSA events that were not triggered by I-SceI cleavage. As mentioned above, we only analyzed cells that harbored the I-SceI-BFP construct (Figure 1D). Two days after I-SceI infection, we prepare the cells as described in the Methods section and analyzed them by FACS (Figure 2B and 2C) or microscopy (Figure 2E) for blue, green, and red fluorescence. Continuous expression of I-SceI for two days led to almost 100% cleavage of the reporter (Figure 2F). To calculate the balance between HR and NHEJ, we considered the cells that expressed the I-SceI–BFP construct (Figure 2B, gate 1). Those cells that fall into Gate1 are then analyzed for the appearance of red (in R1) or green fluorescence (in R2) (Figure 2C). We calculated the ratio between homology-mediated versus homology-independent repair (R1/R2) (Figure 2D). Similar results were obtained with the SSR 1.0 and SSR 2.0 reporters, indicating that repair balance is not strongly biased in any of the systems (Figure 2D) in control cells. We observed that for both reporters, and as measured both by FACS or microscopy, cells showed a 4:6 ratio of HR compared to NHEJ; i.e., 40% of the cells repair using the homologous sequence. Although this proportion might seem high for homology-mediated repair, it is worth pointing out that SSA is an extremely efficient pathway when compared to Rad51-mediated recombination [14,15].

As a proof-of-concept for the SeeSaw reporters, we next analyzed the impact of blocking established NHEJ and resection factors in repair balance. [6]. The extent of mRNA depletion obtained by shRNAs used in this work is shown in Figure 3. To facilitate comparison between different reporters and experiments, we normalized the HR/NHEJ ratio to the scramble control, and plotted the fold increase values side-by-side (see Methods for details; Figure 4). Any values greater than 1 represent a preference for homology-independent repair; values less than 1 mean a bias towards homology-dependent repair.

### Hindering NHEJ Drives Cells to Repair Via a Homology-driven Repair

It has been previously reported that impairing NHEJ drives cells to increase DNA-end resection and homologous recombination in several organisms [5,16–20]. Thus, we downregulated several key players of NHEJ, namely, the three subunits of the DNA-PK complex (DNA-PKcs, Ku70, and Ku80) and ligase 4 (Lig4). As expected, we observed a deviation of the balance towards an increase of homology-mediated repair (Figure 4, Tables S2 and S3). These results agree with previously published reports that indicate that, in the absence of NHEJ, DNA-end are unprotected, resection occurs, and the breaks are more prone to be repaired by homologous recombination [5,16–21]. Although we observed a

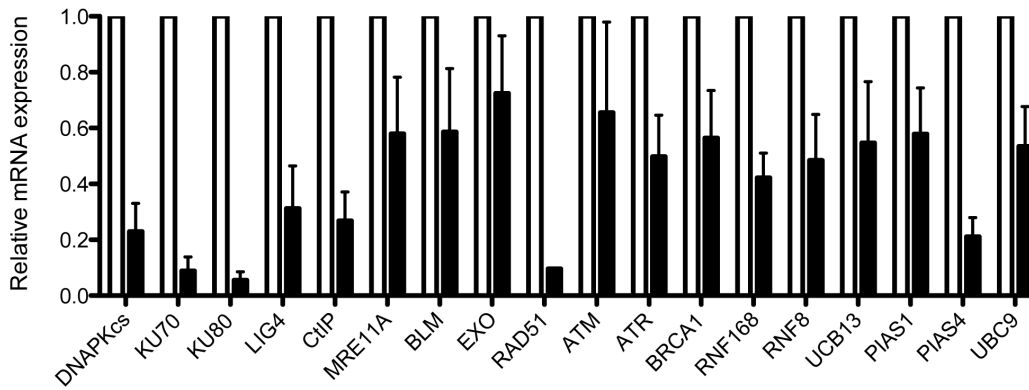


**Figure 2. Initial characterization of the SSR systems.** (A) Flow cytometer analysis of U2OS osteosarcoma cells transfected or not with control vectors, pEGFP and pHc-RFP, or the SSR 1.0 system. For quantification, two regions (R1 and R2) were established following the comparison of U2OS cells and cells transfected with control plasmids. R1 encompasses cells that fluoresce red above background levels, whereas R2 encompasses cells that fluoresce green above background levels. (B) Cells stably expressing the SSR 1.0 and an shRNA against a scrambled sequence were transfected or not with the I-SceI-BFP construct and analyzed for the presence of blue fluorescence. A gated region (gate1) was created to separate cells that expressed the BFP protein. (C) Cells from Figure 1D that fell into the gate1 region were analyzed for red or green fluorescence, using R1 and R2 as defined in Figure 2A. (D) Quantification by flow cytometry of the percentage of cells expressing GFP or RFP after I-SceI-BFP lentiviral infection in cells harboring the SSR 1.0 or SSR 2.0 systems and a scrambled shRNA. Percentages were calculated as R1 (black, HR) or R2 (white, NHEJ) versus cells that expressed any fluorescence (R1+R2). Data represent a minimum of three sets of duplicated experiments. Average percentage and standard error of HR events is shown. (E) A sample image under a fluorescent microscope of cells harboring the SSR 1.0 system of cells that were repaired by NHEJ (green) or HR (red). (F) PCR analysis of the cleavage efficiency and repair by NHEJ in the SSR 2.0 system. PCR products were obtained with oligonucleotides located at the end of the GFP gene and the beginning of the FP fragment (see Figure 1B). Cleavage with I-SceI impaired the PCR reaction, resulting in a reduction of the uncut fragment (see also Figure 1). Upon NHEJ repair, a new, faster migrating species appeared (cut-and-repaired fragment; see Figure 1B). A PCR product of the actin gene using the same genomic DNA was used as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0077206.g002

similar trend for both SSR 1.0 and 2.0, it was clearer in the latter (Figure 4). We believe this is due to the fact that accurate NHEJ in the SSR 1.0 system renders a functional I-SceI target site that can be re-cleaved. Thus, since only one cycle of break-repair takes place for SSR 2.0, the full extent of the role of NHEJ, including accurate and mutagenic, is discernable, whereas error-free repair renders a re-cleavable target site and favors mutagenic repair for SSR 1.0, making the picture less clear.

### DNA end Resection Controls the Balance between Homology-dependent and -Independent Repair

DNA end resection is the main process controlling the choice between DSB repair pathways by licensing HR and inhibiting NHEJ [4,5,9]. To validate our reporters, we analyzed the effect of hindering resection by protein depletion (Figure 4, Tables S4 and S5). shRNA-mediated depletion of cells for CtIP, BLM, or Exo1 strongly skewed our reporter towards NHEJ rather than HR, as

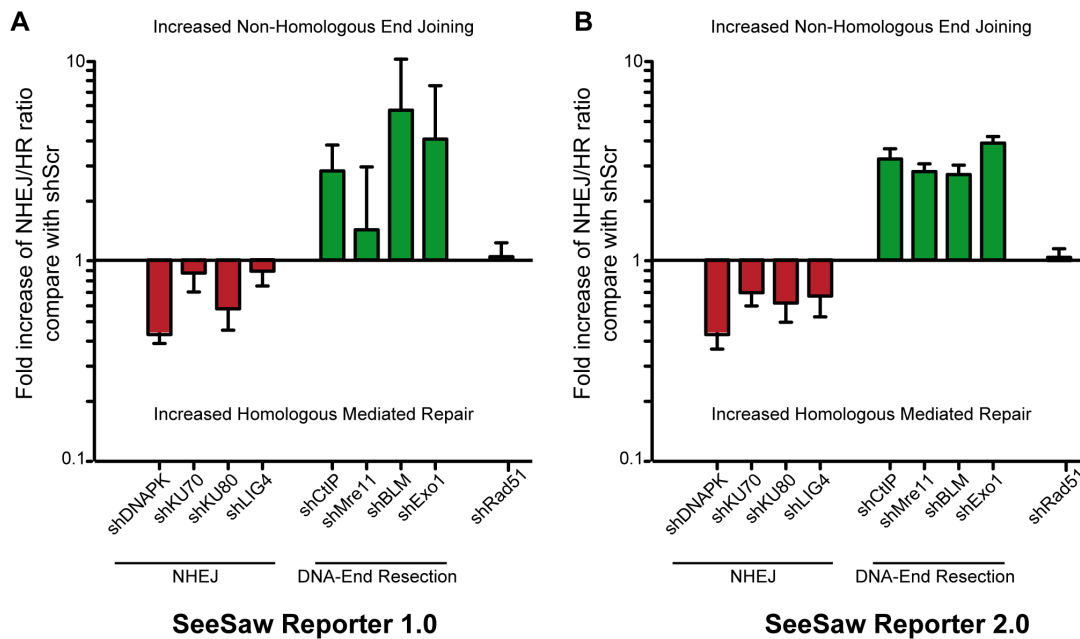


**Figure 3. Reduction of the RNA levels upon shRNA-mediated depletion against several target genes.** Quantitative RT-PCR data was measured for mRNA in cells stably transfected with the indicated shRNAs. The mRNA level of each gene was normalized to actin mRNA. The mRNA level of each gene in each cell line (black bars) was normalized to the levels in a cell line stably transfected with an shRNA with a scrambled sequence (white bars). Average and s.e.m. of a minimum of three experiments with triplicates is plotted.  
doi:10.1371/journal.pone.0077206.g003

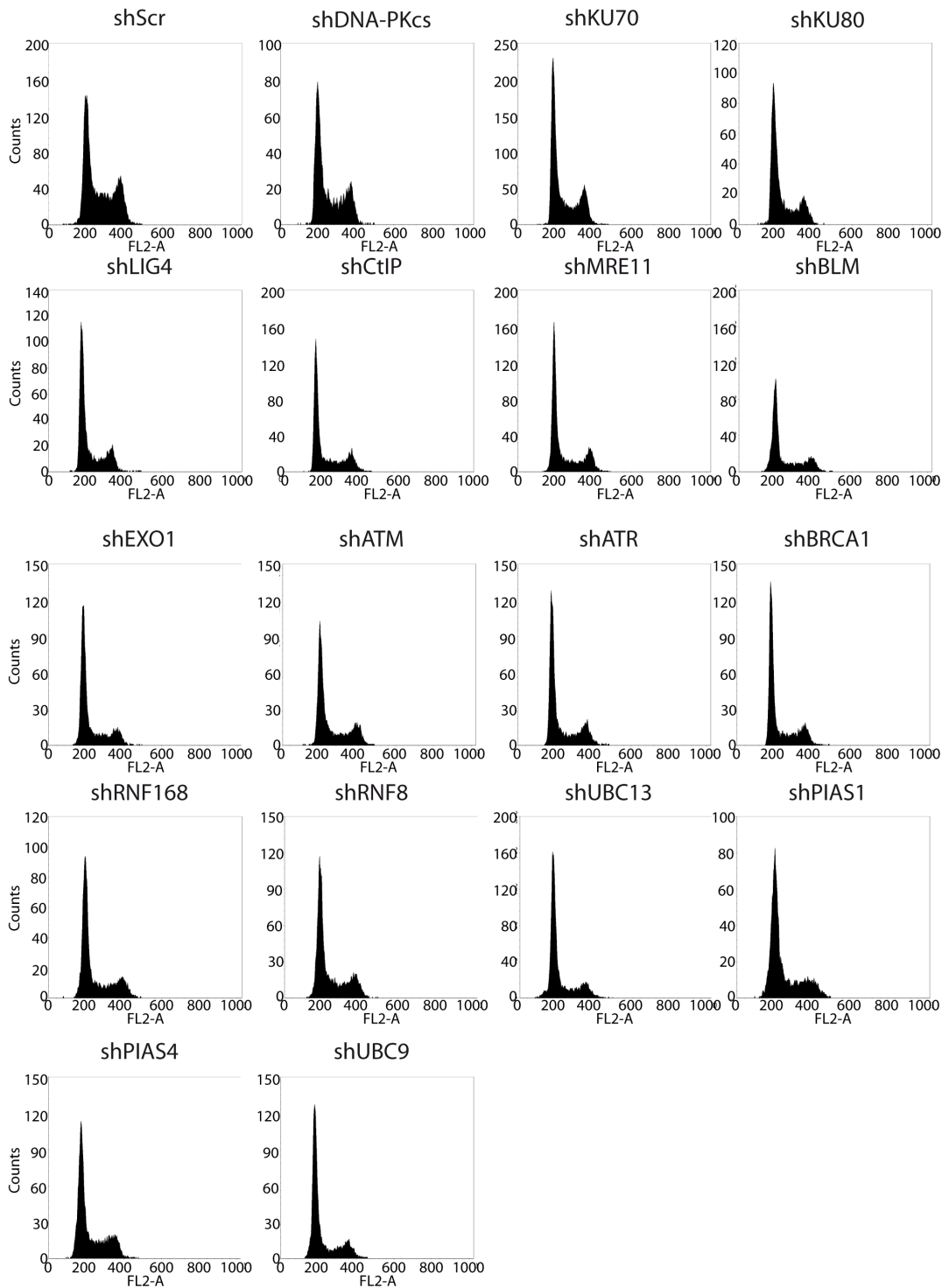
compared to control cells with a scrambled shRNA sequence. When we compared the HR/NHEJ ratio, normalized to that from the scrambled shRNA control, depletion of CtIP, BLM and Exo1 altered the ratio towards an increase in NHEJ (Figure 4). Therefore, this reporter responded strongly to both short-range and long-range DNA end resection. Mre11 has an essential role in short-range resection but has also been implicated in other processes, such as NHEJ, tethering both sides of the break, and DSB sensing and checkpoint activation [22]. Thus, the outcome of Mre11 depletion on DSB repair pathway choice is difficult to predict and highly complex, since it would negatively affect both NHEJ and HR. This is the type of question our reporters were

specifically designed to answer. When we depleted Mre11 in our cells, we observed a deviation of the balance towards NHEJ, demonstrating that Mre11 strongly favors homology-driven repair. (Figure 4). This effect is likely due to the role Mre11 plays in DNA end resection [22].

Thus, we confirmed that hindering DNA end resection clearly skews the balance towards NHEJ. Similar effects were observed after impairment of short-end and long-end resection (Figure 4). Importantly, although we did not observe qualitative differences between SSR 1.0 and SSR 2.0, we clearly distinguished quantitative differences.



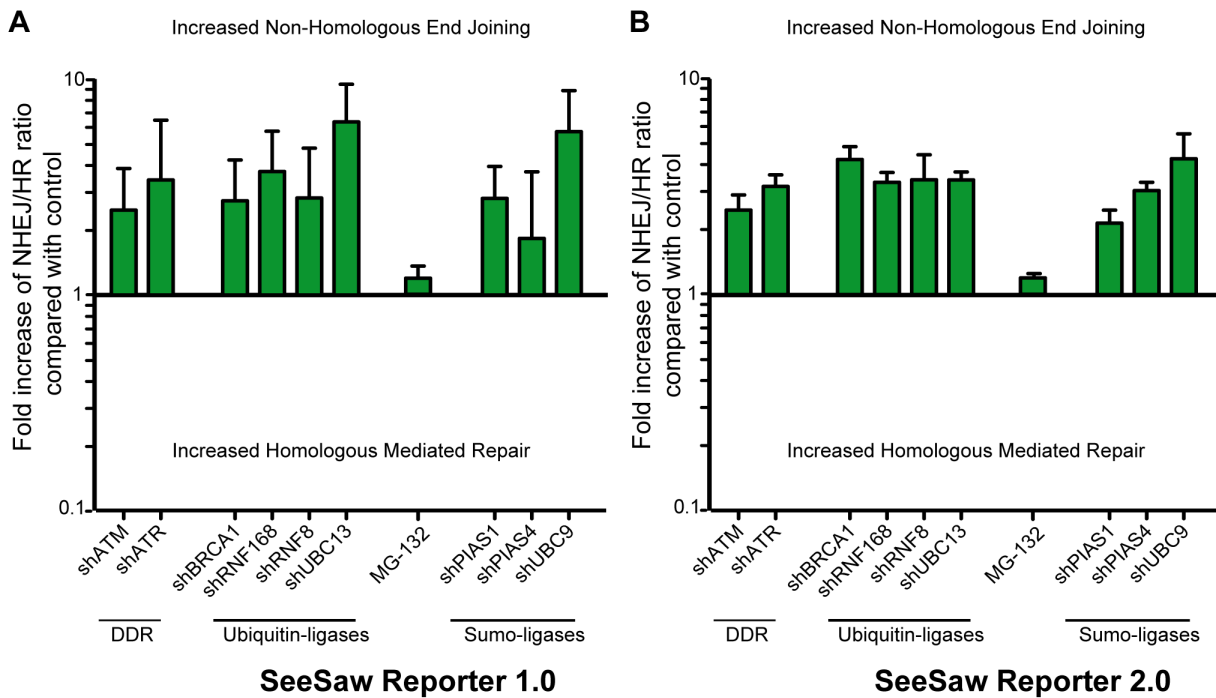
**Figure 4. Sensitivity of SSR systems to NHEJ and DNA end resection impairment.** Effects of shRNA-mediated depletion of core NHEJ or DNA end resection factors for the SSR 1.0 (A) and SSR 2.0 (B). To calculate the deviation from the balance between homology-dependent versus homology-independent repair, the ratio between green versus red cells in each condition was calculated. To facilitate comparing experiments, this ratio was normalized for each shRNA with a scrambled sequence shRNA as a control. Those shRNAs that skewed the balance towards an increase in homology-independent repair have a fold-increase of over 1 (green bars), while those with an increase in HR have a fold-decrease of less than one (red bars). Data represent a minimum of three sets of duplicated experiments.  
doi:10.1371/journal.pone.0077206.g004



**Figure 5. Cell cycle distribution after shRNA-mediated depletion of several target genes.** A representative FLOW cytometry plot after downregulation of the indicated target genes with shRNA is shown.  
doi:10.1371/journal.pone.0077206.g005

To confirm that the data obtained so far reflect the role of DNA end resection and NHEJ in DSB repair pathway choice, and that they were not due to spurious effects, we performed a rigorous series of controls. First, it has been demonstrated that the cell cycle is the major regulator of the election between homology-independent and homology-dependent repair [5,23–26]. Whereas

G1 cells can only use NHEJ, S and G2 cells can activate HR through a CDK-mediated licensing of DNA end resection [5,23–26]. We therefore analyzed cell cycle profiles of cells depleted for all the factors used in this study; we observed no differences that could explain the imbalance in repair pathway choice (Figure 5). As an additional control, we decided to deplete a protein related to



**Figure 6. DDR defects lead to an imbalance of the HR/NHEJ ratio.** The HR and NHEJ balance in the SSR 1.0 (A) and SSR 2.0 (B) in cells depleted of the checkpoint factors ATM, ATR, BRCA1, RNF169, RNF8, UBC13, UBC9, PIAS1, or PIAS4, or after MG-132 inhibition of proteasome activity. The details are as given in Figure 4, except that data for the MG-132 results were normalized to cells treated with DMSO as a control. doi:10.1371/journal.pone.0077206.g006

DSB repair that should have no effect on repair pathway choice, namely, Rad51. Rad51 is involved in late steps of homologous recombination, following the decision for HR or NHEJ [4,9,15]. More importantly, Rad51 is not involved in SSA [4,9,15], hence avoiding indirect effects due to the repair mechanism itself rather than pathway choice. Indeed, depletion of Rad51 had no effect on the SeeSaw reporters (Figure 4).

### The DNA Damage Response and the Regulation of DSB Repair Pathway Choice

The cellular context determines which is the best way to repair a DNA break. The coordination between DNA repair and cellular metabolism relies on a complex signal transduction cascade known as DNA damage response (DDR) [1,2]. We decided to investigate the role of different DDR factors on influencing the balance between HR and NHEJ.

DDR is initiated by a series of protein phosphorylation by two kinases, ATM and ATR [1,2]. shRNA-mediated depletion of either ATM or ATR resulted in a pronounced swing of the homology-mediated versus -independent repair balance, towards the latter (Figure 6). These results agree with a role of both ATM and ATR in favoring DNA end resection. DDR-mediated phosphorylation triggers the recruitment of multiple proteins to the vicinity of the breaks, including the E3-ubiquitin ligases RNF8, RNF168 and BRCA1. The activities of all three of these ligases are essential for DDR and DNA repair. Here, we showed that downregulation of RNF8, RNF168, or BRCA1 also skewed the balance towards NHEJ (Figure 6). This effect was specific for DNA damage-dependent ubiquitination, as similar (but more pronounced) results were obtained upon downregulation of the DNA damage-related E2 ubiquitin ligase UBC13 [27] (Figure 6), but general impairment of protein ubiquitination with the proteasome inhibitor MG132, which causes ubiquitin depletion, did not

significantly alter the HR/NHEJ balance (Figure 6). Additionally, sumoylation takes place at the sites of breaks due to the activity of the E2-sumo ligase UBC9 and the E3-sumo ligases PIAS1 and PIAS4 [28]. shRNA-mediated depletion of any of these also imbalanced the HR/NHEJ ratio towards NHEJ (Figure 6). Therefore, we conclude that DDR-mediated phosphorylation, ubiquitylation, and sumoylation are involved in the DSB pathway choice and are required for HR.

### Conclusions

In summary, we have designed specific reporters to study the balance between homology-directed and homology-independent repair of DSBs. These systems can be used to analyze in an unbiased way the effect of any factor on this repair pathway choice. This will allow us to isolate and characterize new factors involved in this regulation. For our reporters, it is irrelevant if a factor has an increased or reduced ability to perform either HR or NHEJ or both, since we instead study its role in maintaining the balance. Our systems could be applied to understand one specific factor or an entire pathway, or to genome-wide screenings and drug discovery. Moreover, our findings can be applied to increase gene-targeting efficiency, a beneficial tool for a broad audience in the biological sciences.

### Supporting Information

**Figure S1 Single-integration clones of the HRNH1.0 reporter.** A, Southern blot analysis of HRNH1.0 integration in selected clones. Red arrows show clones harboring a single copy of the reporter. B, Flow cytometer analysis of single copy clones to determine the basal expression of GFP and RFP fluorescence depending of the integration site. (TIF)



**Table S1 List of shRNA used in this work.**  
(DOCX)

**Table S2 Percentage of GFP and RFP expressing-cells from the BFP-positive pool in the SSR 1.0 system upon shRNA-mediated downregulation of NHEJ factors.**  
(DOCX)

**Table S3 Percentage of GFP and RFP expressing-cells from the BFP-positive pool in the SSR 2.0 system upon shRNA-mediated downregulation of NHEJ factors.**  
(DOCX)

**Table S4 Percentage of GFP and RFP expressing-cells from the BFP-positive pool in the SSR 1.0 system upon shRNA-mediated downregulation of DNA resection.**  
(DOCX)

**Table S5 Percentage of GFP and RFP expressing-cells from the BFP-positive pool in the SSR 2.0 system upon shRNA-mediated downregulation of DNA resection.**  
(DOCX)

**Table S6 Percentage of GFP and RFP expressing-cells from the BFP-positive pool in the SSR 1.0 system upon**

**shRNA-mediated downregulation of the DNA damage response.**  
(DOCX)

**Table S7 Percentage of GFP and RFP expressing-cells from the BFP-positive pool in the SSR 2.0 system upon shRNA-mediated downregulation of the DNA damage response.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

We want to thank Mike Certo and Andrew Scharenberg (University of Washington, Seattle, Washington, USA) for technical advice and the gift of the BFP-I-SceI construct, María José Quintero for technical help, Felix Prado and Felipe Cortes-Ledesma for critical reading of the manuscript and Veronica Raker for style corrections.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PH. Performed the experiments: DGC SJ MJFA. Analyzed the data: DGC SJ MJFA PH. Contributed reagents/materials/analysis tools: DGC SJ. Wrote the paper: PH.

## References

- Ciccía A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40: 179–204.
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078.
- Aguilera A, Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9: 204–217.
- Hartlerode AJ, Scully R (2009) Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* 423: 157–168.
- Huertas P (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 17: 11–16.
- Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283: 1–5.
- O'Driscoll M, Jeggo PA (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7: 45–54.
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77: 229–257.
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 44: 113–139.
- McVey M, Lee SE (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* 24: 529–538.
- Wang H, Rosidi B, Perrault R, Wang M, Zhang L, et al. (2005) DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 65: 4020–4030.
- Dynan WS, Yoo S (1998) Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 26: 1551–1559.
- Cao L, Xu X, Bunting SF, Liu J, Wang RH, et al. (2009) A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brcal deficiency. *Mol Cell* 35: 534–541.
- Fishman-Lobell J, Rudin N, Haber JE (1992) Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol* 12: 1292–1303.
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349–404.
- Chapman JR, Barral P, Vannier JB, Borel V, Steger M, et al. (2013) RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol Cell* 49: 858–871.
- Clerici M, Mantiero D, Guerini I, Lucchini G, Longhese MP (2008) The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO Rep* 9: 810–818.
- Escribano-Diaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, 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.
- Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, et al. (2007) Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 14: 639–646.
- Zierhut C, Diffley JF (2008) Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J* 27: 1875–1885.
- Munoz-Galvan S, Lopez-Saavedra A, Jackson SP, Huertas P, Cortes-Ledesma F, et al. (2013) Competing roles of DNA end resection and non-homologous end joining functions in the repair of replication-born double-strand breaks by sister-chromatid recombination. *Nucleic Acids Res* 41: 1669–1683.
- Stracker TH, Petrini JH (2011) The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 90–103.
- Aylon Y, Kupiec M (2004) New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* 566: 231–248.
- Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455: 689–692.
- Huertas P, Jackson SP (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* 284: 9558–9565.
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, et al. (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431: 1011–1017.
- Zhao GY, Sonoda E, Barber LJ, Oka H, Murakawa Y, et al. (2007) A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* 25: 663–675.
- Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, et al. (2009) Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462: 935–939.





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

Nucleic Acids Research 43(2):987-99. doi: 10.1093/nar/gku1384.

Jimeno S, Fernández-Ávila MJ, Cruz-García A, Cepeda-García C, Gómez-Cabello D, Huertas P

Fecha de publicación: 7 Enero 2015



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

Sonia Jimeno<sup>1,2,†</sup>, María Jesús Fernández-Ávila<sup>1,†</sup>, Andrés Cruz-García<sup>1,2</sup>,  
Cristina Cepeda-García<sup>1</sup>, Daniel Gómez-Cabello<sup>1</sup> and Pablo Huertas<sup>1,2,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento 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- $\mu$ 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 molecules 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 MgCl<sub>2</sub>, 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

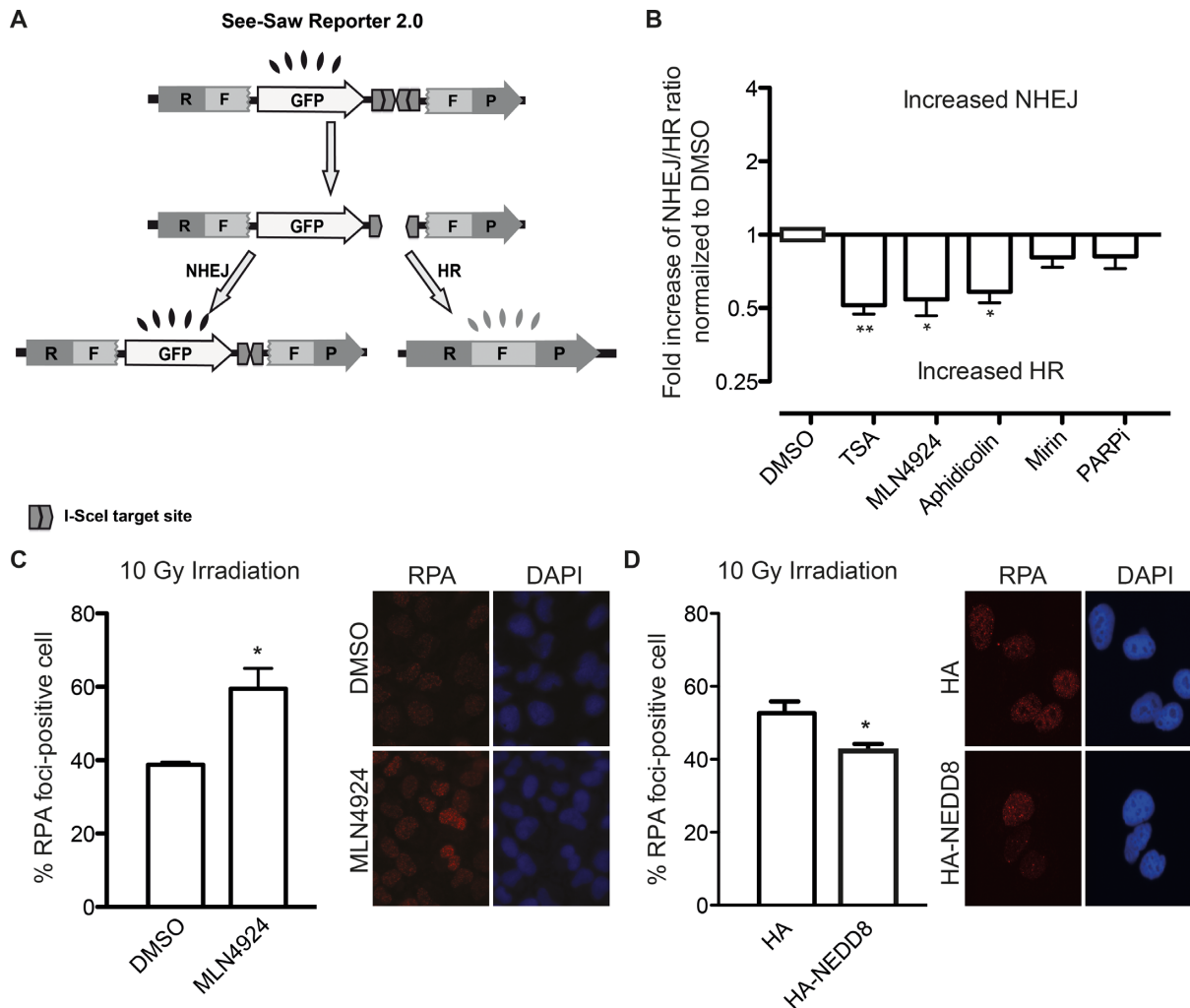
Statistical significance was determined with a paired *t* student test using the PRISM software (Graphpad Software, Inc.). Statistically significant difference was labeled with one, two or three asterisks if  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ , respectively. A Mann-Whitney test was used to detect 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  $\mu$ 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-

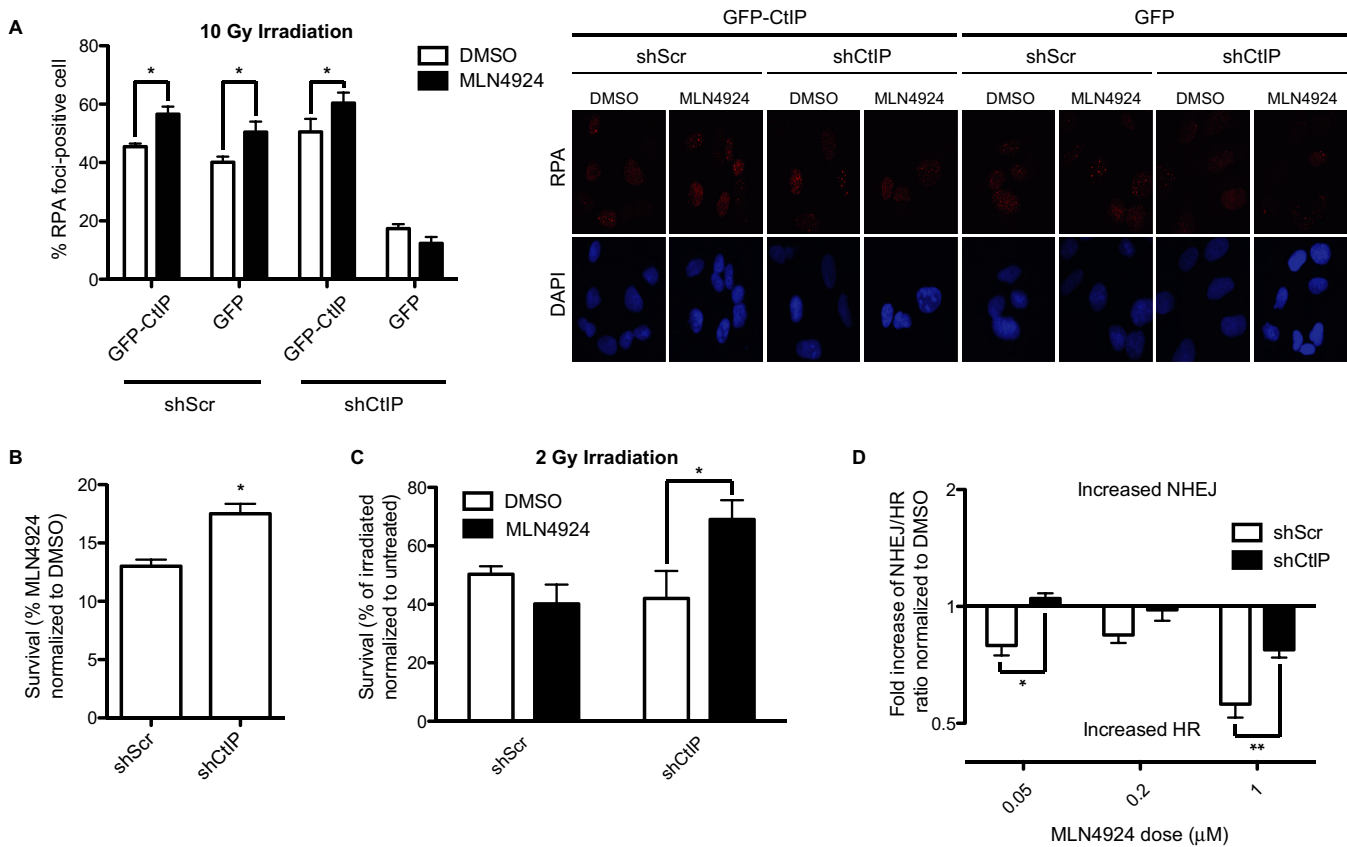
tIP depletion prevents the hyper-recombination phenotype of MLN4924 addition, albeit only partially at higher doses.

### 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.

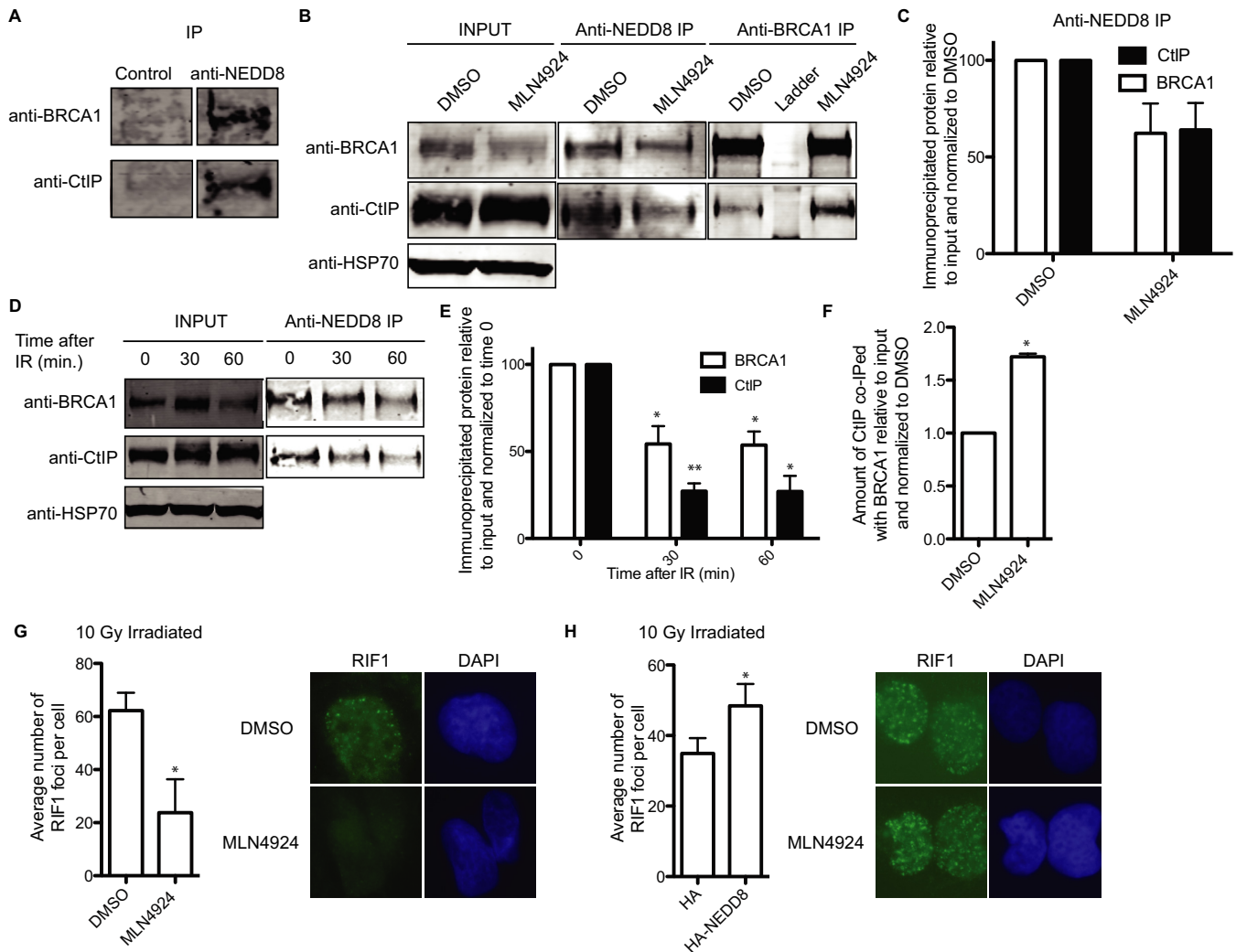
by an increase in RPA foci formation (Figure 4A; for an example of RNF111 depletion see Supplementary Figure S3C). The same results were observed with two different siRNA against RNF111 (Figure 4A). This was accompanied by a reduction in RIF1 foci (Figure 4B). As a consequence, and again in a similar 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

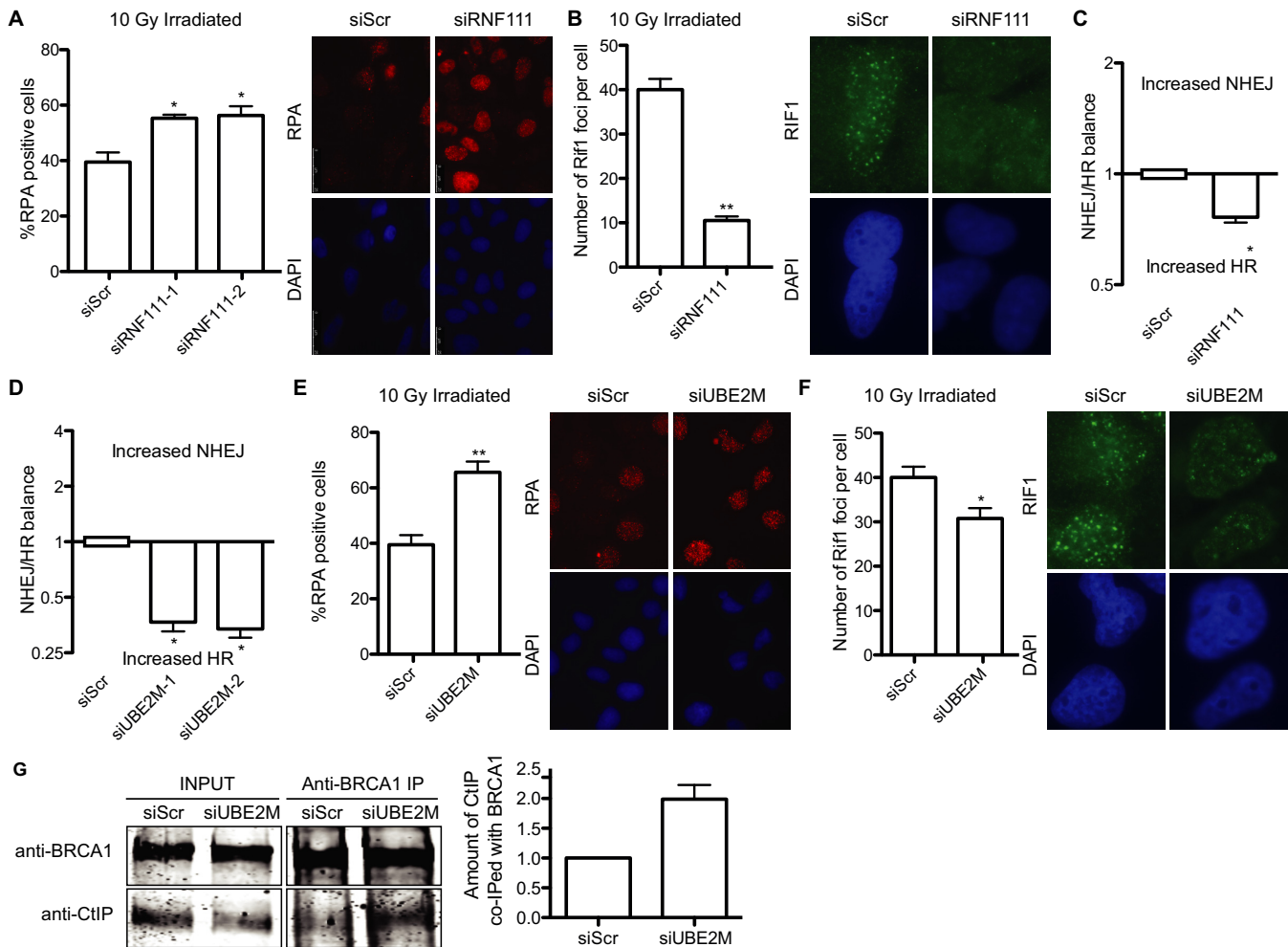




**Figure 3.** CtIP and BRCA1 complex formation is controlled by their interaction with neddylation. (A) CtIP and BRCA1 interact with neddylation. Protein extracts were divided into two and immunoprecipitated with an anti-NEDD8 antibody or a non-related IgG as a control and blotted with the indicated 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.

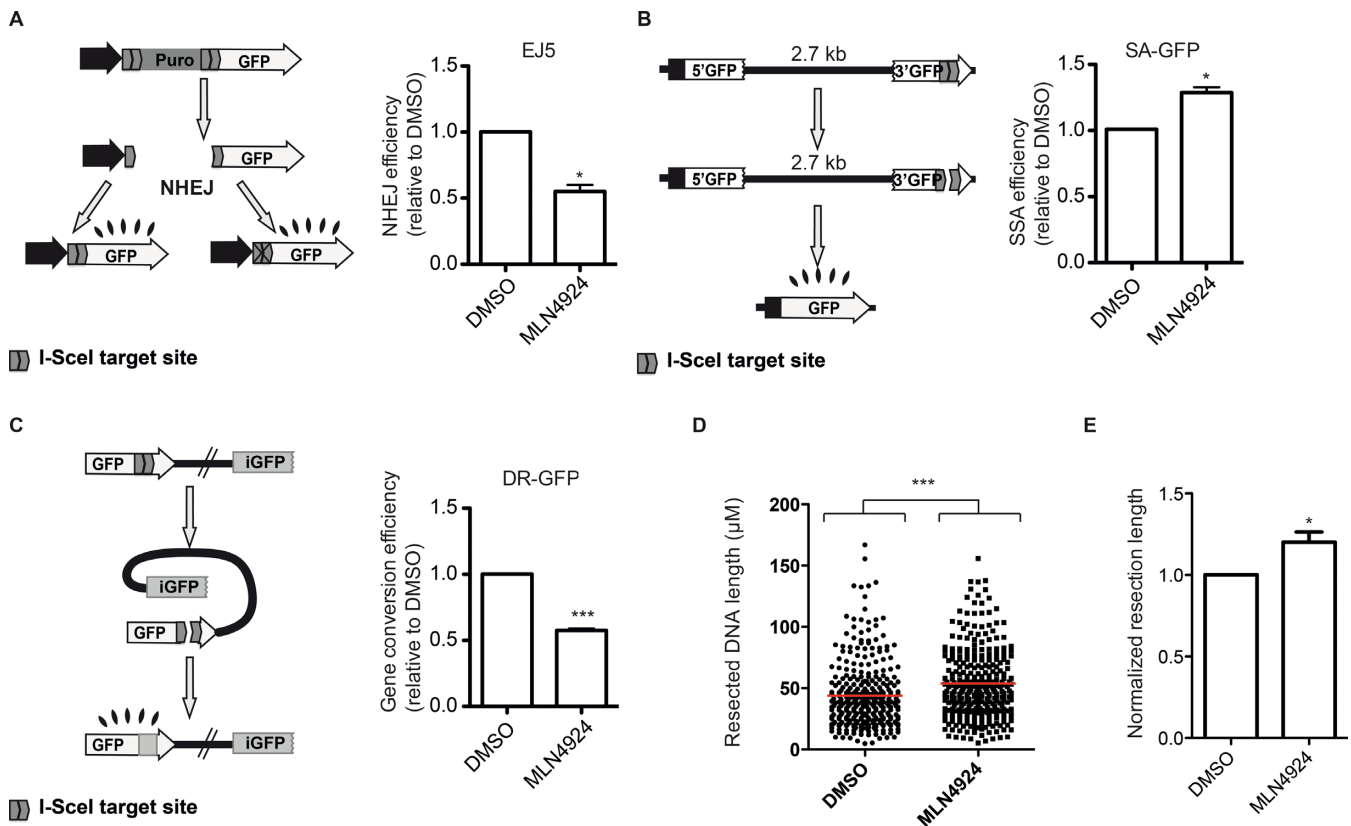
tion is an asynchronous process in the population, thus the length of resected DNA is heterogeneous, we observed that treatment with MLN4924 statistically changes the shape of the population (Figure 5D), and resected DNA tracks tend to be longer. In fact, we observed that neddylation inhibition causes 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.

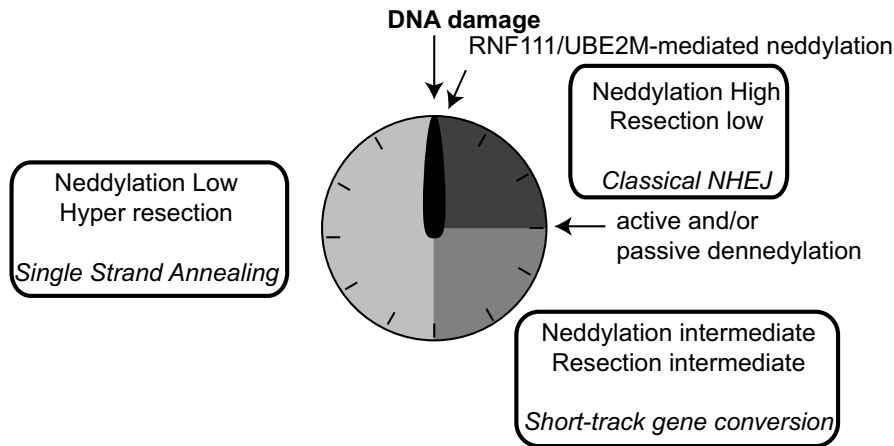
We also tested an inhibitor of PARP due to its established relationship with DSB repair. PARP1 inhibition blocks single strand break repair. Those unrepaired breaks are carried out to the next S-phase where they are converted to DSBs, and HR has been proved essential to repair them (33). Moreover, PARP1 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

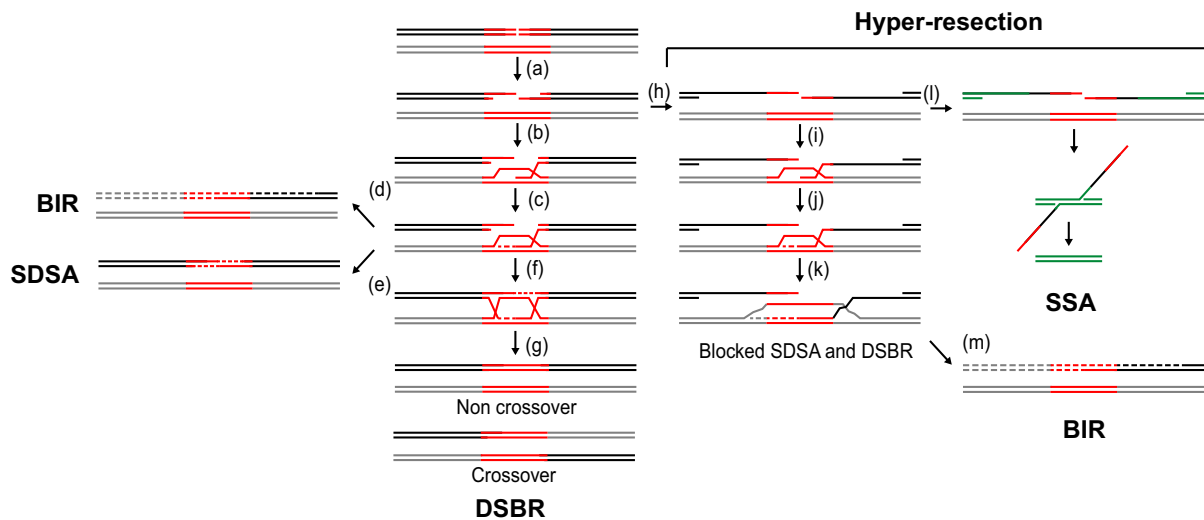
agreement with other reports that propose that resection by the MRN complex is based on the release of short ssDNA oligos produced by Mre11 endonuclease activity (35,37).

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 homolog (h; black versus gray lines). In such scenario, although DNA invasion (i) and DNA synthesis (j–k) might happen, a non-homolog 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., Martejijn, 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.**

Nucleic Acids Reserch 43(9):4517-30 doi: 10.1093/nar/gkv270.

Meir M, Galanty Y, Kashani L, Blank M, Khosravi R, Fernández-Ávila MJ, Cruz-García A, Star A, Shochot L, Thomas Y, Garrett LJ, Chamovitz DA, Bodine DM, Kurz T, Huertas P, Ziv Y, Shiloh Y.

Fecha de publicación: 8 Abril 2015



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

Michal Meir<sup>1</sup>, Yaron Galanty<sup>1,\*</sup>, Lior Kashani<sup>1</sup>, Michael Blank<sup>1</sup>, Rami Khosravi<sup>1</sup>, María Jesús Fernández-Ávila<sup>2</sup>, Andrés Cruz-García<sup>2</sup>, Ayelet Star<sup>1</sup>, Lea Shochot<sup>1</sup>, Yann Thomas<sup>3</sup>, Lisa J. Garrett<sup>4</sup>, Daniel A. Chamovitz<sup>5</sup>, David M. Bodine<sup>4</sup>, Thimo Kurz<sup>3</sup>, Pablo Huertas<sup>2</sup>, Yael Ziv<sup>1,\*</sup> and Yosef Shiloh<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>The 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, <sup>2</sup>Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) and Department of Genetics, University of Sevilla, Sevilla, 41092, Spain, <sup>3</sup>MRC Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, DD1 5EH, Scotland, UK, <sup>4</sup>Genetics and Molecular Biology Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 20892, USA and <sup>5</sup>Department 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-PKs), 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 Zn<sup>2+</sup>-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% CO<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> 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 (γH2AX) 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,  $\gamma$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>®</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml G418 and 0.2  $\mu$ M fialuridine. 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

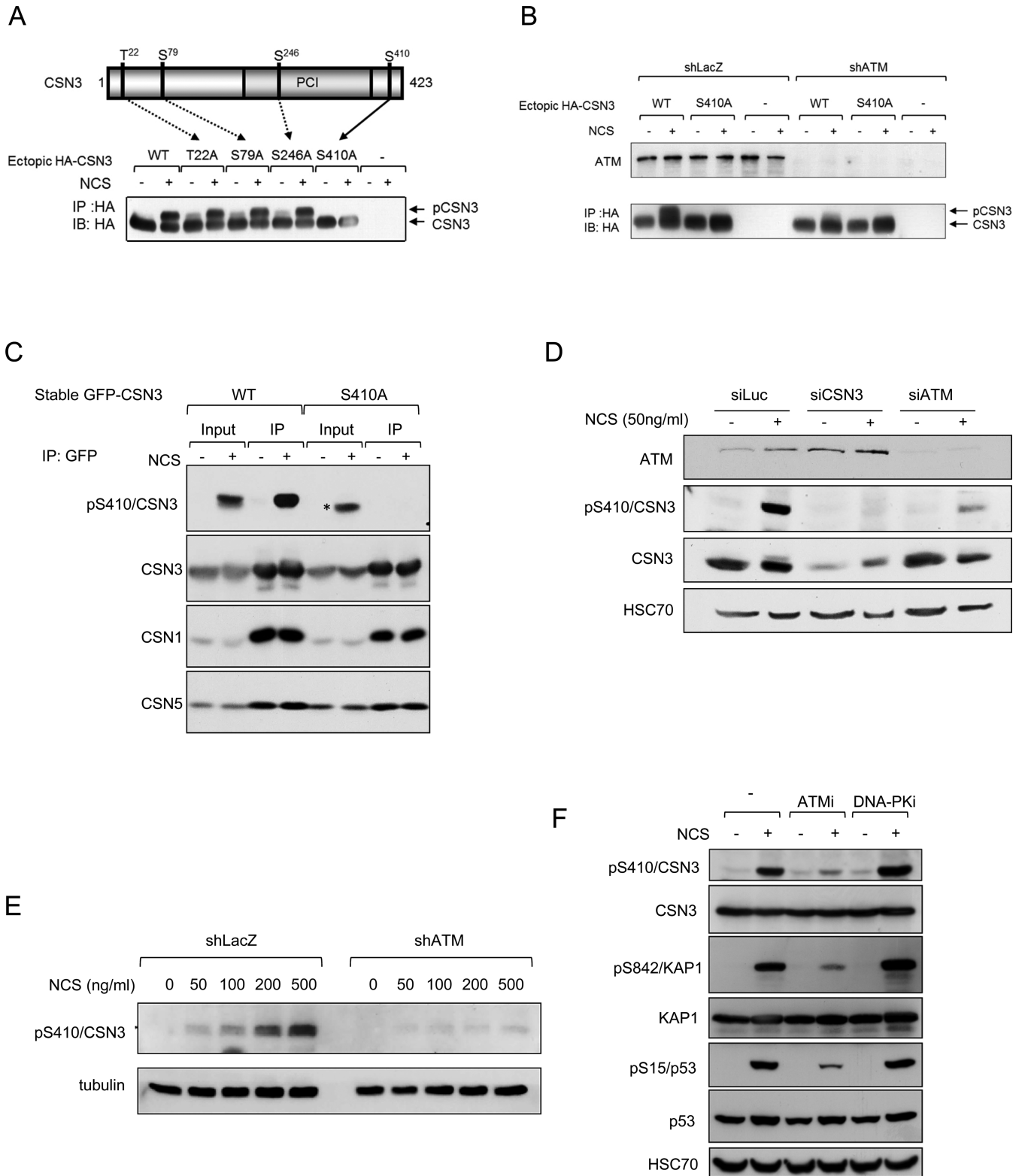
Early studies of the ATM protein in our lab included a search for ATM-interacting proteins using the two-hybrid assay. A bait spanning ATM residues 1184–1583, which contain a leucine zipper—a protein-protein interaction motif—identified CSN subunit 8 (CSN8) as prey (Supplementary Figure S1A). Co-immunoprecipitation 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.

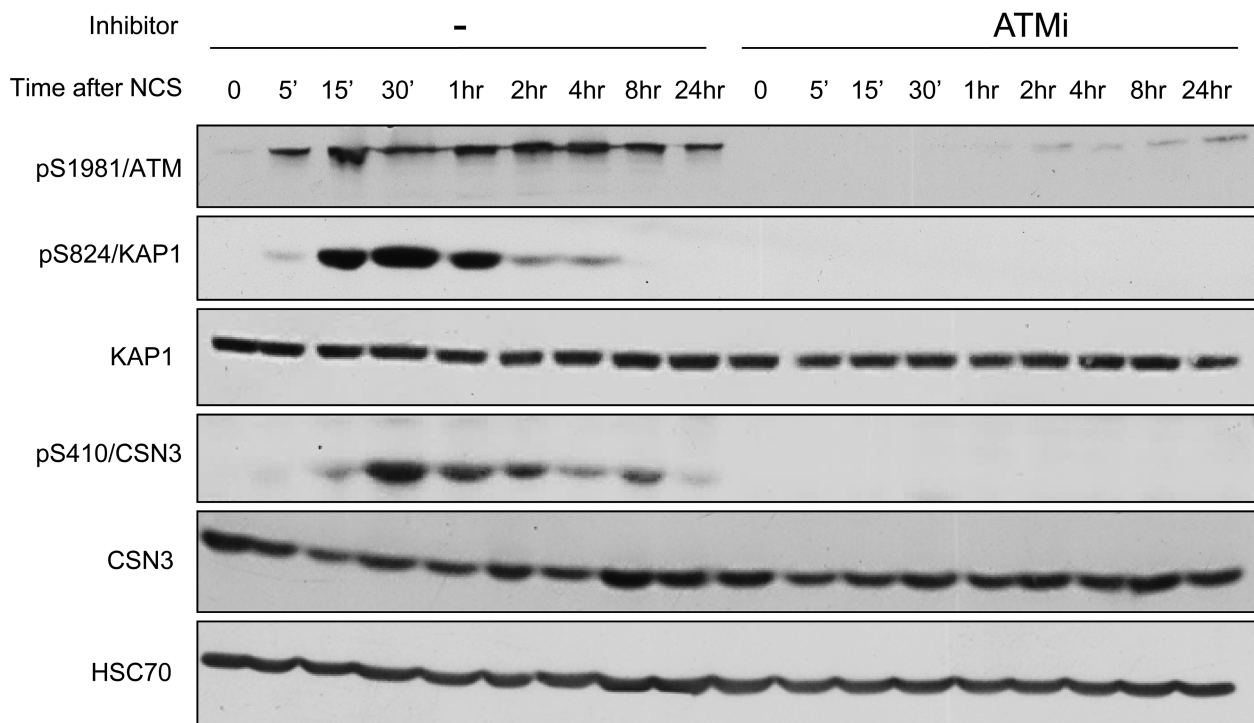
### CSN is required for regulation of DSB repair

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



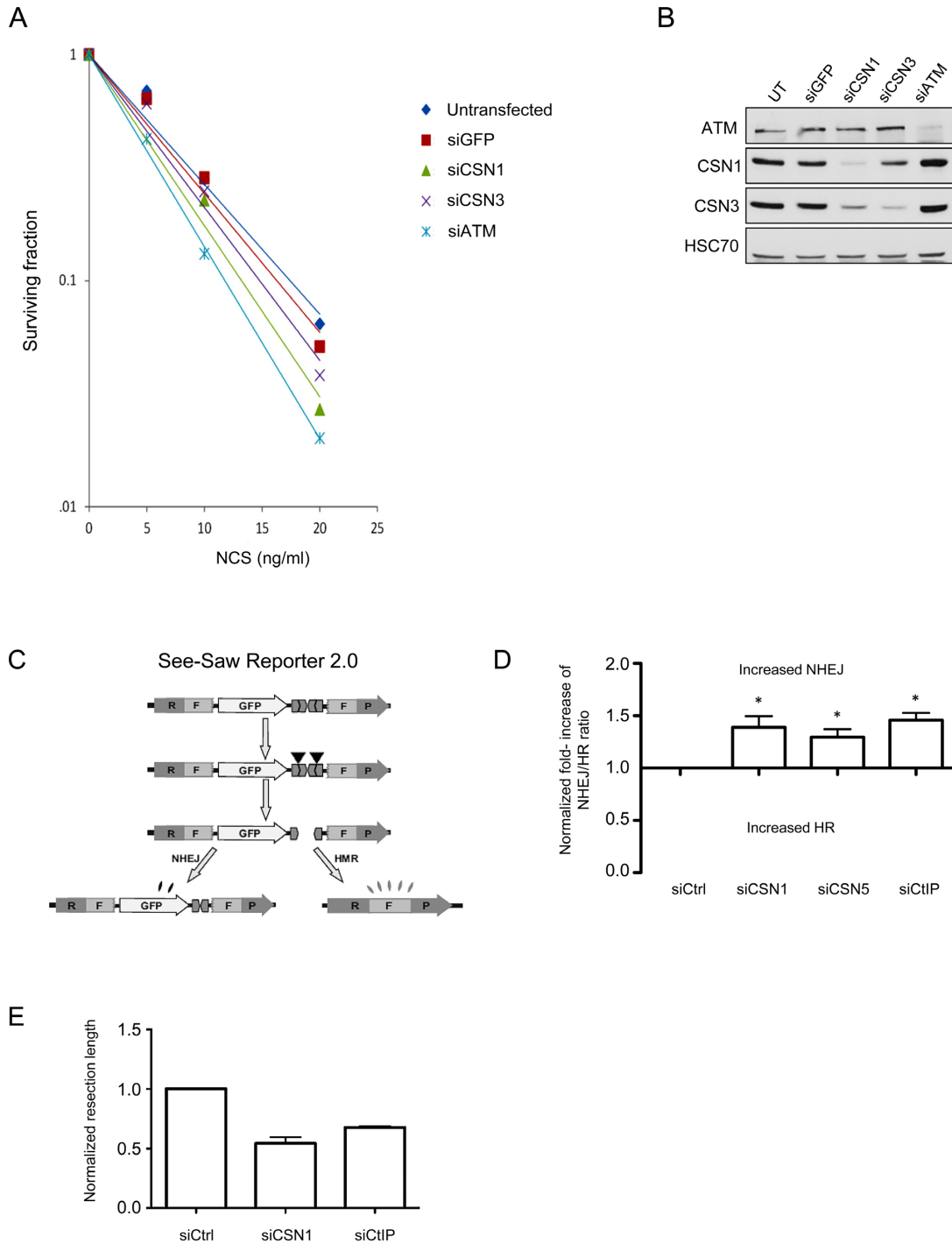
**Figure 1.** CSN3 is an ATM substrate in the DNA damage response. (A) Mapping of the phosphorylation site on CSN3. Potential ATM targets in this protein (serine or threonine residues followed by glutamine) were mutated in recombinant HA-tagged CSN3, and the various versions of the protein were expressed 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  $\mu$ M concentration. DNA-PKi: the DNA-PK inhibitor, NU7441 (42) applied at 10  $\mu$ 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.

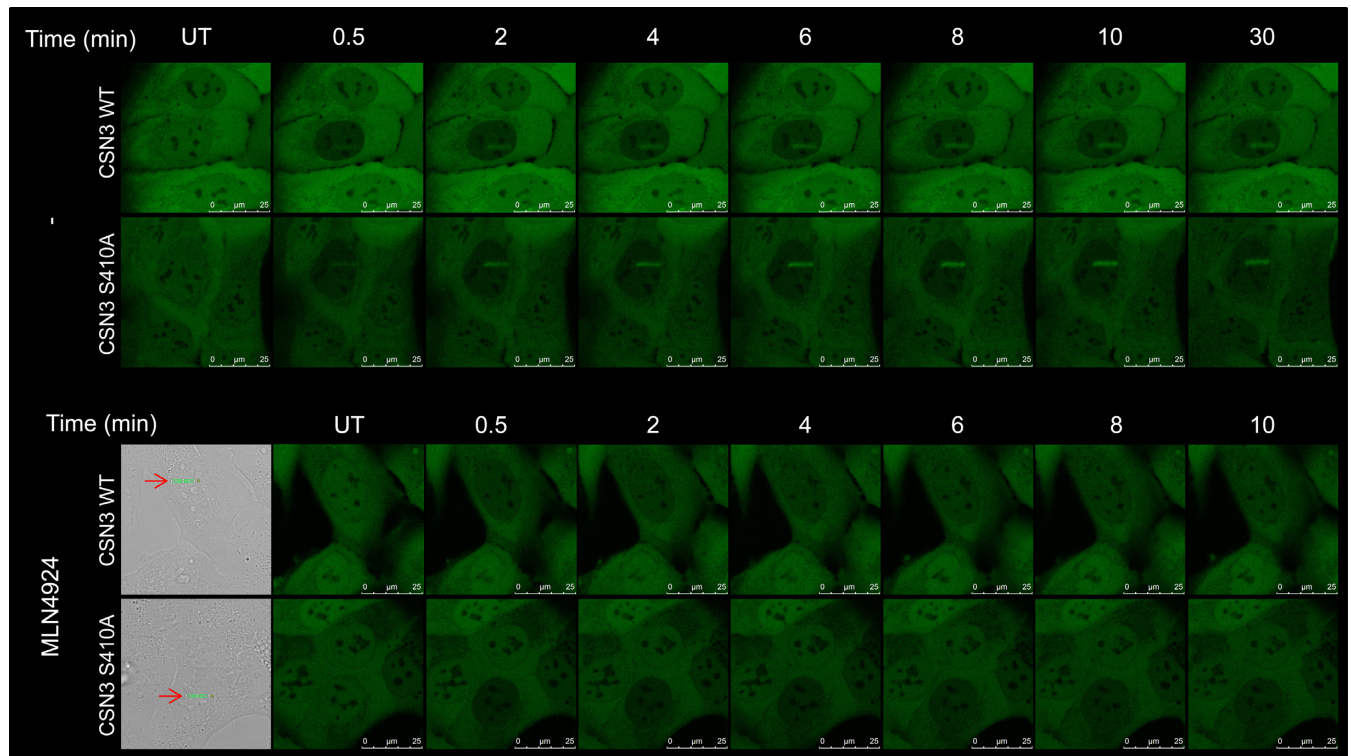
### Cullin 4A partners with CSN in the DSB response

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  $\mu$ 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*<sup>-/-</sup> 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 ( $\gamma$ 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,

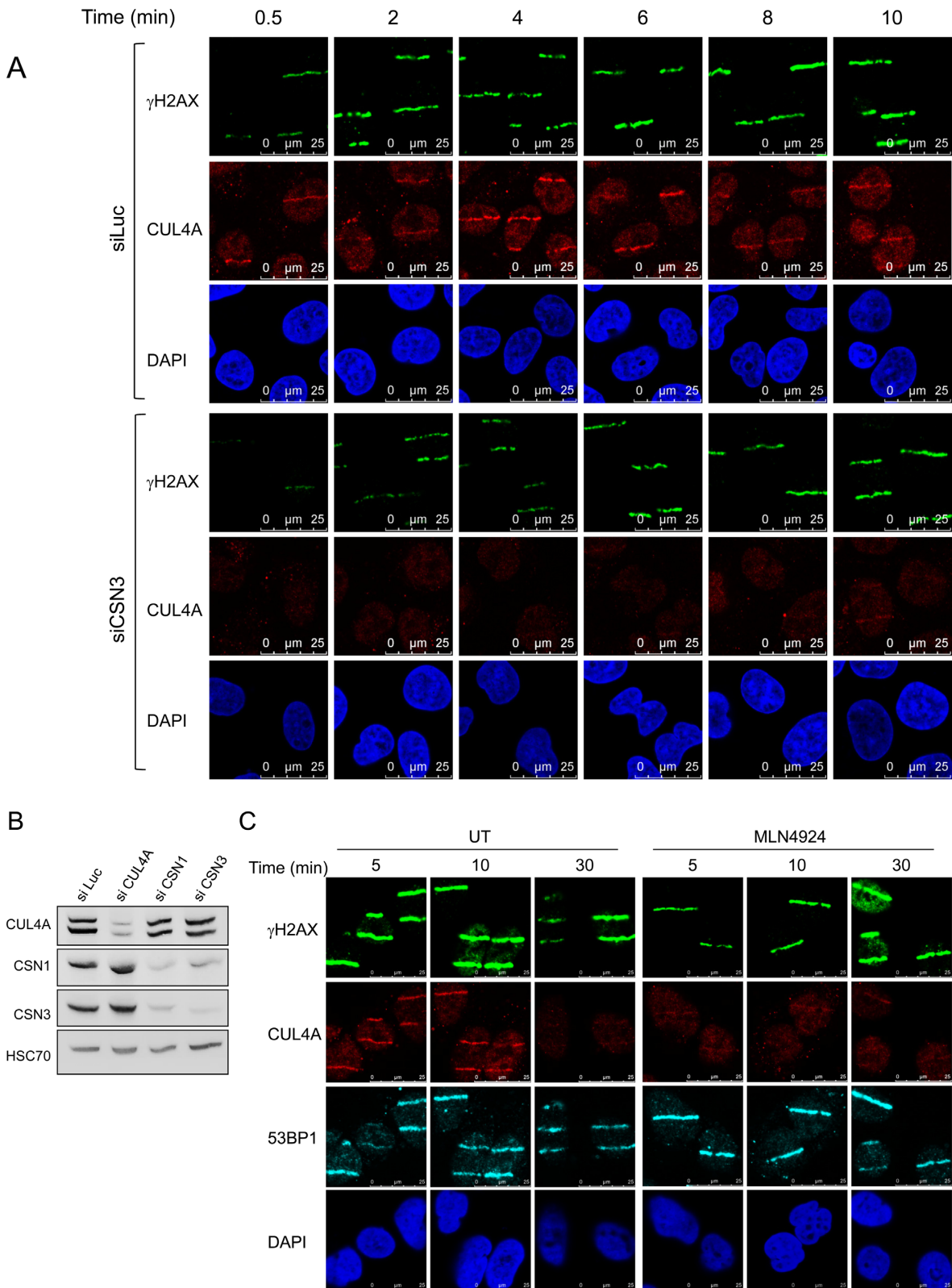
at various time points following IR treatment, the fraction of cells with Rad51 nuclear foci in the mutant MEFs was significantly lower than in wild-type cells (Figure 5F), attesting to a reduction in deep end-resection at DSB sites in the mutant MEFs. The organismal and cellular phenotypes associated 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

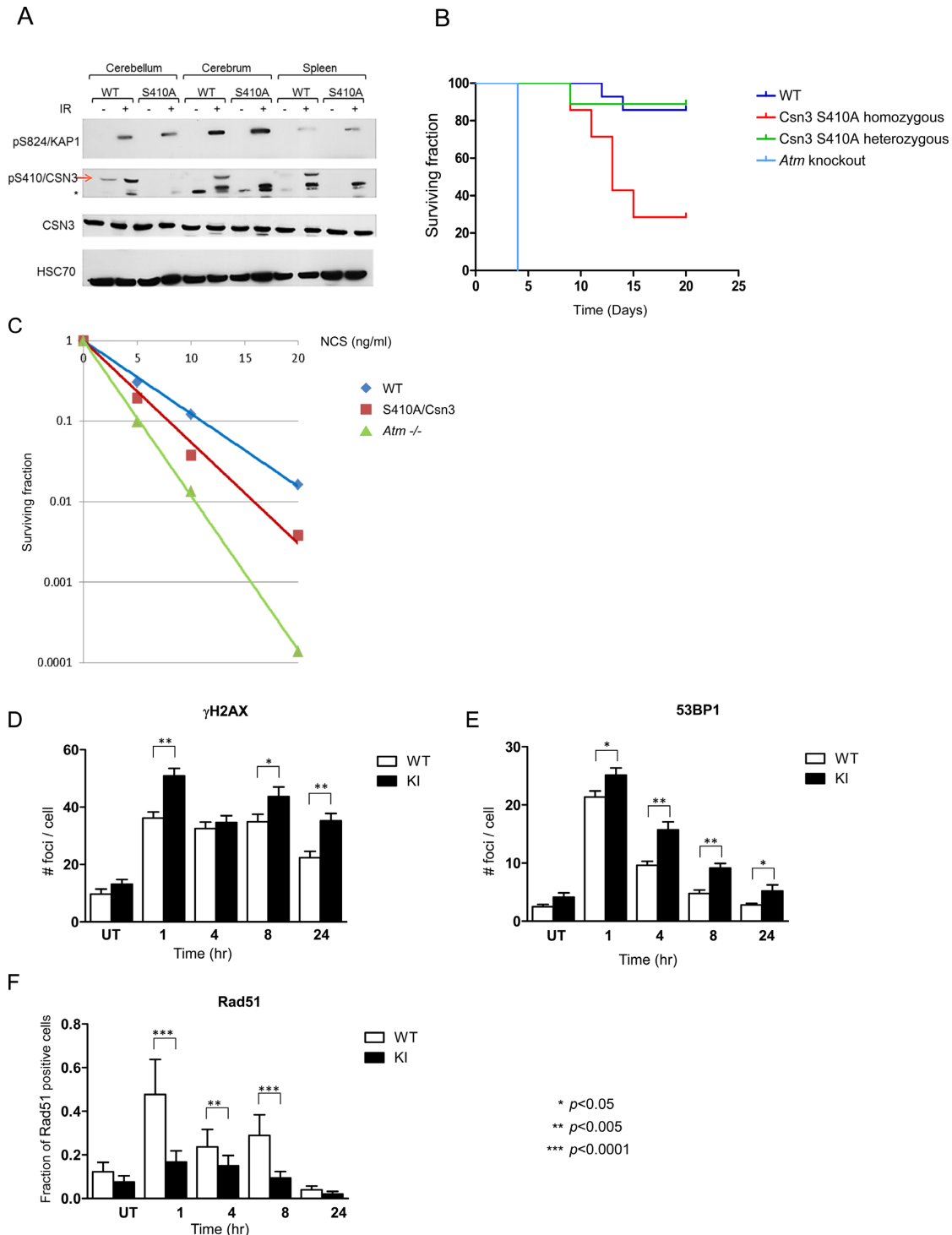
Our results establish CSN as a new, crucial player in the cellular response to DSBs, and place it at a critical decision point in DSB repair, together with CRL4. Furthermore, we show that the loss of a single ATM-mediated phosphorylation on one CSN subunit is sufficient to affect the organismal and cellular 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  $\mu$ 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  $\gamma$ 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  $\gamma$ 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  $\gamma$ H2AX, 53BP1 and  $\chi^2$  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<sup>DDB2</sup> 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  $\alpha$ -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 Cull1 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.