



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Estudio sobre la respuesta transcripcional al daño al ADN y el rol del sistema NER y la proteína quinasa ATR

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Licenciado Juan Cristóbal Muñoz

Director de tesis: Dr. Manuel Javier Muñoz

Consejera de Estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE, UBA-CONICET)

22 de Abril de 2025, Buenos Aires, Argentina

Estudio sobre la respuesta transcripcional al daño al ADN y el rol del sistema NER y la proteína quinasa ATR

Resumen

La transcripción es un proceso altamente regulado cuya correcta progresión es crucial para la vida. En humanos, la ARN Polimerasa II (RNAPII) sintetiza tanto ARN mensajeros como diversos ARN no codificantes, y tiene un rol central en la transcripción. En respuesta al daño al ADN se producen cambios globales en la transcripción que implican una reducción generalizada de la síntesis de ARN, así como la inducción de un programa transcripcional específico de respuesta al daño. En esta tesis doctoral nos propusimos investigar los mecanismos moleculares que controlan esta respuesta.

El sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) reconoce y repara diversos tipos de lesiones en el ADN, como aquellas generadas por exposición a luz ultravioleta de alta energía (UVC). Ha sido propuesto que la vía de Reconocimiento Acoplada a la Transcripción (TC-NER) estimula la degradación de RPB1, la subunidad mayor y catalíticamente activa del complejo RNAPII. Así, se postula que la degradación de RPB1 es consecuencia de la detención de la RNAPII en el daño. De esta manera, la degradación de RPB1 facilitaría el acceso de factores NER necesarios para la posterior reparación del ADN. Por otra parte, el reconocimiento del daño por TC-NER es complementado por el Reconocimiento Global del Genoma (GG-NER), en el que las lesiones son reconocidas por los factores XPC y DDB2. En esta tesis de doctorado demostramos que la degradación de RPB1 es controlada por una vía de señalización dependiente del sistema NER de manera secuencial: primero a través del reconocimiento del daño por el sistema TC-NER, activo inmediatamente luego de la inducción del daño, y luego, a tiempos más largos, por el sistema GG-NER. Además, demostramos que la reparación incompleta de las lesiones estimula la degradación de RPB1, indicando que la señal que controla la abundancia de RPB1 comienza con el reconocimiento del daño, y continúa hasta la finalización de la reparación. En concordancia con un mecanismo de degradación *in trans* a la lesión, demostramos que la degradación de RPB1 no está restringida a moléculas de RPB1 transcripcionalmente activas, ni fosforiladas, y depende de la familia de E3 ligasas de ubiquitina del tipo Cullin-RING. Estos resultados revelan un mecanismo dependiente de la reparación que controla los niveles de RPB1, y proporcionan una explicación para el control de la respuesta transcripcional al daño al ADN, donde más daño implica más reparación y por lo tanto menores niveles proteicos de RPB1, lo que restringe la actividad de la RNAPII.

Si bien el daño al ADN reprime globalmente la transcripción mediante la degradación de RPB1, también induce un programa específico de expresión génica que escapa a esta represión. En el pasado postulamos que el reconocimiento del daño a través del sistema NER estimula la activación de la quinasa ATR, promoviendo la disminución de la tasa de elongación transcripcional. Si bien ATR es conocida por su rol en la estabilización de horquillas de replicación arrestadas durante la fase S del ciclo celular, en esta tesis doctoral demostramos que ATR se activa a través del sistema NER durante la fase G1 y fosforila diversas subunidades del complejo Mediador, regulando de esta manera la expresión génica.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis doctoral revelan nuevos mecanismos de regulación transcripcional frente al daño al ADN, coordinados por la activación del sistema NER y la quinasa ATR.

PALABRAS CLAVE: TRANSCRIPCIÓN, RNAPII, DAÑO AL ADN, NER, ATR, COMPLEJO MEDIADOR

Study on the transcriptional response to DNA damage and the role of the NER system and ATR Kinase

Abstract

Transcription by RNA polymerase II (RNAPII) is a tightly regulated process essential for cellular homeostasis. RNAPII synthesizes both messenger RNAs and various non-coding RNAs, playing a central role in gene expression. Upon DNA damage, cells undergo global transcriptional changes that include a widespread reduction in RNA synthesis, along with the activation of a specific transcriptional program required to cope with genotoxic stress. In this doctoral thesis, we aimed to investigate the molecular mechanisms that regulate these transcriptional responses.

The Nucleotide Excision Repair (NER) pathway is responsible for recognizing and repairing a wide range of DNA lesions, including those induced by high-energy ultraviolet radiation (UVC). It has been proposed that Transcription-Coupled NER (TC-NER) promotes the degradation of RPB1, the largest and catalytically active subunit of the RNAPII complex. This model suggests that RPB1 degradation occurs as a consequence of RNAPII stalling at DNA lesions, and facilitates the recruitment of NER repair factors required for DNA processing and repair. In addition to TC-NER, damage recognition is also mediated by Global Genome NER (GG-NER), where lesions are detected by the XPC and DDB2 factors. Here, we demonstrate that RPB1 degradation is orchestrated by an NER-dependent signaling pathway that proceeds in a sequential manner: immediately after damage induction through TC-NER, and subsequently, at later time points, via GG-NER. Moreover, we found that incomplete DNA lesion repair sustains RPB1 degradation, indicating that the signal controlling RPB1 levels is initiated by DNA damage recognition and persists until repair completion. Consistent with an *in trans* degradation mechanism, we show that RPB1 degradation is not restricted to transcriptionally active or phosphorylated RPB1 molecules and requires Cullin-RING ubiquitin E3 ligases. These findings reveal a NER-dependent mechanism that regulates RPB1 levels and provide a framework to understand how the transcriptional response is modulated following DNA damage. In this model, increasing DNA damage levels enhance repair activity, resulting in reduced RPB1 hence restricting RNAPII activity.

Although DNA damage globally represses transcription through RPB1 degradation, it also induces a distinct transcriptional program that bypasses this repression. We previously proposed that DNA damage recognition through the NER pathway activates the ATR kinase, globally reducing the RNAPII elongation rates. While ATR is best known for its role in stabilizing stalled replication forks during S-phase, here we demonstrate that ATR is also activated via the NER pathway during G1 and phosphorylates several subunits of the Mediator complex, thereby contributing to the regulation of gene expression.

Together, the results presented in this doctoral thesis unveil novel transcriptional regulatory mechanisms triggered by DNA damage, coordinated by the activation of the NER pathway and ATR kinase.

KEYWORDS: TRANSCRIPTION, RNAPII, DNA DAMAGE, NER, ATR, MEDIATOR COMPLEX

Índice

PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO:	11
LISTADO DE ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	14
Introducción general	14
Capítulo 1: Regulación de la expresión génica	16
Conceptos generales sobre la Transcripción	16
El procesamiento de los ARN	18
La ARN Polimerasa II	20
Reclutamiento de la RNAPII a la cromatina y la formación del complejo de pre-iniciación	23
El inicio de la transcripción y el pausado en el promotor	25
La elongación transcripcional	26
La terminación de la transcripción	29
El complejo Mediador	30
Capítulo 2: El daño al ADN y la reparación por el sistema NER	35
El daño al ADN y los sistemas de reparación	35
El sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)	36
Reconocimiento global del genoma (GG-NER)	39
Reconocimiento acoplado a la transcripción (TC-NER)	40
Reparación del daño por el sistema NER	41
Ubiquitinación de RNAPII	44
Degradación de RNAPII: ¿Un último recurso?	45
Respuesta transcripcional a la irradiación con UV	50
Capítulo 3: La Respuesta al Daño al ADN (DDR) y el rol de la quinasa ATR	54
Los efectores centrales de la DDR	54
ATM	56
ATR	57
Rol de ATR en la regulación transcripcional y la apoptosis	59

OBJETIVOS	61
RESULTADOS	62
Sección 1: Rol del sistema NER en la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN	62
Establecimiento del modelo de estudio	62
Generación y caracterización de una línea celular deficiente en el sistema GG-NER	65
El sistema TC-NER controla la degradación de RPB1.....	67
El sistema GG-NER controla la degradación de RPB1.....	68
La reparación por el sistema NER induce la degradación de RPB1	71
La degradación de RPB1 mediada por GG-NER es independiente de la transcripción y ocurre <i>in trans</i> respecto a la lesión	77
La degradación de RPB1 mediada por el sistema NER depende de E3 ligasas de la familia CRL	79
Regulación transcripcional en células deficientes en el sistema NER	81
Sección 2: Rol de la quinasa ATR en la respuesta transcripcional al daño al ADN	83
La inhibición de ATR previene la hiperfosforilación del CTD de RPB1	83
Identificación de factores fosforilados por ATR a través de proteómica cuantitativa: <i>SILAC-Proteomics</i>	84
Identificación de factores fosforilados por ATR a través de proteómica cualitativa: <i>Shotgun-Proteomics</i>	90
ATR fosforila al complejo Mediador en respuesta al UV	94
ATR fosforila al complejo Mediador: validación por western blot	96
El sistema NER está involucrado en la activación de ATR y la fosforilación del complejo Mediador	97
ATR modula la inducción de genes de respuesta a estrés.....	98
DISCUSIÓN	101
Sección 1: Rol del sistema NER en la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN	101
Los niveles de RPB1 son controlados secuencialmente por el sistema NER: a tiempos cortos por TC-NER y a tiempos largos por GG-NER	101
El proceso de reparación señala la degradación de RPB1	102
Degradación <i>in cis</i> vs <i>in trans</i> de RPB1.....	103
Degradación de moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas.....	105
Rol de la familia de E3 ligasas CRL en la degradación de RPB1 dependiente de NER	106
El sistema NER conecta la reparación del daño con la expresión génica: RPB1 como un factor limitante bajo estrés	108
Regulación de la abundancia de RPB1 y su impacto en patologías humanas	110
Modelo de control de los niveles de RPB1 por el sistema NER.....	111

Sección 2: Rol de la quinasa ATR en la respuesta transcripcional al daño al ADN	113
ATR fosforila al complejo Mediador	113
La reparación del daño por el sistema NER estimula la activación de ATR	116
Rol de ATR en la regulación transcripcional ante el daño al ADN	117
Rol de ATR en la regulación de la apoptosis	120
CONCLUSIONES	122
Sección 1: Rol del sistema NER en la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN	122
Sección 2: Rol de la quinasa ATR en la respuesta transcripcional al daño al ADN	123
MATERIALES Y MÉTODOS	124
Mantenimiento de la línea celular HaCaT	124
Protocolo de arresto del ciclo celular en G1	124
Tratamientos con drogas	125
Irradiación con luz UV	125
Silenciamiento por siARN	126
Western Blot	126
Extracción de ARN total	128
Retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR)	129
Detección de ARN naciente por dot blot	131
Southern blot	132
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	133
Generación de líneas celulares estables CRISPR-Cas9 KO	133
Inmunoprecipitación de proteínas	134
Análisis por espectrometría de masas	135

Secuenciación de ARN asociado a la cromatina	137
Análisis estadísticos	139
REFERENCIAS	141

Publicaciones durante el doctorado:

Trabajos originales:

- Ramveer Choudhary*, **Juan Cristóbal Muñoz***, Ines Beckerman, Giulia Bastianello, Leon Alberto Bouvier, Marco Foiani & Manuel J Muñoz. *"RNA Polymerase II Degradation Triggered by DNA Repair Occurs In Trans and Independently of how the Lesion is Recognised"*. **Biorxiv (2024)**. <https://doi.org/10.1101/2024.08.30.610509>.
***Primera autoría compartida.**

En revisión en la revista *Nucleic Acid Research*.

- Federico Fuchs Wightman*, Micaela A. Godoy Herz*, **Juan Cristóbal Muñoz***, José N. Stigliano*, Laureano Bragado, Nicolas Nieto Moreno, Marcos Palavecino, Lucas Servi, Gonzalo Cabrerizo, José Clemente, Martín Avaro, Andrea Pontoriero, Estefanía Benedetti, Elsa Baumeister, Fabian Rudolf, Federico Remes Lenicov, Cybele Garcia, Valeria Buggiano, Alberto R. Kornblihtt, Anabella Srebrow, Manuel de la Mata, Manuel J. Muñoz, Ignacio E. Schor & Ezequiel Petrillo. *"A DNA intercalating dye-based RT-qPCR alternative to diagnose SARS-CoV2"* **RNA Biology (2021)**. DOI: 10.1080/15476286.2021.1926648 ***Primera autoría compartida.**

Trabajos de revisión bibliográfica:

- **Juan Cristóbal Muñoz**, Inés Beckerman, Ramveer Choudhary, Leon Alberto Bouvier, Manuel J. Muñoz. *"DNA damage-induced RNAPII degradation and its consequences in gene expression"* **Genes MDPI Journal (2022)**. DOI: 10.3390/genes13111951.
- Cambindo Botto Adrián E., **Juan Cristóbal Muñoz**, Giono Luciana Eugenia, Nieto-Moreno Nicolás, Cuenca Carmen, Kornblihtt Alberto R. & Muñoz Manuel J. *"Reciprocal regulation between alternative splicing and the DNA damage response"* **Genetics & Molecular Biology (2020)**. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0111>.

Trabajos en preparación:

- **Juan Cristóbal Muñoz**, Luciano Edmundo Marasco, Ramveer Choudhary, Gururaj Rao Kidiyoor, Leon Alberto Bouvier, Marco Foiani & Manuel J. Muñoz. *"Nucleotide Excision Repair-dependent activation of ATR modulates the transcriptional response to DNA damage through Mediator complex phosphorylation"*.

Listado de Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

DSB: ruptura doble cadena en el ADN

ssDNA: ADN simple cadena

6-4PP: fotoproducto (6-4) pirimidín-pirimidona

CPD: dímero de pirimidinas por ciclobutano

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

pre-ARNm: precursor del ARN mensajero

siRNA: ARN pequeño de interferencia

RNAPII: ARN Polimerasa II

CTD: dominio carboxilo terminal de la subunidad RPB1 de la RNAPII

TSS: sitio de inicio de la transcripción

PTM: modificación post-traducciona

TF: factor de transcripción

GTFs: factores generales de la transcripción

NER: sistema de reparación por escisión de nucleótidos

TC-NER: sistema de reparación por escisión de nucleótidos acoplado a la transcripción

GG-NER: sistema de reparación por escisión de nucleótidos global del genoma

UV: ultravioleta

WB: western blot

DRB: 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosil bencimidazol, pan-inhibidor de quinasas del CTD de RPB1

ETP: ETP-46464, inhibidor farmacológico de ATR

AZ20: inhibidor farmacológico de ATR

AZD6738: inhibidor farmacológico de ATR

VE-822: inhibidor farmacológico de ATR

SP: espironolactona, fármaco esteroideo que induce la degradación de XPB

RT: retro-transcripción

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

WT: *wild type*, células salvajes

KO: *knockout*

KD: *knockdown*

SILAC: *stable isotope labeling by aminoacids in cell culture*, marcado con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivo celular.

H: *Heavy*, aminoácidos L-Lisina y L-Arginina isotópicamente pesados

L: *Light*, aminoácidos L-Lisina y L-Arginina isotópicamente livianos

dKO: células HaCaT doble *knockout* para los factores XPC y DDB2

SQ/TQ: Serina o Treonina seguida de Glutamina

4sU: *4-thiouridine*, análogo modificado de uridina

Introducción

Introducción general

La información necesaria para que exista la vida sobre la Tierra se encuentra codificada en el ADN. Esta información está organizada en unidades funcionales conocidas como genes, que contienen las instrucciones esenciales para el desarrollo, la estructura y el funcionamiento de los seres vivos. Para que esta información pueda ser utilizada, los genes deben expresarse a través de una serie de mecanismos que garantizan la síntesis de moléculas con función biológica. Uno de los primeros pasos en la expresión génica es el proceso de transcripción, mediante el cual enzimas conocidas como ARN Polimerasas leen la secuencia de los genes y sintetizan moléculas de ARN. Luego, la información contenida en el ARN se traduce en proteínas mediante la acción de los ribosomas. Las proteínas desempeñan un rol central en la célula, ya que catalizan la mayoría de las reacciones bioquímicas necesarias para la vida. Aunque durante varios años se consideró que las proteínas eran los principales catalizadores biológicos, hoy se sabe que muchos ARNs poseen función catalítica, estructural y funcional *per se*, siendo igual de relevantes que las proteínas para la catálisis de procesos bioquímicos esenciales.

Este flujo de información, del ADN al ARN y luego a las proteínas, constituye lo que Francis Crick denominó el *dogma central de la biología molecular* (Crick, 1958). Como se ilustra en la Figura I1, este flujo direccional garantiza que la información heredable contenida en el ADN pueda ser transcrita a ARN y luego traducida a proteínas, permitiendo así decodificar la información genética y sustentar los procesos biológicos que hacen posible la vida. Tal como postula la *centralidad* del dogma, este flujo de información se encuentra conservado en los 3 dominios en los que se clasifica la vida, y por lo tanto su estudio es fundamental para comprender los procesos moleculares que rigen la existencia de todos los organismos vivos que habitan la Tierra. No obstante, hace ya muchos años se demostró que este flujo de información no es estrictamente unidireccional, ya que existen mecanismos moleculares de transferencia de información en direcciones alternativas, como ocurre en la síntesis de ADN a partir de ARN en los retrovirus, entre otros ejemplos (Crick, 1970).

La capacidad de regular este flujo de información genética es un aspecto clave en la evolución y el desarrollo de los seres vivos. El control preciso de cuándo y cómo se expresan los genes resulta fundamental no solo para el desarrollo de las células y la transmisión hereditaria de la información genética, sino también para que los organismos puedan adaptarse y responder eficientemente a cambios en su entorno. En esta tesis doctoral

exploramos cómo las células eucariotas regulan el proceso de transcripción en respuesta al daño al ADN, garantizando la estabilidad genómica y la viabilidad celular.

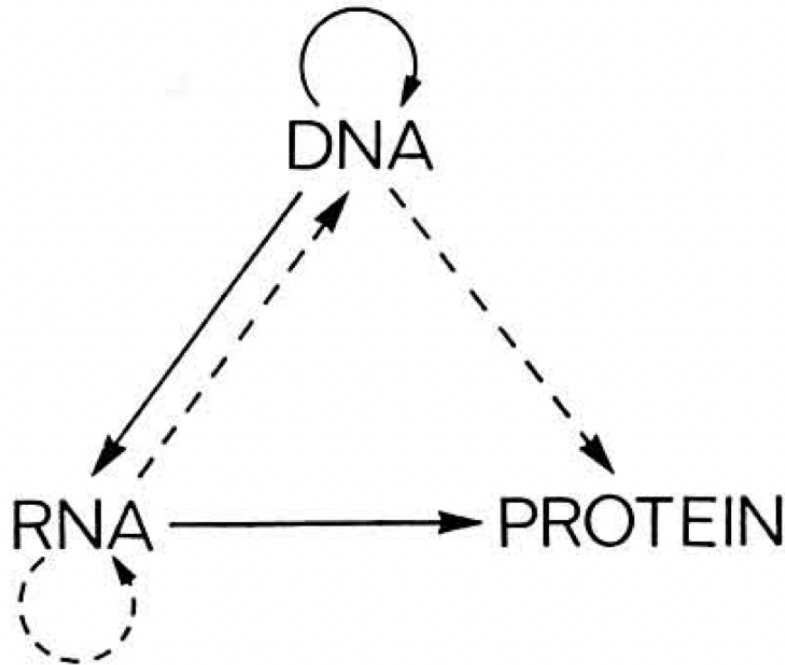


Figura I1: Representación esquemática del dogma central de la biología molecular tal como fuera presentada por Francis Crick en su artículo de 1970 en la revista Nature (Crick, 1970). Las líneas sólidas representan la transferencia de información más frecuente, donde el ADN puede replicarse para generar otra copia de ADN, o bien transcribirse a ARN, que a su vez puede traducirse a proteínas. Las líneas punteadas representan excepciones, dado que ha sido demostrado que el ADN puede sintetizarse a partir de ARN (retrotranscripción), así como el ARN puede sintetizarse a partir de otro ARN. La línea punteada que conecta ADN y proteína no ha sido demostrada al momento de escritura de esta tesis, pero la posibilidad de que exista este mecanismo y aún no haya sido descubierto, no era descartada por Francis Crick en 1970.

Capítulo 1: Regulación de la expresión génica

Conceptos generales sobre la Transcripción

Como uno de los primeros pasos en la expresión génica, la transcripción es un proceso altamente regulado mediante el cual se genera una molécula de ARN a partir de la información codificada en un gen en el ADN. Existen distintos tipos de ARN con una gran diversidad funcional. Los ARN mensajeros (ARNm) resultan de particular interés, dado que son aquellos que se exportan hacia el citoplasma y se traducen para dar lugar a las proteínas. Sin embargo, también existen diversos tipos de ARN de localización nuclear y/o citoplasmática que no codifican para proteínas y poseen funciones catalíticas y/o estructurales igual de necesarias. En mamíferos, existen al menos tres enzimas con la capacidad de sintetizar ARN usando ADN como molde: La ARN Polimerasa I (RNAPI), la ARN Polimerasa II (RNAPII) y la ARN Polimerasa III (RNAPIII). La RNAPII es la encargada de sintetizar los ARNm, así como otros ARN no codificantes con funciones biológicas como los microARN, los ARN nucleares pequeños (excepto el U6) y los ARN circulares. La RNAPI sintetiza los ARN Ribosomales (excepto el 5S), que forman parte de los complejos ribonucleoprotéticos denominados ribosomas que se encargan de catalizar la síntesis de proteínas. Finalmente, la ARN Polimerasa III (RNAPIII) se encarga de transcribir los ARN de transferencia, también involucrados en la síntesis de proteínas, así como el ARN ribosomal 5S y el ARN nuclear pequeño U6 (Srivastava and Ahn, 2015).

La información genética necesaria para sintetizar la gran diversidad de ARN existentes se encuentra codificada en la secuencia de nucleótidos del ADN. En células eucariotas diploides, existen dos copias del ADN que se localizan en el núcleo. A su vez, como se ilustra en la Figura I2, el ADN se asocia con proteínas conocidas como histonas, formando estructuras denominadas nucleosomas. El ordenamiento espacial del conjunto de nucleosomas se denomina cromatina, que puede encontrarse en dos estados diferentes: uno relajado o abierto, conocido como euromatina, y uno cerrado o compacto, conocido como heterocromatina. Esta organización estructural del ADN es necesaria no solo para poder compactar el ADN dentro del núcleo de una célula, sino que además cumple un rol regulatorio de la expresión de la información genética (Hübner et al., 2013; Vos, 2021). El grado de compactación de la cromatina representa el primer nivel de regulación de la expresión génica, dado que los genes localizados en regiones de euromatina estarán más accesibles para ser expresados, mientras que la heterocromatina restringirá la expresión. Además, la organización estructural de la cromatina influye en la estabilidad del genoma y otros procesos nucleares, como la reparación del ADN.

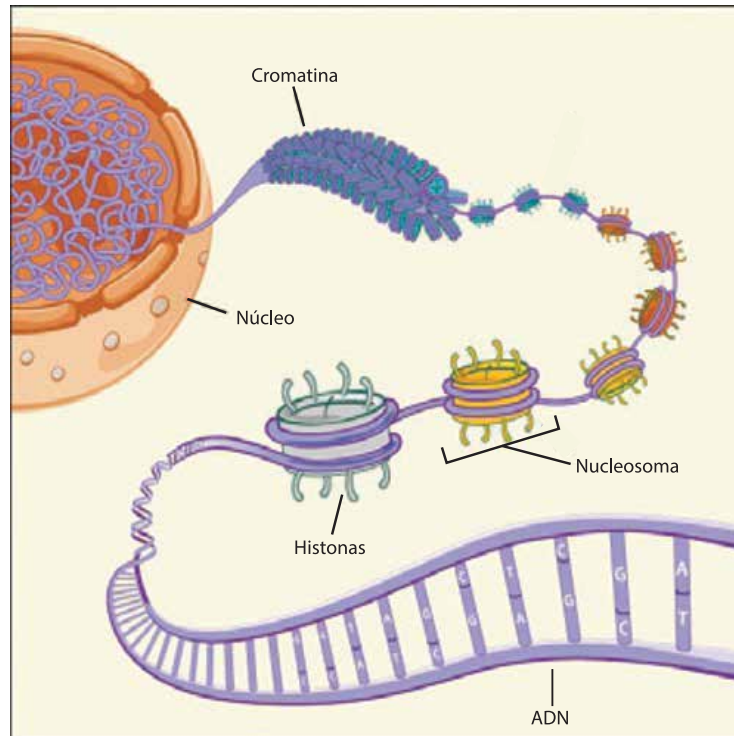


Figura I2: Ilustración esquemática de la organización del ADN en el núcleo de una célula eucariota. El ADN desnudo se asocia con proteínas conocidas como histonas, formando estructuras conocidas como nucleosomas. A su vez, los nucleosomas se encuentran separados por regiones de ADN conocidas como ADN *linker*, y la distancia entre los nucleosomas determinará el grado de compactación de la cromatina. Mayor distancia entre nucleosomas se asocia a eucromatina, mientras que nucleosomas más compactos se asocian con heterocromatina.

En los eucariotas, los genes no están organizados uno al lado del otro, sino que se encuentran separados por regiones intergénicas, en las cuales se encuentran secuencias regulatorias conocidas como promotores, *enhancers* y *silencers*, que poseen información necesaria para la regulación de la expresión de los genes. Así, la especificidad de las distintas ARN Polimerasas está dada, no por su capacidad de decodificar la información en el ADN, sino por un grupo de proteínas conocidas como factores de transcripción (TF) capaces de reconocer las secuencias regulatorias, asociarse a las mismas y dirigir a las distintas ARN Polimerasas hacia el promotor de los genes correspondientes. Allí, la doble hélice se desnaturaliza, y se define el sitio de inicio de la transcripción (TSS o +1) y la dirección en la cual debe avanzar la ARN Polimerasa. De esta manera, la ARN Polimerasa lee la hebra molde en dirección 3'-5' y sintetiza un ARN en dirección 5'-3', cuya secuencia es complementaria a la hebra molde y, en consecuencia, idéntica a la hebra codificante, excepto por la sustitución de timina (T) por uracilo (U) en el ARN (Figura I3).

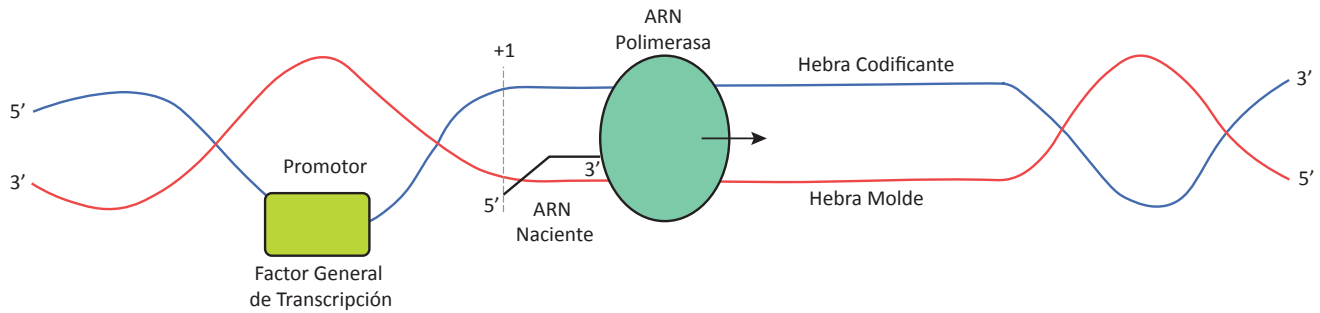


Figura I3: Representación esquemática de la transcripción de un gen. El factor general de transcripción se une al promotor y le indica a la ARN Polimerasa el sitio de inicio de la transcripción, representado con una línea punteada vertical. La ARN Polimerasa lee la hebra molde en sentido 3'-5' y sintetiza ARN en sentido 5'-3'. El sentido de avance de la transcripción se indica con una flecha negra. De este modo, la hebra molde posee la secuencia complementaria al del ARN naciente, mientras que la hebra codificante posee la misma secuencia que se encontrará en el ARN, a excepción de la sustitución de Timina por Uracilo.

El procesamiento de los ARN

Como ya se mencionó, la RNAPII es la encargada de transcribir los ARNm y algunos ARN no codificantes. El ciclo de la transcripción mediada por la RNAPII ocurre en etapas altamente reguladas y cuya secuencialidad es crucial para la correcta expresión de los genes. De manera simplificada, comienza con el reclutamiento de la RNAPII al promotor, seguido por la iniciación de la transcripción, la transición a la elongación productiva y finalmente la terminación de la transcripción. Durante este ciclo, el precursor de ARNm (pre-ARNm) que se transcribe es procesado de manera co-transcripcional, garantizando su correcta maduración y a su vez regulando el proceso de transcripción. Si bien el procesamiento del pre-ARNm es un complejo campo de estudio en sí, existen tres procesos fundamentales llamados *capping*, *splicing* y poli-adenilación (Figura I4).

El *capping* consiste en el agregado de un nucleótido modificado de 7-metilguanosina (m7G), denominado CAP, en el extremo 5' del pre-ARNm. Sus funciones son la de proteger el extremo 5' del ARN naciente de actividades exonucleasa 5'-3' y regular el inicio de la síntesis de proteínas en el citoplasma (Galloway and Cowling, 2019).

Cuando la RNAPII transcribe un gen, sintetiza el pre-ARNm que incluye tanto secuencias exónicas como intrónicas. La información contenida en los intrones permite el reclutamiento del *spliceosoma*, un complejo enzimático ribonucleoproteico. El ensamblado del *spliceosoma* cataliza la formación en el pre-ARNm de una estructura secundaria en forma de bucle que promueve el acercamiento físico de los exones. Este proceso permite que los exones se unan entre sí y los intrones sean removidos del ARN naciente, en un proceso conocido

como *splicing*. De esta manera, el ARN maduro sólo contendrá a los exones, dado que los intrones son removidos y posteriormente degradados (Shenasa and Bentley, 2023).

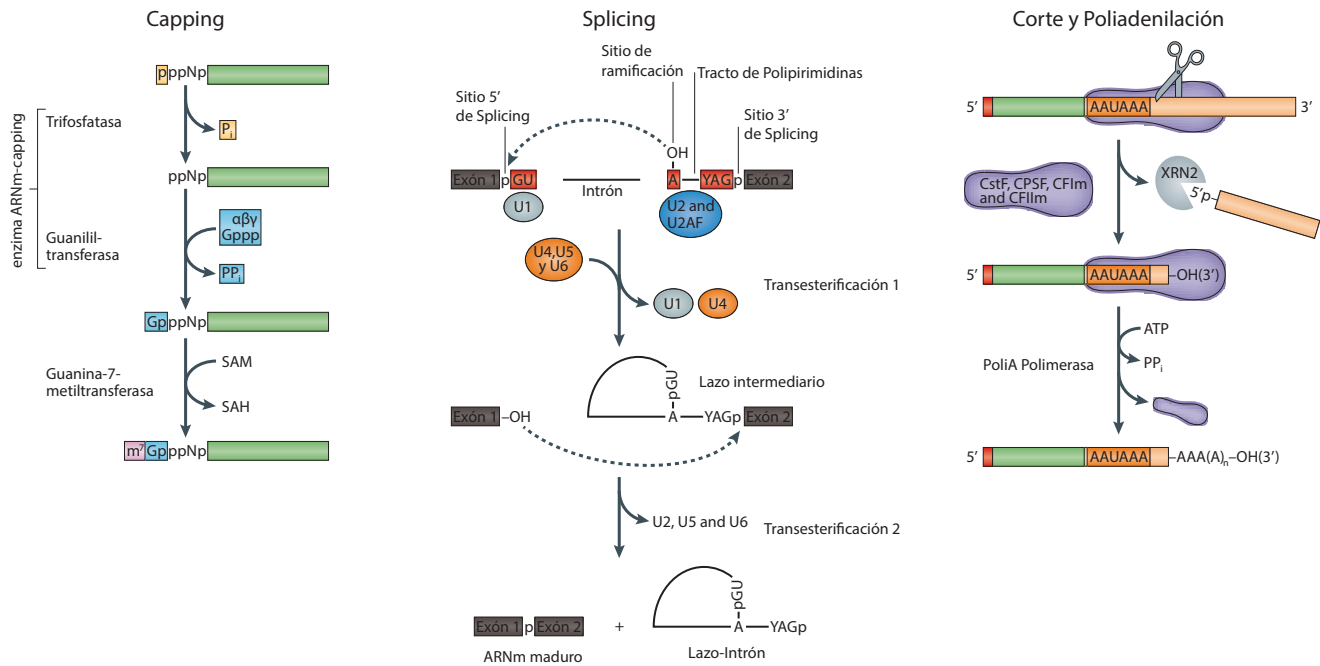


Figura 14: Representación esquemática de los tres procesos canónicos de procesamiento co-transcripcional del pre-ARNm. **Capping:** El ARN se muestra en verde y tanto el GTP como el CAP de guanosina (Gp) se muestran en azul. La enzima de “capping” del ARNm posee actividades trifosfatasa y guanilil-transferasa, responsables de eliminar el fosfato y del ARN naciente y transferir el GMP desde el donante GTP, respectivamente. El donante de metilos S-adenosil-l-metionina (SAM) se transforma en S-adenosil-l-homocisteína (SAH), lo cual da lugar al CAP de 7-metilguanosina (mostrado en rosa). **Splicing:** El proceso de *splicing* induce la eliminación de los intrones en forma de lazo, que es degradado, y une los exones adyacentes mediante dos reacciones de transesterificación. Las secuencias conservadas de definición intrónica se muestran en rojo. Las partículas ribonucleoproteicas (snRNP) U1, U2, U4, U5 y U6, así como el factor auxiliar U2 (U2AF) catalizan la reacción de *splicing*, aunque se omiten numerosas proteínas del *spliceosoma*. **Corte y poli-adenilación:** El corte de los pre-ARNm de mamíferos ocurre aproximadamente 15 a 17 nucleótidos río abajo de la secuencia consenso (AAUAAA) y está mediado por un complejo multimérico (representado en violeta), que incluye al factor de estimulación del corte (CstF), el factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) que posee la actividad endonucleasa, y los factores de corte I y II (CFIm y CFII). La poli-A Polimerasa añade la cola de poli-Adeninas. La exonucleasa de ARN 2 (XRN2), que actúa en dirección 5' a 3', degrada el ARN que se encuentra río abajo del sitio de corte y facilita la terminación de la transcripción. Adaptado de (Bentley, 2014).

La maduración del pre-ARNm concluye cuando se sintetiza la secuencia AAUAAA, conocida como señal de corte y poli-adenilación. Esta señal favorece el reclutamiento de los complejos enzimáticos CstF y CPSF que, junto con otros factores necesarios, inducen la hidrólisis de una unión fosfodiéster en el ARN 15 a 17 nucleótidos río debajo de la señal de corte y poli-adenilación. En el extremo 3' del pre-ARNm clivado, una enzima poli-A Polimerasa (PAP) induce el agregado de una cola de varios nucleótidos con la base adenina que protege al ARN de exonucleasas con actividad 3'-5' y, al igual que el CAP, cumple un rol fundamental en la regulación de la

traducción (Passmore and Collier, 2022; Proudfoot, 2011). De esta manera, el extremo 5' del ARNm maduro está determinado por el sitio de inicio de la transcripción, mientras que el sitio 3' está definido por el sitio de corte y poli-adenilación (Kornblihtt et al., 2013).

Todas las etapas del procesamiento co-transcripcional de los ARN están sujetas a varias capas de regulación. En particular, durante el proceso de *splicing* pueden existir variaciones en los segmentos escindidos, generándose ARN maduros de distinta longitud en un proceso conocido como *splicing* alternativo (AS). De la misma manera, existen señales de corte y poli-adenilación alternativas (APA) que aumentan aún más la cantidad de variantes de ARN, o isoformas, que pueden ser generadas a partir de un único gen. Estos fenómenos permiten una amplificación de la información genética, que explica que en humanos haya aproximadamente 25.000 genes, pero unas 100.000 proteínas (Chen and Manley, 2009). La elección de qué sitio de *splicing* o de corte y poli-adenilación utilizar está dada por la capacidad de la célula de integrar la información del entorno y regular de manera precisa la actividad de la RNAPII y sus complejos asociados en cada etapa del procesamiento.

La ARN Polimerasa II

La RNAPII es un complejo enzimático de naturaleza proteica compuesto por al menos 12 subunidades, siendo RPB1 la subunidad mayor que posee la actividad catalítica capaz de sintetizar el ARN. Esta subunidad ha sido históricamente reconocida como un factor único por las características de su Dominio Carboxilo Terminal (CTD). Este dominio está compuesto por múltiples repeticiones del heptapéptido consenso Tirosina₁-Serina₂-Prolina₃-Treonina₄-Serina₅-Prolina₆-Serina₇ (YSPTSPS) y se encuentra altamente conservado en eucariotas. En mamíferos, el CTD contiene 52 repeticiones de la héptada, y presenta variaciones respecto al consenso hacia el extremo carboxilo terminal (Figura 15). Si bien el CTD no cumple un rol en la actividad catalítica de la enzima, su importancia radica en la capacidad de regular las múltiples etapas de la síntesis de ARN. En particular, todos los aminoácidos de la héptada son susceptibles de sufrir modificaciones post traduccionales (PTMs): las Serinas (S), Treoninas (T) y Tirosinas (Y) pueden ser fosforiladas, mientras que las Prolinas (P) pueden ser isomerizadas. Además, las Serinas y Treoninas pueden ser O-GlucosilNAcetiladas (Lewis, 2024). De este modo, las extensas PTMs que pueden sufrir los residuos del CTD funcionan como una plataforma para varios complejos enzimáticos (Muñoz et al., 2010; Srivastava and Ahn, 2015), principalmente implicados en la regulación del ciclo de la transcripción, el procesamiento del ARN y la remodelación de la cromatina (Kornblihtt, 2006; Kornblihtt et al., 2013).

Diagram illustrating the conservation of the C-terminal domain (CTD) of RNA Polymerase II across species.

The top part shows a schematic of RNAPII transcribing DNA (ADN) into RNA (ARN). The CTD consists of 26 green repeats followed by orange repeats. A consensus heptad sequence is shown: Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇.

Below, two columns show amino acid sequences for *S. cerevisiae* and *H. sapiens*. The sequences are aligned to show conservation across the 26 repeats.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
FSPSTSP	YSPTSPA
YSPTSPA	YEPRLPGG
YSPTSPS	YTQSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPN
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPA	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPS	YSPTSPS
YSPTSPN	YSPTSPN
YSPTSPS	YSPTSPN
YSPTSPG	YTPTSPS
YSPGSFA	YSPTSPS
YSPKQDE	YSPTSPN

An arrow points from the *H. sapiens* sequence YSPTSPN to a detailed view of the CTD repeats, which are numbered 1 to 52. This detailed view shows 26 green repeats followed by 26 orange repeats, each containing a heptad sequence.

Múltiples estudios han demostrado que la abundancia relativa de las PTMs de la héptada cambia de manera concertada a lo largo de cada una de las etapas de la transcripción. En particular, las fosforilaciones de las Serinas 2 y 5 han sido las más estudiadas, y son las más abundantes (Harlen and Churchman, 2017; Heidemann et al., 2013). Como se observa en la Figura I6, la fosforilación en Serina 5 se asocia al inicio de la transcripción, mientras que la fosforilación en Serina 2 se asocia a la elongación productiva del gen y a la terminación de la transcripción (Nojima et al., 2015). De igual modo, varios estudios asocian la fosforilación en la Tirosina 1 y Serina 7 al inicio de la transcripción, y a la Treonina 4 a la elongación (Schüller et al., 2016; Yurko and Manley, 2018). Sin embargo, dada la complejidad de la expresión génica en mamíferos, esta distribución de PTMs puede variar dependiendo de los distintos tipos de genes y el procesamiento co-transcripcional del ARN. De este modo, la secuencia observada en la Figura I6 que ilustra la distribución de las fosforilaciones del CTD, y la transición propuesta entre las distintas etapas, sea presumiblemente más compleja (Eick and Geyer, 2013).

En comparación con otras ARN polimerasas dependientes de ADN, la singularidad de la RNAPII va más allá de la presencia del CTD de RPB1 y está relacionada con su destino en la respuesta a la expresión génica bajo estrés. La inducción aguda de daño al ADN mediante exposición a rayos ultravioleta (UV) provoca la degradación específica y mediada por el proteasoma de RPB1 (Bregman et al., 1996). Dicha degradación constituye un paso central en la respuesta transcripcional al daño en el ADN y es uno de los objetos principales de estudio de esta tesis doctoral, por lo que será abordada en detalle en las secciones subsiguientes. No obstante, por el momento se continuará con el estudio de la actividad canónica de la RNAPII en la transcripción.

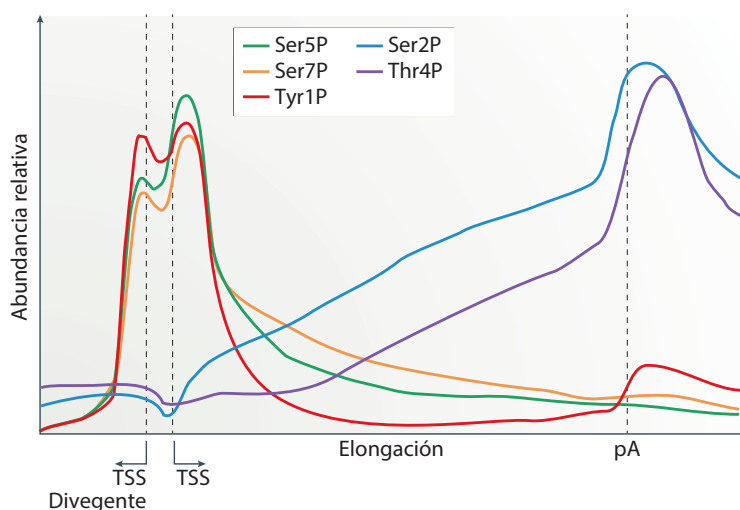


Figura I6: Abundancia promedio de las distintas fosforilaciones del CTD a lo largo de un metagen humano medidas por ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). La fosforilación en Serina 5 predomina en términos

absolutos en el sitio de inicio de la transcripción (TSS), mientras que la fosforilación en Serina 2 predomina en el cuerpo del gen y hacia el sitio de corte y poli-adenilación (pA). Las fosforilaciones en Ser7 y Tyr1 cerca del TSS, y de Thr4 en el cuerpo del gen son menos abundantes en términos absolutos, si bien la figura no lo expresa correctamente. Figura modificada de (Harlen and Churchman, 2017).

Reclutamiento de la RNAPII a la cromatina y la formación del complejo de pre-iniciación

El ciclo de la transcripción comienza con el reclutamiento al ADN de la RNAPII junto con los factores generales de la transcripción (GTFs), en un proceso que implica la participación de más de 80 proteínas que, en conjunto, forman el complejo de preiniciación (PIC) (Farnung and Vos, 2022). Los GTFs son esenciales para dirigir y estabilizar el ensamblado del PIC, facilitando el reclutamiento de la RNAPII en los promotores, permitiendo la correcta interacción con el ADN y estimulando la síntesis de ARN. En consecuencia, el ensamblado adecuado del PIC es fundamental para garantizar la expresión génica (Schier and Taatjes, 2020).

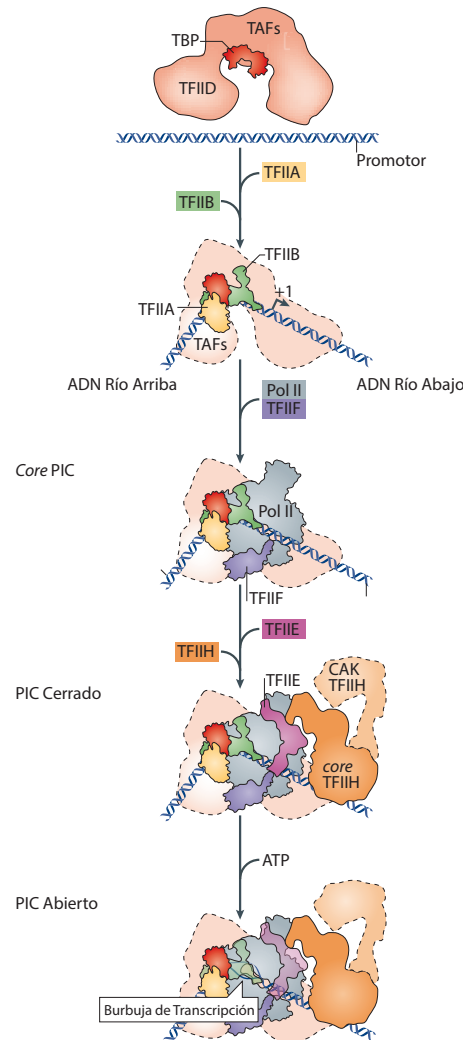


Figura 17: Ensamblado del complejo de Pre-Iniciación (PIC). TFIID y su subunidad TBP se unen al ADN en la secuencia TATA, induciendo una distorsión en el ADN. A continuación, el complejo TBP–ADN es estabilizado por TFIIB y TFIIA, que flanquean a TBP por ambos lados. A este complejo inicial se asocia luego el complejo Pol II–TFIIF, dando lugar a la formación del *core* PIC. La unión posterior de TFIIE y TFIIH completa la formación del PIC, que permanece en un estado cerrado (inactivo) hasta que, en presencia de ATP, la subunidad XPB de TFIIH desnatura el ADN y el PIC pasa a estar en una conformación abierta (activa) capaz de comenzar a transcribir. Adaptado de (Sainsbury et al., 2015).

El PIC se ensambla gracias al reclutamiento secuencial de los GTFs TFIID, A, B, F, E y por último H (Figura 17). TFIID contiene a la subunidad TBP que, junto con factores asociados (TAFs), se une específicamente a una secuencia TATA en el promotor que se ubica unos 30 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Sainsbury et al., 2015). El reclutamiento de TFIID induce una distorsión en el ADN que favorece el reclutamiento de TFIIA y TFIIB, los cuales estabilizan la interacción entre TFIID y el promotor. Si bien muchos promotores no contienen una secuencia canónica TATA, se ha detectado la presencia de TBP y otros GTFs en la mayoría de los promotores de *S. cerevisiae* (Rhee and Pugh, 2012). En este sentido, la capacidad de TFIIA y TFIIB para estabilizar la unión de TBP al ADN es particularmente relevante en genes sin TATA (Hieb et al., 2007), que predominan en genomas de mamíferos (Vo ngoc et al., 2017). En términos generales, esto sugiere que, a pesar de diferencias en la secuencia promotora, la arquitectura global del PIC es similar en promotores con o sin TATA.

La unión de TFIIB al promotor favorece el reclutamiento de la RNAPII, sin PTMs en el CTD de RPB1, formando un complejo con el GTF TFIIF (Kamada et al., 2003). Por un lado, TFIIB es capaz de interactuar directamente con la RNAPII y bloquear su actividad catalítica (Liu et al., 2010). A la vez, TFIIF estabiliza la interacción entre TFIIB y la RNAPII y favorece el correcto posicionamiento de la RNAPII, ayudando a la definición del sitio específico de inicio de la transcripción (TSS) y a su vez previniendo la unión inespecífica de la RNAPII en el ADN (Sainsbury et al., 2015). De esta manera queda ensamblado el PIC y la RNAPII posicionada correctamente, pero inactiva.

El reclutamiento de la RNAPII al ADN favorece la unión de TFIIE y TFIIH, lo cual constituye un paso fundamental en el inicio de la transcripción. TFIIH participa tanto en la desnaturalización del ADN en el promotor, como en la activación catalítica de la RNAPII. Su reclutamiento depende además de la interacción de la RNAPII con el complejo Mediador, un complejo multimérico que funciona como un puente entre la maquinaria transcripcional y los factores de transcripción (Malik et al., 2005). El complejo Mediador es reclutado específicamente a secuencias regulatorias conocidas como *enhancers*, a las cuales se unen los TF para modular la expresión génica. Los *enhancers* son secuencias de ADN específicas de metazoos que pueden encontrarse a grandes distancias de los genes que regulan, incluso a cientos de miles de pares de bases del promotor. Su principal función es estimular la transcripción de genes al facilitar la interacción física entre los factores de transcripción, el complejo Mediador y la maquinaria transcripcional, gracias al *looping* cromatínico. Este mecanismo acerca espacialmente

los *enhancers* a los promotores y promueve la activación transcripcional. A través de esta interacción, el Mediador estimula el contacto entre *enhancers* y promotores, y a su vez posiciona correctamente a TFIID en el PIC, estimulando sus actividades catalíticas dependientes de ATP, que son esenciales para la transición de un PIC cerrado (reprimido) a uno abierto (activo) (Malik et al., 2017).

El inicio de la transcripción y el pausado en el promotor

TFIID, originalmente identificado por su rol en la regulación del inicio de la transcripción (Conaway and Conaway, 1989; Gerard et al., 1991), es un GTF de vital importancia, dado que también cumple un rol fundamental en la reparación del daño al ADN por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Compe and Egly, 2012). Como se ilustra en la Figura 18, TFIID se encuentra formado por dos módulos funcionales, el *core* TFIID y el complejo CAK. En particular, la subunidad XPB que forma parte del *core* TFIID es de particular importancia para la transcripción, dado que su actividad helicasa dependiente de ATP facilita la desnaturalización del ADN y la formación de la “burbuja” de transcripción, generando que el PIC pase a estar en una conformación abierta (Coin et al., 1999). Una vez que el PIC adopta la conformación abierta, la RNAPII puede iniciar la síntesis de ARN. Para que esto ocurra, la quinasa dependiente de ciclina CDK7, componente del módulo CAK de TFIID, fosforila en las Serinas 5 y 7 al CTD de RPB1 (Akhtar et al., 2009; Glover-Cutter et al., 2009). Estas fosforilaciones desencadenan la transición a un estado transcripcional activo, permitiendo que la RNAPII comience a sintetizar el ARN. Sin embargo, en sus primeras etapas, la transcripción es altamente ineficiente y se producen ARNs cortos que resultan abortivos, dado que la RNAPII que no logra escapar del promotor de manera estable. Esta fase de transcripción abortiva está regulada por la interacción de la RNAPII con el PIC y la arquitectura del promotor, así como factores de transcripción y remodeladores de la cromatina que modulan la estabilidad de la RNAPII en esta etapa temprana. Eventualmente, la RNAPII logra disociarse eficientemente del PIC y, luego de la incorporación de aproximadamente 10 nucleótidos, se asocia con la maquinaria de *capping* (Komarnitsky et al., 2000). Luego de superar esta primera barrera inicial, la RNAPII transcribe eficientemente entre 20 y 80 nucleótidos y se frena, en lo que se conoce como pausado proximal al promotor (Kwak and Lis, 2013).

El pausado de la RNAPII en la región proximal al promotor favorece el reclutamiento de los factores DSIF (*DRB-sensitivity-inducing factor*) y NELF (*negative elongation factor*), que estabilizan a la RNAPII en este estado (Adelman and Lis, 2012; Bernecky et al., 2017). La estabilización de la RNAPII en su estado pausado proximal al promotor es un mecanismo clave en la regulación génica, dado que: garantiza el correcto *capping* del ARN naciente, previene la iniciación prematura por otra RNAPII en el promotor y mantiene esta región libre de

nucleosomas. Además, existe un gran número de genes en los cuales la RNAPII se encuentra pausada de manera constitutiva, pero lista para comenzar la elongación en respuesta a diversos estímulos. Este mecanismo permite una activación rápida y eficiente de la expresión génica sin necesidad de ensamblar el PIC desde cero. De esta manera, la célula puede inducir rápidamente la transcripción de genes cuya expresión debe aumentar de forma inmediata en respuesta a diversas señales externas o cambios en el entorno (Schier and Taatjes, 2020).

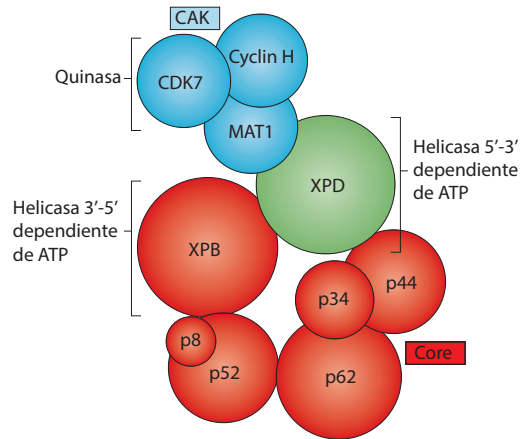


Figura 18: Representación esquemática de TFIIH. En mamíferos, TFIIH es un complejo multiproteico con diez subunidades, organizado en dos sub-complejos funcionales principales: el complejo *core* formado por XPB, p62, p52, p44, p34 y p8, y el complejo CAK (quinasa activadora de CDK), constituido por CDK7, la ciclina H y MAT1. Estos dos subcomplejos se conectan a través de la subunidad XPD, que interactúa con p44 en el *core* y con MAT1 en el complejo CAK. TFIIH posee múltiples actividades enzimáticas intrínsecas: CDK7 actúa como una quinasa dependiente de ciclina, mientras que XPB y XPD cumplen funciones de helicasas dependientes de ATP con polaridades opuestas. Adaptado de (Compe and Egly, 2012).

La elongación transcripcional

Para que la RNAPII pueda escapar del estado pausado y comenzar con la elongación productiva de los genes, es necesaria la formación del Super Complejo de Elongación (SEC), que incluye a diversos factores, incluidos NELF, AFF4 y al complejo p-TEFb, conformado por la quinasa CDK9 y la ciclina T. En condiciones basales, p-TEFb se encuentra en un estado inactivo asociado al snRNP 7SK, y su activación depende de diversas señales que regulan la actividad de p-TEFb según las necesidades fisiológicas de la célula (Fujinaga et al., 2023). Una vez disociado de snRNP 7SK y activado, p-TEFb se asocia a la RNAPII, y la subunidad CDK9 fosforila a los factores NELF y DSIF. Como consecuencia, DSIF se disocia de la RNAPII y NELF adquiere un rol de factor de elongación positivo (Core and Adelman, 2019). Además de fosforilar a NELF y a DSIF, CDK9 fosforila la Serina 2 del CTD de RPB1, la cual es una modificación clave para la elongación transcripcional productiva (Peterlin and Price, 2006). De este modo, las fosforilaciones en NELF, DSIF y el cambio en el estado de fosforilación del CTD favorecen la liberación de la RNAPII de su estado pausado en la región proximal al promotor promoviendo así la elongación transcripcional

productiva (Figura I9). En particular, las fosforilaciones en NELF y la Serina 2 del CTD, facilitan el reclutamiento de remodeladores de la cromatina, así como diversos factores del SEC que modulan la elongación y las etapas subsiguientes.

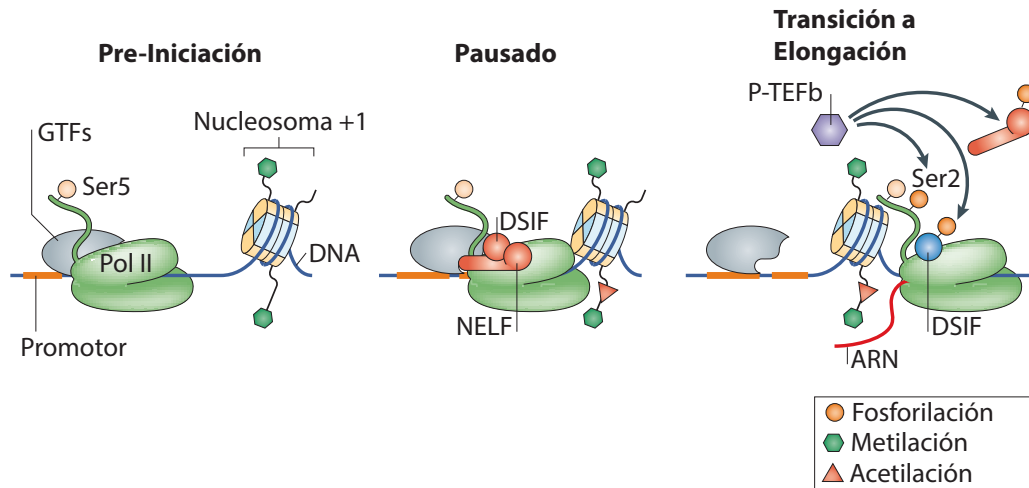


Figura I9: Continuación temporal de la Figura I7. Iniciación, pausado y transición a elongación. Una vez que la RNAPII (Pol II) se asocia con los promotores y el PIC pasa a una conformación abierta, es fosforilada en la Serina 5 del CTD. Esto permite que comience la transcripción y, unos 80 nucleótidos río abajo, el factor de elongación negativo (NELF) y el factor inductor de sensibilidad a DRB (DSIF) se asocian y estabilizan la RNAPII pausada, lo cual además es favorecido por la cercanía al promotor y el bloqueo que impone a la transcripción el nucleosoma +1. El factor positivo de elongación de la transcripción b (P-TEFb) es activado y fosforila a los factores NELF, DSIF y la Serina 2 del CTD de la Pol II, induciendo la transición de la Pol II pausada a la elongación productiva. Como consecuencia de estas fosforilaciones, DSIF se convierte en un factor de elongación positivo y NELF se disocia de la RNAPII. Adaptado de (Jonkers and Lis, 2015).

Durante la elongación, la RNAPII se desplaza a lo largo del gen y sintetiza el ARN naciente a una tasa aproximada de 2000 nucleótidos por minuto (Jonkers and Lis, 2015). Sin embargo, este proceso no es lineal dado que, como se observa en la Figura I10, la transcripción es un proceso discontinuo, con períodos de elongación productiva que son frecuentemente interrumpidos por pausas (Couvillion et al., 2022). El estado cromatínico es el primer nivel de regulación de la tasa de elongación, e influye de manera determinante en estas fluctuaciones. Niveles altos de metilación de histonas generan un entorno compacto que impide la progresión de la RNAPII, disminuyendo su tasa de elongación, mientras que la acetilación de histonas induce la decompactación de la cromatina, con mayor espaciamiento entre los nucleosomas, lo que genera un aumento en la tasa de elongación (Jonkers et al., 2014). A su vez, la RNAPII es capaz de transcribir eficientemente genes de gran longitud. Esto es posible gracias a su alta procesividad, que le permite mantener la asociación con el molde de ADN incluso a lo largo de genes que pueden alcanzar hasta 2.000.000 de pares de bases. Por lo tanto, la regulación precisa de la

tasa de elongación también contribuye a garantizar una alta procesividad de la RNAPII, sin que se disocie prematuramente del ADN.

La fosforilación del CTD no solo regula la iniciación de la transcripción y la transición hacia la elongación, sino que define todas las etapas subsiguientes de la transcripción. Durante la transcripción de secuencias exónicas, el CTD de RPB1 sirve como plataforma para el reclutamiento y ensamblado del *spliceosoma*, lo cual induce a su vez una desaceleración transitoria de la RNAPII (Martin et al., 2013). De hecho, ha sido demostrado que cuando la RNAPII transcribe la transición entre un exón y su intrón adyacente, aumenta los niveles de fosforilación en Serina 5 (Nojima et al., 2015), lo cual favorece la asociación de factores regulatorios de *splicing* con el CTD. Por otra parte, la tasa de elongación puede determinar la inclusión o exclusión de ciertos exones alternativos en el ARNm maduro, como fuera propuesto en el modelo cinético de acoplamiento entre la tasa de elongación y la regulación del *splicing* alternativo (Dujardin et al., 2013).

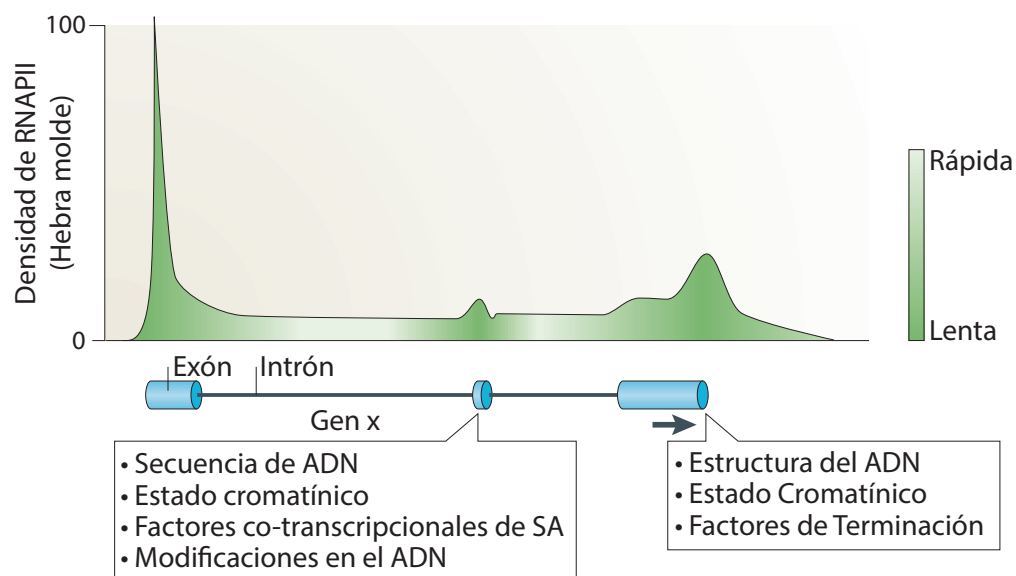


Figura I10: Representación esquemática de la tasa de elongación de la RNAPII y de los factores que la modulan a lo largo de un gen hipotético. Los cambios en la densidad de la RNAPII, así como las tasas relativas de elongación, se indican en el eje Y, en código de color verde. La RNAPII se desplaza con mayor lentitud en el comienzo de la transcripción y acelera tras comenzar la elongación productiva. Se esquematiza la desaceleración de la elongación en secuencias exónicas (barras azules), y en el sitio de terminación, donde hace una pausa que permite una terminación eficiente. Se listan además distintos factores que influyen en la tasa de elongación. La desaceleración en los exones podría estar orquestada por una combinación de contenido de CG, ocupación de nucleosomas, marcas de histonas y factores de *splicing*. Por su parte, la pausa de la RNAPII II cerca del sitio de poli-adenilación en el extremo 3' de los genes se debe a una combinación de híbridos ADN-ARN (R-loops), marcas de histonas y factores de terminación. A su vez, estímulos externos que inducen lesiones en el ADN disminuyen la tasa de elongación. Adaptado de (Jonkers and Lis, 2015).

La integridad del ADN representa otro componente fundamental que regula la tasa de elongación de la RNAPII. Lesiones en el ADN generadas por subproductos del metabolismo celular inducen una disminución en la tasa de elongación, dado que la RNAPII se frena al encontrar la lesión y diversos factores accesorios, tales como CSB o el factor de elongación TFIIIS, permiten que sortee el daño (Charlet-Berguerand et al., 2006a). A su vez, la irradiación con rayos UV induce una hiperfosforilación en el CTD que enlentece su tasa de elongación y modula la respuesta de *splicing* alternativo (Muñoz et al., 2009). En paralelo, el UV induce un tipo de daño en el ADN que, cuando una RNAPII transcribiendo lo encuentra, bloquea por completo la elongación (Donahue et al., 1994). En este sentido, ha sido propuesto que el frenado de la RNAPII en el daño inducido por UV estimula la fosforilación en su Serina 5, sugiriendo que existe un acoplamiento entre la maquinaria de reparación y la RNAPII, aunque aún no ha sido identificado el mecanismo molecular subyacente (Heine et al., 2008). De esta manera, el hecho de que la Serina 5 se fosforile cuando la RNAPII transcribe un exón o se frena ante una lesión – y que también presenta este mismo patrón de fosforilación cuando se encuentra pausada en el promotor - sugiere un acoplamiento entre la disminución de la tasa de elongación y la fosforilación en Serina 5. Este fenómeno resulta de particular relevancia para el estudio de la respuesta transcripcional ante la irradiación UV y el rol regulatorio del CTD en la actividad de la RNAPII ante el daño en el ADN.

En conjunto, la tasa de elongación constituye un elemento fundamental en la coordinación de la transcripción y el procesamiento del ARN. Al modular la velocidad con la que la RNAPII sintetiza el ARN naciente, la célula integra en forma simultánea la remodelación de la cromatina, la adaptación a estímulos internos y externos, y el acoplamiento con el *splicing*, garantizando así una síntesis y maduración del ARN precisa y acorde a las demandas fisiológicas.

La terminación de la transcripción

Si bien son comúnmente confundidos, el corte y poliadenilación del ARNm no implica la terminación de la transcripción. Una vez que el ARNm es cortado (clivado) y poliadenilado, la RNAPII continúa transcribiendo un ARN que puede tener hasta miles de pares de bases de longitud. Este ARN no se encuentra capeado en su extremo 5' y puede ser reconocido por la exonucleasa XRN2 que degrada el ARN en sentido 5'-3' a una velocidad mayor que la tasa de elongación de la RNAPII. Una vez que XRN2 alcanza a la RNAPII, promueve su disociación del ADN, concluyendo con el ciclo de la transcripción. Este modelo, conocido como modelo torpedo, se complementa con el modelo alostérico, que propone que, luego de transcribir el sitio de corte y poliadenilación, el CTD de la RNAPII es fosforilado activamente en sus Serina 2, Treonina 4 y Tirosina 1 por el complejo P-TEFb,

estimulando la asociación de factores que promueven su disociación del ADN (Kaneko et al., 2007; Luo et al., 2006).

Al igual que el resto de las etapas de la transcripción, la terminación de la transcripción está altamente regulada y existen diversas maneras por las cuales la transcripción puede terminar. La transcripción abortiva inicial que realiza la RNAPII antes de pausarse en la región proximal al promotor constituye un mecanismo de terminación temprana que regula el inicio de la transcripción ante distintos estímulos (Eaton and West, 2020). De la misma manera, el frenado de la RNAPII en una lesión en el ADN inducida por UV implica la terminación de la transcripción, y la resolución de esta situación es aún objeto de intenso debate. Además, existen mecanismos de procesamiento 3' de los ARN distintos al corte y poli-adenilación, como es el caso de los ARN que codifican para histonas dependientes de la replicación. Estos ARNs son clivados gracias a la formación de estructuras secundarias que reclutan proteínas de estabilización en su extremo 3', en un proceso que depende de la tasa de elongación de la RNAPII (Saldi et al., 2018). De esta manera, la actividad de la RNAPII constituye un foco de integración de estímulos que garantiza la correcta síntesis del ARN.

El complejo Mediador

En las secciones anteriores se describió de manera generalizada las distintas etapas de la transcripción y algunos de los factores con un rol central en la regulación de la expresión génica mediada por la RNAPII. Entre estos factores se destaca el Mediador, un complejo multimérico de 1,4 MDa conformado por al menos 26 subunidades, que controla diversos aspectos de la actividad de la RNAPII (Figura 111) (Richter et al., 2022). Desde su descubrimiento hace más de 30 años, el complejo Mediador ha sido asociado a la regulación transcripcional, pero su gran tamaño y flexibilidad conformacional han dificultado un estudio mecanístico detallado de la gran variedad de roles regulatorios a los cuales ha sido asociado (Soutourina, 2018). A pesar de esta limitación, y gracias a los avances de la crio-microscopía electrónica (Cryo-EM) de los últimos años, diversos trabajos resolvieron la estructura tridimensional del complejo (Rengachari et al., 2021; Schilbach et al., 2023), conformado por los módulos *head*, *middle*, *tail* y un Módulo Quinasa del Mediador (MKM), que puede encontrarse asociado o no al resto del complejo (Kornberg, 2005). Sumado a estudios bioquímicos, estos trabajos demostraron que el módulo *head* y *middle* constituyen el *core* necesario para la regulación transcripcional, mientras que el módulo *tail* y el MKM sirven como plataforma para la interacción con diversos factores regulatorios, sobre todo con los factores de transcripción (Cevher et al., 2014; Plaschka et al., 2015). Además, la

subunidad MED14 establece contactos con los módulos *head*, *middle* y *tail*, y funciona como una proteína *scaffold* con un rol determinante en la arquitectura del complejo (Robinson et al., 2015).

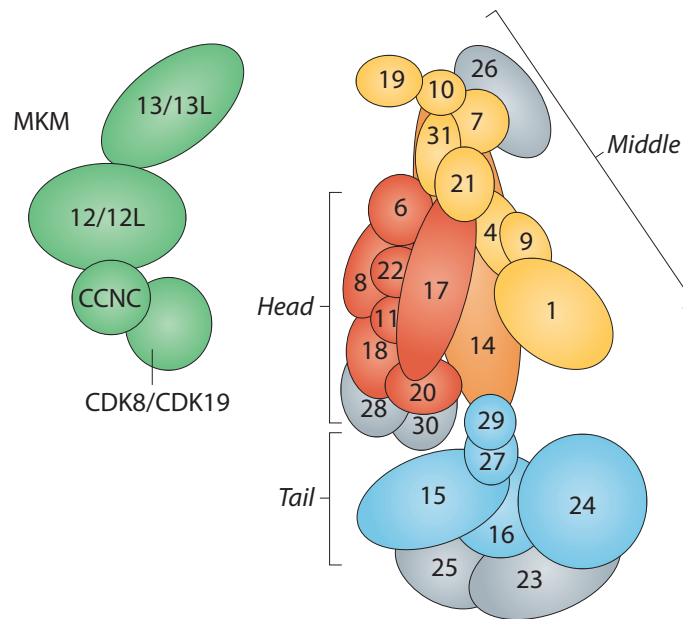


Figura I11: Composición estructural del complejo Mediador. El Mediador consiste en cuatro módulos distintos: el módulo *head* (en rojo), el módulo *middle* (en amarillo) y el módulo *tail* (en azul), que forman parte del core Mediador, y el módulo quinasas del Mediador (MKM) (en verde), que se asocia de forma modular al complejo. La subunidad MED14, indicada en naranja, vincula físicamente los tres módulos principales (*head*, *middle* y *tail*). En vertebrados, las subunidades CDK8, MED12 y MED13 (componentes del MKM) cuentan con los parálogos CDK19, MED12L y MED13L, respectivamente. La mayoría de las subunidades del complejo Mediador establecen múltiples contactos dentro del complejo, y los esquemas muestran una ubicación relativa de las subunidades. Si bien la localización exacta de cinco subunidades específicas (MED23, MED25, MED26, MED28 y MED30) aún no se ha definido (se indican en gris) ha sido propuesta una posible asignación de MED30, MED26 y MED23 a los módulos *head*, *middle* y *tail*, respectivamente. Adaptado de (Soutourina, 2018).

Los factores de transcripción reclutan al complejo Mediador a los *enhancers*, que facilitan la interacción con la RNAPII y el PIC. Dado que los *enhancers* tienen la capacidad de interactuar con promotores que pueden encontrarse a miles de pares de bases de distancia, esto evidencia la relevancia de la organización estructural del genoma en la regulación de la transcripción. En mamíferos, regiones genómicas de 1 Mpb o más se agrupan en dominios de asociación topológica (TADs), que se encuentran formados y mantenidos principalmente por el factor CTCF (Szabo et al., 2019). Dentro de los TADs, la proteína cohesina (Kagey et al., 2010) estabiliza la formación de *loops* cromatínicos que acercan físicamente *enhancers* y promotores. A través de los TF, el complejo Mediador interviene en esta interacción y estabiliza los *loops* cromatínicos (Downen et al., 2014), integrando la regulación de la actividad transcripcional con la organización del genoma.

Si bien no se conoce el mecanismo exacto a través del cual el complejo Mediador funciona como un puente entre las regiones regulatorias, diversos estudios demostraron que el complejo Mediador es primero reclutado a los *enhancers* y, gracias al *looping* cromatínico, establece contactos con los promotores. Así, la unión del Mediador induce cambios conformacionales en el PIC necesarios para la activación transcripcional. En la Figura I12 se ilustran los pasos regulados por el complejo Mediador. A través del módulo *head*, el mediador interactúa con TFIIB (Plaschka et al., 2015) y TFIID (Chen et al., 2021) favoreciendo el correcto posicionamiento de TFIIF en el PIC. A su vez, el módulo *middle* interactúa con la RNAPII (Sato et al., 2016) y asiste al posicionamiento de TFIIF cerca del CTD de la RNAPII (Chen et al., 2021). De esta manera, el Mediador induce, por un lado, la activación de XPB para la desnaturalización del promotor y, a su vez, estimula la actividad quinasa de CDK7 que fosforila la Serina 5 del CTD (Abdella et al., 2021). Dado que el Mediador se une con alta afinidad a la RNAPII cuando el CTD no está fosforilado (Robinson et al., 2016), la fosforilación en Serina 5 libera a la RNAPII de su interacción con el Mediador (Ebmeier et al., 2017; Max et al., 2007), promoviendo el escape del promotor y el inicio de la transcripción (Wong et al., 2014).

En este contexto, el MKM adquiere particular relevancia, dado que representa la única actividad enzimática conocida del Mediador y puede disociarse modularmente del resto del complejo. La subunidad CDK8 del MKM fosforila distintos factores de transcripción, elementos del PIC y al propio Mediador, influyendo en la formación y estabilidad del PIC, así como en la remodelación estructural del Mediador (Richter et al., 2022). Asimismo, ha sido reportado que el MKM es particularmente importante para regular cambios en la expresión génica en respuesta a estrés, dada su capacidad de fosforilar factores de transcripción (Donner et al., 2010). A su vez, estudios estructurales sugieren que el MKM y el módulo CAK de TFIIF se unen a regiones superpuestas del Mediador, por lo que la asociación del MKM al complejo Mediador previene la unión de TFIIF con la RNAPII (Knuesel et al., 2009). Estos resultados sugieren que el MKM estimula la actividad transcripcional al fosforilar factores de transcripción, pero a la vez previene el inicio de la transcripción dado que impide la unión de TFIIF. De esta manera, el MKM podría estimular la formación del PIC, pero a la vez prevenir la iniciación de la transcripción. Esto permitiría que las RNAPII estén cargadas en los promotores en un estado latente, esperando a su activación transcripcional. Así, el MKM podría “marcar” a ciertos genes para que exhiban una rápida activación ante un estímulo, lo cual ocurre presumiblemente luego de la disociación del MKM y la concomitante asociación de TFIIF.

El MKM también cumple un rol regulatorio en el pausado proximal y la transición a elongación de la RNAPII, dado que se asocia a elementos del SEC (Donner et al., 2010). Si bien no está claro si el MKM interactúa con el SEC como parte del complejo Mediador o como una entidad independiente, ha sido demostrado que el MKM fosforila factores y complejos que regulan el pausado de la RNAPII, como NELF, AFF4, p-TEFb (Poss et al., 2016). En este sentido, ha sido reportado que la inhibición farmacológica de CDK8 aumenta el pausado proximal de la RNAPII en respuesta a interferón- γ (Steinparzer et al., 2019), y de la misma manera, su depleción aumenta el pausado en genes inducibles por hipoxia (Galbraith et al., 2013). Así, el MKM podría estimular la transición a elongación de una RNAPII pausada en el promotor.

En conjunto, estos hallazgos indican que el MKM actúa como un *switch* molecular capaz de activar o reprimir la transcripción según las necesidades fisiológicas y el momento del ciclo transcripcional. Su capacidad de coordinar la actividad en *enhancers* y promotores, fosforilar factores de transcripción, reconfigurar la interacción entre el Mediador y la RNAPII en el PIC, y estimular la transición de RNAPII pausadas hacia la elongación productiva, destaca su función esencial en la regulación de la transcripción.

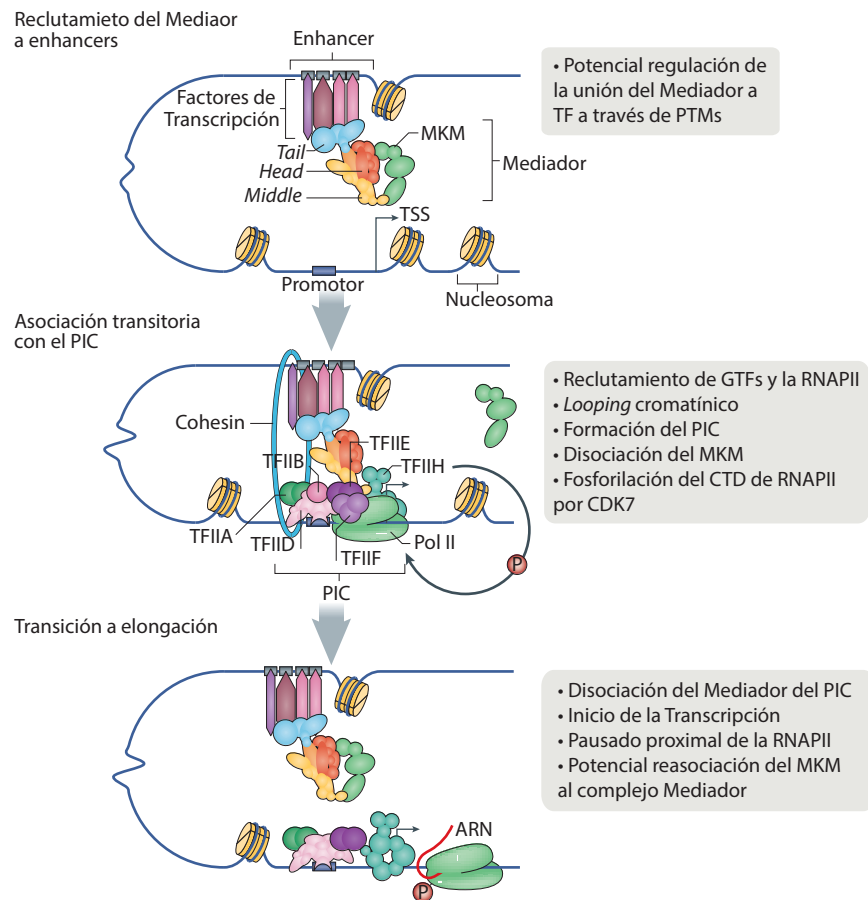


Figura I12. Reclutamiento del complejo Mediador y su rol en la regulación de la transcripción. El complejo Mediador no se une directamente al ADN, sino que es reclutado a los enhancers mediante su interacción con factores de transcripción. La interacción entre enhancers y promotores se establece a través de loops cromatínicos estabilizados a su vez por la cohesina. El Mediador acerca físicamente a los activadores transcripcionales al PIC en formación, facilitando su remodelación y promoviendo la actividad de TFIIF para iniciar la transcripción. Durante esta transición, se produce la disociación del MKM del Mediador, un evento que ha sido asociado con la activación transcripcional. Sin embargo, la secuencia exacta de eventos en los que ocurre la disociación del MKM, y la interacción entre el Mediador y el PIC en formación aún no ha sido completamente comprendida. Se ha propuesto que la función esencial del Mediador en el ensamblaje del PIC ocurre a través de asociaciones transitorias con sus componentes, y que, una vez disociado del PIC, el MKM podría reintegrarse al Mediador para regular el pausado proximal, aunque esta hipótesis requiere mayor evidencia experimental. Adaptado de (Soutourina, 2018).

Además de las fosforilaciones mediadas por el MKM, el propio complejo Mediador es susceptible de sufrir PTMs que resultan claves para la regulación transcripcional. En levaduras, ha sido reportado que la fosforilación del Mediador en su módulo *tail*, en particular en la subunidad MED15, regula la asociación del Mediador con distintos complejos co-activadores y con el propio MKM, modulando la expresión de genes de respuesta a estrés (Miller et al., 2012). De manera similar, la irradiación con luz UV de células humanas induce la fosforilación de la subunidad MED1, que modula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y la reparación del daño al ADN (Kim and Yun, 2017). En este sentido, el laboratorio de Stephen Jackson demostró que las subunidades CDK8 y Ciclina C (CCNC) del MKM cumplen un rol fundamental en la respuesta transcripcional al daño al ADN, ya que su depleción indujo una disminución de la síntesis de ARN, y en consecuencia, del estrés replicativo asociado a la transcripción en un contexto de estrés genotóxico (Lloyd et al., 2021). Estos hallazgos subrayan la importancia del Mediador como un punto de convergencia entre la regulación transcripcional y la respuesta al daño al ADN, posicionándolo como un regulador clave en la homeostasis celular bajo condiciones de estrés.

A partir de lo revisado hasta este punto, resulta evidente que la regulación de la transcripción y la actividad de la RNAPII son procesos altamente complejos, controlados por múltiples mecanismos que aseguran que la síntesis de ARN ocurra de manera controlada y eficiente. Esta regulación es fundamental para el correcto funcionamiento celular y permite a las células ajustar su actividad transcripcional en respuesta a diversos estímulos. En el siguiente capítulo se analizará el rol del sistema NER en la reparación del daño en el ADN y su impacto en la regulación transcripcional.

Capítulo 2: El daño al ADN y la reparación por el sistema NER

El daño al ADN y los sistemas de reparación

El ADN está constantemente expuesto a amenazas tanto endógenas como exógenas, alcanzando un estimado de 10^5 lesiones por célula por día (Hoeijmakers, 2009; Lindahl and Barnes, 2000). Dado que el ADN es la única macromolécula que porta la información genética y no puede ser reemplazada, su reparación es esencial para garantizar la estabilidad del genoma. Como resultado evolutivo de la amenaza constante a la que el genoma está expuesto, las células han desarrollado una colección de vías de reparación que se encargan de detectar el daño en el ADN, señalar su presencia y activar mecanismos de reparación (Jackson and Bartek, 2009).

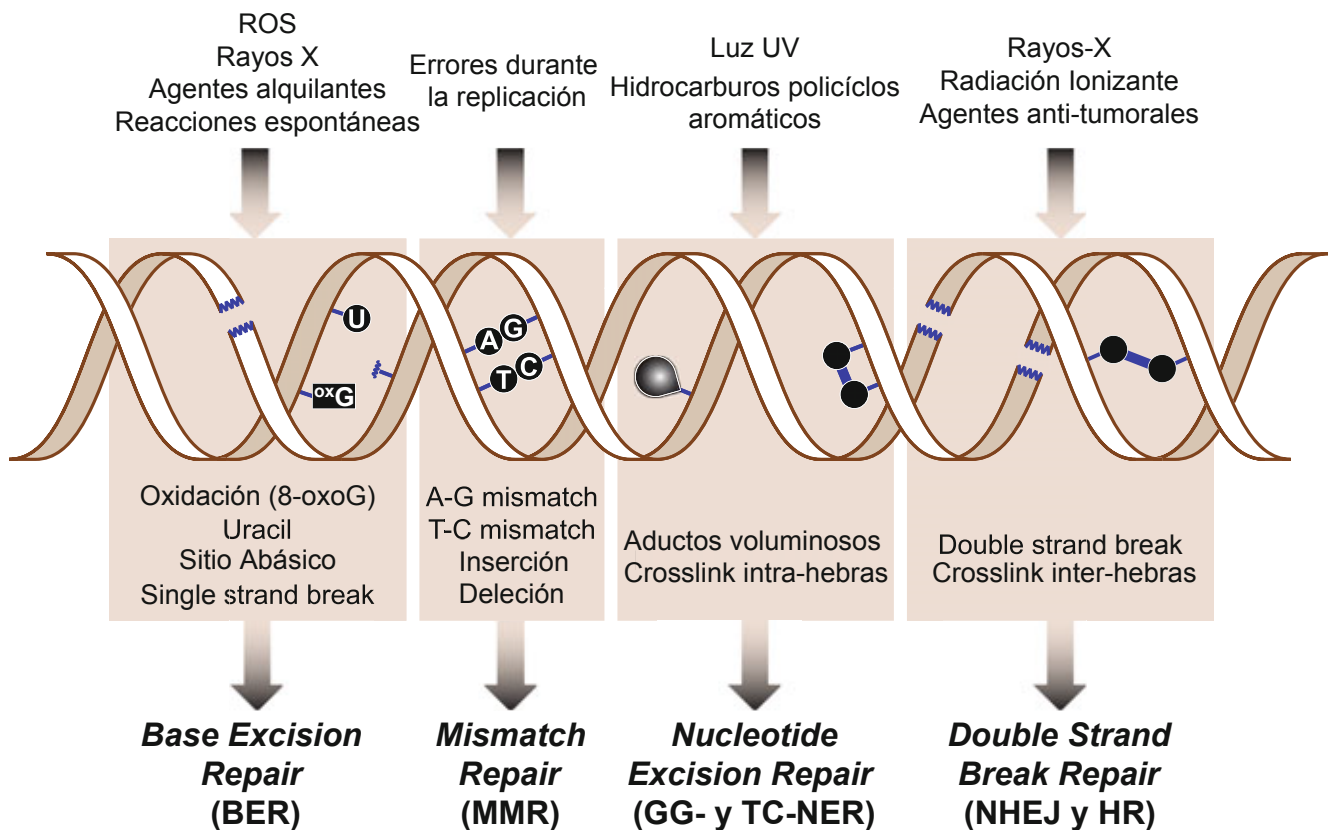


Figura I13: Daño al ADN y los distintos sistemas de reparación. El diagrama ilustra los agentes más comunes que dañan el ADN, las lesiones que causan y los mecanismos de reparación relevantes para cada uno de los tipos de daño. Adaptado de (Dexheimer, 2013).

Como se ilustra en la Figura I13, el ADN sufre diversos tipos de daño, cada uno reconocido y reparado por mecanismos específicos (Chatterjee and Walker, 2017). Los subproductos del metabolismo celular, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), inducen modificaciones químicas que generan sitios abásicos, 8-

OxoGuanina y *Single-Strand Breaks* (SSB), las cuales son reparadas, principalmente, por el sistema de reparación por escisión de bases (BER). Por su parte, agentes exógenos como la radiación UV causan uniones covalentes entre pirimidinas adyacentes en la doble hélice, que son reparadas por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Durante la replicación, la incorporación errónea de bases puede generar apareamientos incorrectos, inserciones o deleciones, que son corregidos por la vía de reparación de *Mismatches* (MMR). Las lesiones más graves son los *Double-Strand Breaks* (DSBs), que comprometen la estabilidad del genoma al fragmentar los cromosomas y, de no ser reparados, pueden generar aberraciones cromosómicas. Los DSBs son reparados mediante la Recombinación Homóloga (HR), que utiliza una copia intacta del ADN como molde, o por Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ), que es más rápida pero propensa a errores.

Más allá de los mecanismos de reparación, existen mecanismos de tolerancia al daño, que son específicos de la fase S del ciclo celular y se encargan de evitar la formación de DSB ante la presencia de otros daños de menor gravedad. A diferencia de las ADN polimerasas replicativas que se frenan ante una lesión en el ADN, las ADN Polimerasas de Translesión (TLS), como REV1, POL ζ y POL η , pueden sortear el daño y así disminuir la formación de DSB, aunque su actividad es proclive a errores y puede generar mutaciones.

Por último, si el daño en el ADN es excesivo o irreparable, se activan mecanismos de señalización que conducen a la apoptosis o, en algunos casos, a la senescencia celular, evitando la proliferación de células con inestabilidad genómica. En su conjunto, estos mecanismos de reconocimiento y reparación del daño constituyen un sistema altamente coordinado que preserva la integridad celular. En esta tesis de doctorado nos centraremos en el daño al ADN inducido por UV y el sistema NER.

El sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

El sistema NER es uno de los mecanismos de reparación más versátiles que poseen las células (Noussipikel, 2009), dado que reconoce una amplia gama de tipos de daño en el ADN. Esta característica se debe a su capacidad de reconocer la distorsión en la doble hélice inducida por el daño, más que a la lesión en sí misma. Así, el sistema NER lidia con una gran variedad de lesiones, incluyendo aductos de ADN voluminosos formados por compuestos químicos como la 4-nitroquinolina (4-NQO), agentes intercalantes del ADN como el cisplatino, un tipo particular de daño oxidativo, las ciclopurinas, y el daño inducido por radiación UV (Noussipikel, 2009).

En particular, la radiación UV abarca longitudes de onda que van desde los 100 hasta los 400 nm. Dentro de este espectro, se subdivide en UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) y UVA (315-400 nm). Aunque el UVC emitido

por el sol es mayoritariamente filtrado por la atmósfera terrestre y por lo tanto no tiene un impacto en la salud, tanto el UVB como el UVA alcanzan la superficie, donde pueden inducir lesiones en el ADN por estrés oxidativo y uniones covalentes entre pirimidinas adyacentes. Sin embargo, suele emplearse UVC para estudiar el impacto de la radiación UV en el ADN, dado que no induce estrés oxidativo, pero resulta altamente eficiente en la inducción de uniones covalentes entre dos pirimidinas adyacentes en la misma hebra, principalmente dímeros de pirimidina por ciclobutano (CPDs) y fotoproductos 6-4 pirimidín-pirimidona (6-4PPs) (Besaratina et al., 2011). De esta manera, la utilización de UVC permite desacoplar los tipos de daños inducidos principalmente por el UVB, y así comprender el efecto de los dímeros de pirimidina en la respuesta celular ante este tipo particular de lesiones.

El reconocimiento de los CPDs y los 6-4PPs se logra a través de dos vías diferentes que luego utilizan los mismos factores para reparar la lesión: el sistema de reconocimiento global del genoma (GG-NER) y el sistema de reconocimiento acoplado a la transcripción (TC-NER). GG-NER detecta el daño en todo el genoma, mientras que TC-NER detecta el daño de manera exclusiva en la hebra molde de genes transcripcionalmente activos. Ambos sistemas de detección convergen en un único mecanismo de reparación que involucra el reclutamiento del GTF TFIIH que contiene las helicasas necesarias para la apertura de la doble hélice (XPB/XPD), seguido por la confirmación de la presencia del daño (XPA), la escisión del fragmento que contiene la lesión (XPG/XPF) y la síntesis de ADN *de novo* llevada a cabo por ADN Polimerasas que completan la reparación (Marteijn et al., 2014). La Figura I14 muestra una simplificación esquemática del proceso NER, mientras que la Figura I15 muestra el detalle molecular de cada uno de los pasos de reconocimiento y procesamiento del daño.

Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

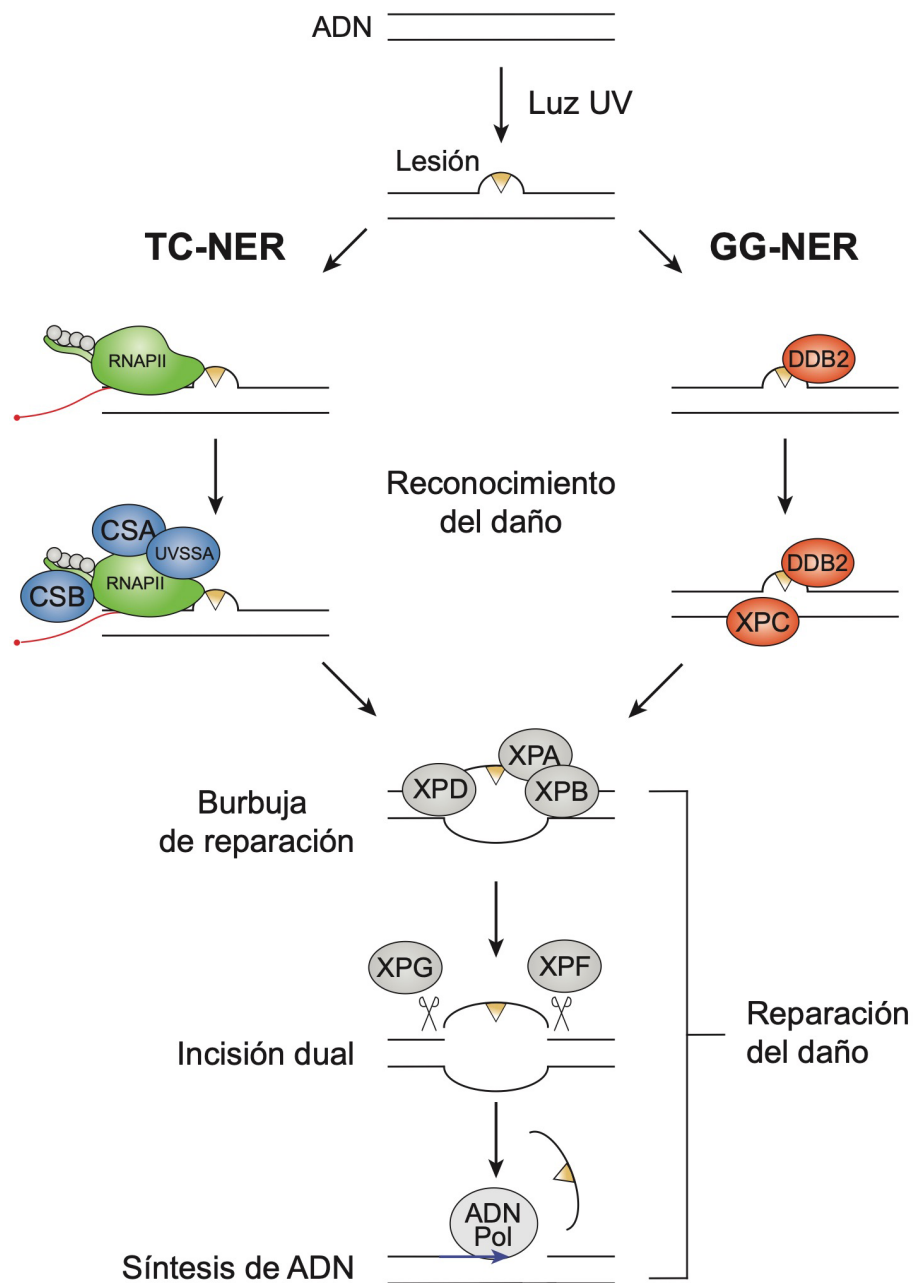


Figura I14: Simplificación esquemática del sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). La radiación UV induce un daño en el ADN que es reconocido a través de dos vías: GG-NER, que actúa en todo el genoma, y TC-NER, que se limita a la hebra molde en genes en activa transcripción. Ambos mecanismos convergen en la reparación

propiamente dicha, que implica el reclutamiento del factor de transcripción TFIIH (XPB/XPD), seguido de la confirmación de la lesión (XPA), la incisión (XPG/XPF) y la síntesis por ADN polimerasas.

Reconocimiento global del genoma (GG-NER)

El sistema GG-NER detecta CPDs o 6-4PPs en cualquier región del genoma gracias a los factores de reconocimiento *Xeroderma Pigmentosum group C* (XPC) y *UV-Damaged DNA Binding Protein 2* (UV-DDB2, o sólo DDB2). La unión de XPC a una lesión en el ADN es el paso limitante del reconocimiento por GG-NER, y representa el primer evento que desencadenará luego la reparación del daño (Volker et al., 2001). XPC no se une directamente al daño, sino que reconoce el ADN simple cadena (ssDNA) expuesto en la hebra opuesta a la lesión (Min and Pavletich, 2007; Paul et al., 2019). Esta característica permite que XPC reconozca múltiples tipos de daño en el ADN, lo cual explica la amplia variedad de lesiones que puede detectar GG-NER. Sin embargo, la eficiencia de reconocimiento por XPC varía según el tipo de lesión, pudiendo ser muy baja para determinadas lesiones, como por ejemplo los CPDs (X. Chen et al., 2015; Sugasawa et al., 2001). En comparación a los 6-4PPs, los CPDs no sólo son inducidos 5 a 10 veces más (Ravanat et al., 2001; Sproul et al., 2014), sino que además inducen una menor distorsión en el ADN (Mitchell et al., 1985; Sugasawa et al., 2005) y permanecen, en consecuencia, por más tiempo en el genoma (X. Chen et al., 2015; Sugasawa et al., 2001). DDB2 sirve como un factor de reconocimiento auxiliar capaz de unirse específicamente a los CPDs y favorecer el reclutamiento de XPC. Esto es logrado gracias a que la unión de DDB2 a un CPD induce una distorsión más aparente en el ADN, resultando en un mejor sustrato para XPC (Scrima et al., 2008). Así, el factor DDB2 es necesario para el reconocimiento del daño, específicamente en el caso de los CPDs (Fitch et al., 2003), facilitando el reclutamiento de XPC, al cual le “entrega” la lesión.

Además de unirse a la lesión en el ADN, el factor DDB2 forma parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa junto con los factores CUL4A, RBX1 y DDB1, denominado CRL4^{DDB2}. En respuesta al daño al ADN, el complejo se disocia de su inhibidor alostérico COP9 (CSN) y se produce la conjugación de NEDD8 a la proteína CUL4A, pasando a un estado activado (Groisman et al., 2003). La activación de CRL4^{DDB2} induce la ubiquitinación de DDB2 y de XPC, lo cual es necesario para el reclutamiento de TFIIH a la lesión, que es el punto de convergencia entre GG-NER y TC-NER (Apelt et al., 2021).

Reconocimiento acoplado a la transcripción (TC-NER)

El daño en el ADN inducido por UV en la hebra molde de genes en activa transcripción es reconocido por el sistema de reparación acoplado a la transcripción (TC-NER) (van den Heuvel et al., 2021). El evento de reconocimiento en esta vía es una RNAPII en activa elongación que, cuando se encuentra con una lesión, se frena dado que no puede sortear el daño. Tanto los CPDs como los 6-4PPs son igualmente reconocidos ya que ambos inducen una distorsión en el ADN que bloquea a la RNAPII (Hu et al., 2015). El frenado o *stalling* de la RNAPII recluta al factor de TC-NER *Cockayne Syndrome B* (CSB), que es una translocasa de ADN dependiente de ATP con actividad 3'-5'. En condiciones normales, CSB interactúa de manera transitoria con la maquinaria de transcripción, pero al frenarse la RNAPII, CSB se une de forma estable a la RNAPII detenida (Tufegdžić Vidaković et al., 2020; van den Boom et al., 2004). Estudios sobre Rad26, el ortólogo de CSB en *S. cerevisiae*, han mostrado que, al unirse a la RNAPII estancada y gracias a su actividad translocasa de ADN, Rad26 empuja a la RNAPII hacia adelante para intentar sortear la lesión (Xu et al., 2017). Estructuras de Cryo-EM del complejo RNAPII-TC-NER validaron aún más este modelo (Kokic et al., 2021). Estos resultados podrían explicar por qué daños menos voluminosos, como el 8-OxoG generado por ROS, pueden ser eludidos y, si bien inducen una disminución en la tasa de elongación o un pausado transitorio, no representan una lesión que bloquee la progresión de la RNAPII (Charlet-Berguerand et al., 2006). De esta manera, la unión persistente de CSB a la RNAPII frenada es el principal evento que desencadena el reclutamiento de los factores subsiguientes específicos de TC-NER (Nakazawa et al., 2020).

La unión de CSB a la RNAPII frenada induce el reclutamiento del factor *Cockayne Syndrome A* (CSA) (van der Weegen et al., 2021, 2020). El complejo E3 ubiquitina ligasa que actúa en el reconocimiento por GG-NER, conformado por CUL4A, RBX1 y DDB1 unido a DDB2 (CRL4^{DDB2}), también cumple un rol fundamental en TC-NER, donde el factor DDB2 es reemplazado por CSA, conformando el complejo E3 CRL4^{CSA}. Además, de manera específica para CRL4^{CSA}, se ha identificado recientemente al factor DDA1 que promueve la actividad ubiquitina ligasa de CRL4^{CSA} (Llerena Schiffmacher et al., 2024; Pines et al., 2023). De esta manera, el complejo CRL4^{CSA} induce la auto-ubiquitinación de CSA, la ubiquitinación de CSB (Fischer et al., 2011; Groisman et al., 2006; Kokic et al., 2021) y, de particular relevancia para esta tesis, la ubiquitinación de la subunidad RPB1 de la RNAPII en su lisina (K) 1268 (Nakazawa et al., 2020; Tufegdžić Vidaković et al., 2020). La ubiquitinación de RPB1 en la K1268 es un *checkpoint* crucial en la vía de TC-NER, dado que estimula el traspaso o *handover* de la lesión de la RNAPII a TFIIH, así como la posterior degradación proteasomal de RPB1 (Nakazawa et al., 2025). Además, ha sido descripto que ELOF1, un factor de elongación involucrado en la interacción entre el complejo CRL4^{CSA} y la RNAPII,

es relevante para la ubiquitinación del residuo K1268 (Geijer et al., 2021; van der Weegen et al., 2021). Por su parte, el factor STK19, recientemente identificado como un factor de TC-NER, cumple un rol fundamental en este proceso al facilitar el correcto posicionamiento de CSA y la RNAPII (Mevissen et al., 2024; Ramadhin et al., 2024; Tan et al., 2024; van den Heuvel et al., 2024). Si bien el rol de STK19 en la ubiquitinación de RPB1 es aún controversial, cumple un rol fundamental en la estabilización y remodelación del complejo arrestado, facilitando los pasos subsiguientes (Kuper et al., 2024)

La ubiquitinación del residuo K1268 induce la remodelación del complejo de TC-NER, facilitando el reclutamiento del factor UVSSA (van der Weegen et al., 2020). La incorporación de UVSSA al sitio de la lesión estimula la mono-ubiquitinación en su residuo K414 (Nakazawa et al., 2020), la cual a su vez promueve el reclutamiento de TFIIH al sitio de la lesión (Okuda et al., 2017). De esta manera, células depletadas de UVSSA presentan defectos en la reparación, pero no en la ubiquitinación de la K1268 de RPB1. Además de estimular la unión de TFIIH, UVSSA favorece el reclutamiento de la enzima de-ubiquitinadora USP7, cuyo rol en el sistema TC-NER es motivo de controversia. Por un lado, se ha demostrado que USP7 promueve la de-ubiquitinación y estabilización de CSB, necesario para la posterior reanudación de la transcripción (Schwertman et al., 2012). Por otro, algunos estudios indican que la ubiquitinación de CSB desencadena su degradación, algo esencial para una reparación eficiente (Groisman et al., 2006). Así, el rol de USP7 y el destino de CSB en respuesta al daño en el ADN aún es motivo de debate.

En resumen, cuando una RNAPII en activa elongación se frena ante una lesión, se reclutan secuencialmente CSB, CRL4^{CSA} y STK19, que junto a ELOF1 favorecen la ubiquitinación del residuo K1268 de RPB1 y la remodelación del complejo de TC-NER. Una vez que la RNAPII es ubiquitinada, se promueve el reclutamiento de UVSSA y la subsiguiente unión de TFIIH.

Reparación del daño por el sistema NER

El punto de convergencia entre el reconocimiento de lesiones por TC-NER y GG-NER es el reclutamiento de TFIIH a la lesión (N. N. Moreno et al., 2023). En este sentido, se identificó que XPC y UVSSA comparten el sitio al cual se unen en TFIIH (Okuda et al., 2017), por lo que el correcto posicionamiento de este GTF en cada uno de los complejos de reconocimiento es un paso crucial para gatillar la reparación propiamente dicha. Como se muestra en la Figura I8, TFIIH posee un módulo *core* que contiene a las helicasas XPD y XPB, y un módulo CAK que posee a la quinasa CDK7. Una vez que TFIIH es reclutado a la lesión, el factor XPA se incorpora al complejo de reparación

e induce la disociación del módulo CAK (Coin et al., 2008). Este remodelamiento estimula la actividad de la helicasa de XPD (Winkler et al., 2000), que junto con XPB desnaturaliza el ADN en el sitio circundante a la lesión (Coin et al., 2007). La desnaturalización del ADN cumple además un rol fundamental en la verificación de la presencia del daño, dado que la actividad helicasa de XPD es bloqueada cuando se encuentra con la lesión, y es esto lo que verifica efectivamente la presencia del daño, evitando iniciar un proceso de reparación indeseada en sitios sin lesiones (Nocentini et al., 1997; Sugawara et al., 2009). De manera análoga al inicio de la transcripción, la actividad helicasa de TFIIH induce la formación de la “burbuja” de reparación. Este proceso expone ssDNA, lo cual favorece el reclutamiento de la proteína RPA, que se une a la hebra complementaria a la lesión y, junto con XPA, estabilizan la burbuja de reparación (Topolska-Woś et al., 2020). Luego, las endonucleasas XPG y XPF-ERCC1 son reclutadas, favoreciendo la ruptura de enlaces fosfodiéster a ambos lados de la lesión y generando la escisión de un fragmento de ssDNA de 22 a 30 nucleótidos de longitud. Finalmente, el factor PCNA es reclutado, estimulando la síntesis de ADN por las Polimerasas replicativas ϵ o δ , aunque ha sido reportado que la Polimerasa de translesión κ también puede participar en este proceso (Nieto Moreno et al., 2023). Por último, las ADN Ligasas I o III se reclutan al sitio de la lesión, sellando el *nick* generado y finalizando el proceso de reparación (Marteijn et al., 2014).

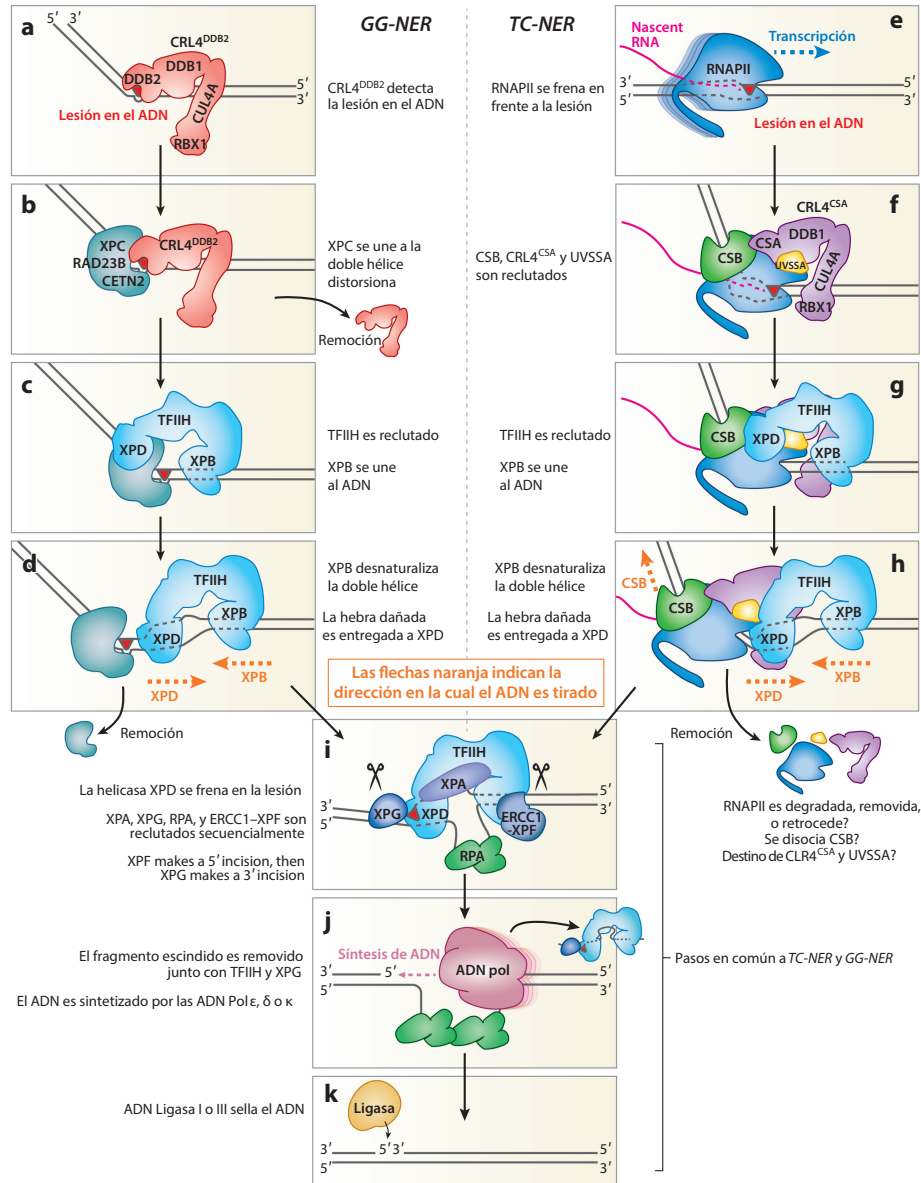


Figura I15. Detalle del proceso de reconocimiento por el sistema GG-NER (a-d), por el sistema TC-NER (e-h) y por el procesamiento del daño compartido por los dos sistemas de reconocimiento (i-k). (a) CRL4^{DB2} se une a la lesión. (b) El heterotrímero XPC-RAD23B-CETN2 es reclutado y se une a la hebra complementaria a la lesión. (c) TFIH es reclutado a través de la interacción con XPC. (d) La actividad helicasa de XPB y XPD inducen la desnaturalización del ADN. El procesamiento del daño continúa en el panel i. (e) La RNAPII se frena en la lesión. (f) CSB, CRL4^{CSA} y UVSSA son secuencialmente reclutados a la lesión y forman el complejo de reparación por TC-NER. (g) TFIH es reclutado a través de la interacción con UVSSA, en un proceso que depende de la ubiquitinación en el residuo K1268 de RPB1, ELOF1 y STK19 (no mostrados). (h) La actividad helicasa de XPB y XPD inducen la desnaturalización del ADN. Desde este punto, los dos sistemas de reconocimiento convergen en el procesamiento del daño. (i) La helicasa XPD desnaturaliza el ADN en dirección a la lesión, y se frena en la lesión, lo cual confirma la presencia del daño. XPA, RPA, XPG y ERCC1-XPF son reclutadas. XPC-RAD23B-CETN2 (GG-NER) o el complejo RNAPII-CSB-CRL4^{CSA}-UVSSA (TC-NER) son removidos de la cromatina. XPF y XPG inducen la hidrólisis de un enlace fosfodiéster en la hebra dañada a ambos lados de la lesión. (j) El fragmento dañado es removido formando un complejo con TFIH y XPG. ADN Polimerasas (ε, δ, o κ) sintetizan ADN utilizando la hebra sana como molde. (k) El nick es sellado por ADN ligasas (I o III) y el proceso de reparación completado. Adaptado de (N. N. Moreno et al., 2023).

Ubiquitinación de RNAPII

La ubiquitinación y degradación de RPB1 en respuesta al UV fue descrita hace más de 20 años (Bregman et al., 1996; Ratner et al., 1998), pero el mecanismo exacto que regula este proceso aún no se conoce en detalle. Sin embargo, la reciente identificación de que el residuo K1268 de RPB1 es el principal residuo involucrado en la ubiquitinación de RPB1 permitió comprender en mayor detalle este mecanismo. Células que expresan la versión mutante K1268R de RPB1 (en los cuales la K es reemplazada por una R no ubiquitinable), mostraron específicamente una abolición en la ubiquitinación y degradación de RPB1 en respuesta a la irradiación UV (Nakazawa et al., 2020; Tufegdžić Vidaković et al., 2020). Sin embargo, se observa una mono-ubiquitinación residual en células K1268R, lo que sugiere que otros residuos pueden ser ubiquitinados y relevantes para la reparación de la lesión y la estabilidad de RPB1. En este sentido, la mono-ubiquitinación de RPB1 puede suprimirse completamente en presencia del inhibidor farmacológico MLN4924, un inhibidor del proceso de neddilación requerido para la activación de E3s de la familia “Cullin-Ring Ligases” (CRL) (Nakazawa et al., 2020; Tufegdžić Vidaković et al., 2020). En consecuencia, se han propuesto varias E3 ligasas como responsables de la ubiquitinación de RPB1 (Wilson et al., 2013), entre las que se destaca el complejo E3 Ligasa CRL4^{CSA} en la ubiquitinación del residuo K1268 de RPB1 en respuesta al UV (Nakazawa et al., 2020; van der Weegen et al., 2020). Aunque 45 minutos luego del UV, la ubiquitinación del residuo K1268 es independiente de CSA, 2 horas luego de la irradiación, células CSA-KO exhiben una drástica prevención en la ubiquitinación de RPB1 en comparación con células WT (Tufegdžić Vidaković et al., 2020).

Por otra parte, se ha demostrado que células deficientes en USP7 exhiben una degradación más rápida de RPB1 en respuesta a UV (Steurer et al., 2022), así como deficiencias en la reparación por TC-NER (Zhu et al., 2024). Estos resultados expanden el rol USP7 en TC-NER sugiriendo que varios pasos de ubiquitinación/de-ubiquitinación son necesarios para promover la reparación del daño y a su vez estimular la degradación de RPB1, por lo que no resulta sorprendente que varios complejos E3 ligasa hayan sido asociados a la degradación de RPB1. Por ejemplo, ha sido reportado que NEDD4 primero mono-ubiquitina a RPB1 y luego CRL5^{ElonginA-BC} la poli-ubiquitina, favoreciendo la degradación en el proteasoma (Anindya et al., 2007; Harreman et al., 2009; Yasukawa et al., 2008). A su vez, otro modelo sugiere que BRCA1/BARD1 están involucrados en la ubiquitinación de la RNAPII en respuesta al daño al ADN (Starita et al., 2005). Por último, ha sido también propuesto que CRL3^{ARMCS} está involucrada en la ubiquitinación y degradación de la RNAPII en ciertas enfermedades, como la hiperplasia adrenal (Lao et al., 2022). En resumen, aunque el mecanismo que regula la ubiquitinación y degradación de la RNAPII en distintos escenarios sigue sin conocerse detalladamente, varios complejos E3 ligasa han sido asociados

a la ubiquitinación de RPB1. Estos resultados podrían indicar un proceso de múltiples etapas en el control de la ubiquitinación de RPB1, con múltiples E3 ligasas involucradas en diferentes pasos, o quizás, múltiples mecanismos que controlan el destino de RNAPII en distintos contextos.

Degradación de RNAPII: ¿Un último recurso?

La detención de la RNAPII en una lesión inducida por radiación UV recluta factores de TC-NER que promueven la reparación del ADN. Sin embargo, la RNAPII detenida en el daño ocluye a la lesión, dado que esta se ubica en el núcleo del sitio activo de RPB1 y por lo tanto queda inaccesible para la maquinaria de reparación subsiguiente (Donahue et al., 1994; Tornaletti et al., 1999). De este modo, el destino de una RNAPII frenada incluye diversos escenarios posibles, los cuales tienen en común que la lesión será expuesta para permitir la reparación. Por un lado, ha sido propuesto que el destino de una RNAPII detenida incluye el retroceso en sentido 3'-5' (*backtracking*) que permite la exposición y reparación del daño. Una vez reparado el daño, el factor de elongación TFIIS estimula el clivado del ARN naciente, generando un nuevo extremo 3' correctamente posicionado en el sitio activo de RPB1 que permita la reanudación de la transcripción desde el sitio donde se encontraba el daño (Noe Gonzalez et al., 2021). En este sentido, el “modelo del último recurso” (Wilson et al., 2013), postula que cuando el retroceso no es posible, RPB1 es específicamente degradada como último recurso para exponer la lesión y así permitir su reparación. Este modelo, propuesto originalmente por el Dr. Jesper Svejstrup hace más de 20 años (Woudstra et al., 2002), asume una degradación *in cis* a la lesión, en la cual la RNAPII detenida es la que se degrada. Sin embargo, actualmente se sabe que la situación es más compleja, ya que la degradación de RPB1 podría no ser necesariamente un último recurso, sino un mecanismo concertado de vital importancia para regular la reparación y la respuesta transcripcional al UV.

Por un lado, ha sido demostrado que el reinicio de la transcripción ocurre en una ola 5'-3' desde el TSS después de UV, y no desde el sitio de la lesión (Andrade-Lima et al., 2015; van den Heuvel et al., 2021), por lo que el modelo de *backtracking* y reinicio de la transcripción no parece ser el escenario más frecuente. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la ubiquitinación de la K1268 es crucial para el reclutamiento de TFIIF, por lo que la ubiquitinación de la RNAPII es necesaria, en primera instancia, para la reparación del daño y no exclusivamente para su degradación (Nakazawa et al., 2020). A su vez, ha sido demostrado que la prevención de la ubiquitinación en el residuo K1268 enlentece la disociación de la RNAPII de la lesión, dificultando, en consecuencia, la reparación (Tufegdžić Vidaković et al., 2020). Estos resultados apoyan un modelo en el cual la ubiquitinación de la RNAPII es necesaria para entregar la lesión a TFIIF, y luego es removida de la cromatina (Jia

et al., 2021; van der Weegen et al., 2020). Además, remarcan la importancia de dilucidar el rol de USP7 en la dinámica de ubiquitinación de la RNAPII, así como su rol en la reparación del daño y degradación de RPB1. Resulta evidente que la ubiquitinación de la RNAPII es un proceso altamente regulado necesario para la reparación del daño y la degradación de RPB1. A su vez, es probable que más de un residuo K y más de un tipo de complejo E3 sean relevantes para la regulación de la reparación del daño, la estabilidad de RPB1 y, en consecuencia, el control de la expresión génica ante el daño al ADN.

En apoyo al modelo en el cual la RNAPII entrega la lesión a TFIIH, un gran número de trabajos ha sido publicado recientemente, remarcando la importancia de la ubiquitinación de la K1268 de RPB1 para la reparación del daño y la remoción de la RNAPII de la cromatina. Por un lado, el reclutamiento de CSB y CSA, y la concomitante ubiquitinación de la RNAPII, son necesarios para el reclutamiento de UVSSA y TFIIH, y por lo tanto para la reparación (Nakazawa et al., 2020). Por otro lado, la ubiquitinación en la K1268 de RPB1 es necesaria para remover a la RNAPII de la cromatina. De esta manera, si la RNAPII no es ubiquitinada, esta queda persistentemente unida a diversos tipos de lesiones y obstruye otros procesos en el ADN, como el reinicio de la transcripción y la replicación (Carnie et al., 2024; Oka et al., 2024; van Sluis et al., 2024). A su vez, ha sido demostrado que la remoción de la RNAPII de la cromatina depende del factor VCP/p97, una segregasa dependiente de ubiquitina asociada a la degradación de RPB1 (He et al., 2016; Verma et al., 2011). En estos trabajos, se demostró que en células deficientes para UVSSA, donde el reclutamiento de TFIIH se ve impedido y por lo tanto la reparación, la RNAPII ubiquitinada es removida de la lesión de manera dependiente de VCP/p97 (Gonzalo-Hansen et al., 2024; Zhu et al., 2024). Esto sugiere que en células competentes para TC-NER (donde TFIIH se recluta normalmente), VCP/p97 no sería estrictamente necesaria para la remoción de la RNAPII de la cromatina. Así, estos resultados sugieren que la transferencia de la lesión desde la RNAPII a TFIIH no implica de forma obligatoria la extracción de la RNAPII de la cromatina. Sin embargo, la ubiquitinación de la RNAPII emerge como un paso clave tanto para la reparación del daño y la subsiguiente entrega de la lesión a TFIIH, como para la eventual remoción de la RNAPII de la cromatina cuando el reclutamiento de TFIIH se ve impedido.

Estos resultados no sólo demuestran que aún es necesario explorar la multiplicidad de mecanismos que gobiernan la ubiquitinación y degradación de RPB1, sino que además permiten comprender las notables diferencias clínicas entre pacientes con deficiencias en CSA y CSB, y aquellos con deficiencias en UVSSA. Pacientes con deficiencias en CSB y CSA muestran un fenotipo clínico muy severo, dado que no ubiquitinan a la RNAPII y por lo tanto esta no puede ser removida de la cromatina por ningún medio. En contraste, pacientes con deficiencias en UVSSA no pueden reparar eficientemente la lesión, pero sí pueden ubiquitinar RPB1 y remover

la RNAPII de la cromatina de manera dependiente de VCP/p97. En todos los casos, la reparación de la lesión por TC-NER se encuentra impedida, por lo que en su conjunto estos datos demuestran que la imposibilidad de remover a la RNAPII de la cromatina es la causa de los fenotipos severos de pacientes CS, y no deficiencias en la reparación acoplada a la transcripción, que son compartidos con UVSSA.

Bien sea como un último recurso, o como parte de un proceso necesario para promover la reparación del daño al ADN, los modelos discutidos hasta aquí consideran la degradación de RPB1 *in cis* respecto a la lesión. Sin embargo, el escenario es aún más complejo, dado que ha sido reportado recientemente que RPB1 puede ser degradada de manera global, o *in trans* a la lesión, en respuesta al UV (Bay et al., 2022; Steurer et al., 2022). Ensayos de FRAP usando GFP-RPB1 mostraron la degradación de RPB1 unida a promotores tras el tratamiento con UV, incluso en regiones no dañadas del genoma. A su vez, se demostró que se requiere una elongación productiva de RNAPII para la degradación de RPB1 unida a promotores, dado que el tratamiento con flavopiridol (un inhibidor de CDK9 que impide la liberación de RNAPII de la pausa cercana al promotor (Jonkers et al., 2014)) previno por completo la degradación de RPB1. De la misma manera, la inhibición de GSK3, una quinasa del CTD de RPB1 implicada en la regulación de la iniciación y elongación (Nieto Moreno et al., 2020), también previno parcialmente la degradación de RPB1 (Steurer et al., 2022). A su vez, esta degradación de RPB1 también depende de VCP/p97 y, dado que se trata una segregasa dependiente de ubiquitina, RPB1 necesariamente debe ser ubiquitinada cuando está unida al promotor para que sea dirigida a su degradación. De esta manera, estos trabajos apoyan un modelo en el cual la RNAPII que se encuentra con la lesión *in cis* estimula, por un mecanismo desconocido, la degradación *in trans* de RPB1 pausada en la región proximal al promotor.

En este sentido, otros trabajos recientes demostraron que, en condiciones sin UV, CRL3^{ARMCS} estimula la ubiquitinación y degradación de la RNAPII pausada en la región proximal al promotor, previniendo de esta manera la transición a elongación y evitando así la transcripción de complejos de RNAPII defectuosos (Bleas et al., 2024; Cacioppo et al., 2024). Estos resultados refuerzan la hipótesis que diversos complejos E3 ligasa están involucrados en la degradación de RPB1 en distintos contextos celulares, y confirman que la E3 ligasa CRL3^{ARMCS} está involucrada en ausencia de daño en el ADN.

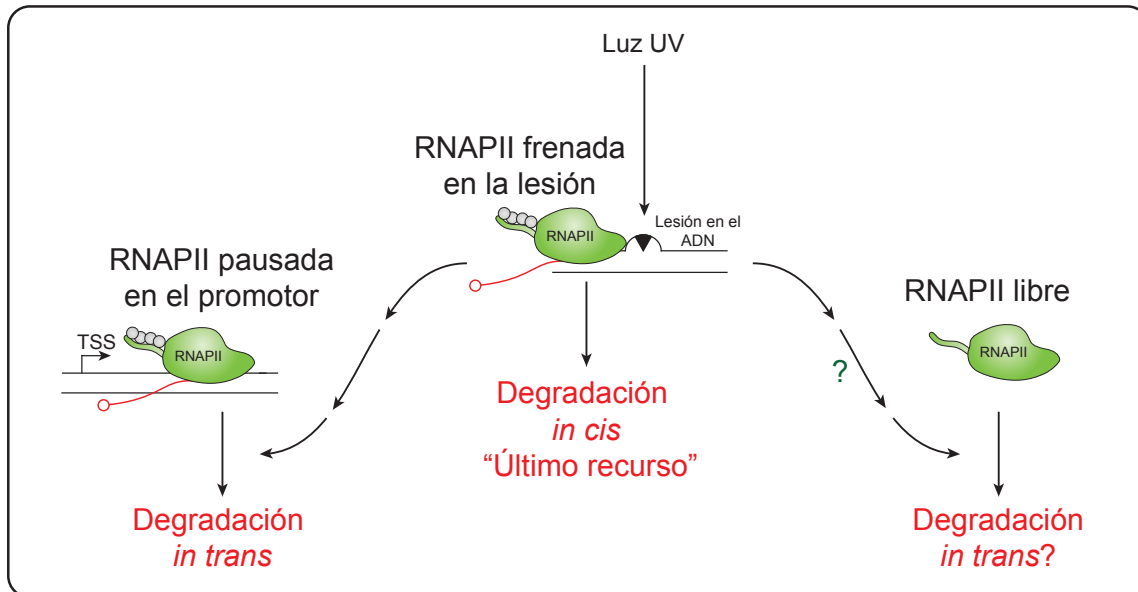


Figura 116: Posibles mecanismos de degradación de la RNAPII. La degradación de RPB1 ha sido históricamente asociada a un “último recurso”, donde la RPB1 es degradada *in cis* para facilitar el acceso de los factores subsiguientes de TC-NER (centro). Más recientemente se demostró la degradación *in trans* de RPB1 pausada en la región proximal al promotor (izquierda). Además, se demostró que, en respuesta al tratamiento con *triptolide*, RPB1 se degradada de manera independiente a VCP/p97 (no mostrada), en lo que presumiblemente constituye un mecanismo de degradación de RPB1 no asociada a la cromatina (derecha). Adaptado de (Muñoz et al., 2022)

En este contexto, ha sido también demostrado que, en células no irradiadas, la depleción del factor SPT5 induce la degradación de moléculas de RPB1 unida a promotores de manera dependiente de VCP/P97 (Aoi et al., 2025, 2021). SPT5 forma parte del complejo DSIF (SPT4/SPT5) y cumple un rol importante en la iniciación, el pausado en la región proximal al promotor y la elongación transcripcional (Decker, 2021). Esta degradación también depende de CRL3^{ARMCS}, reforzando así la hipótesis de múltiples mecanismos de ubiquitinación y degradación de RPB1 (Aoi et al., 2025).

La degradación de RPB1 unida a promotores tras la depleción de SPT5 también depende de la transición a elongación, dado que el silenciamiento de CDK9 en células sin SPT5 previno la degradación de RPB1 (Aoi et al., 2025, 2021). Sin embargo, las funciones de SPT5 no se limitan únicamente a la regulación transcripcional de la RNAPII, ya que se ha propuesto que SPT5 puede mantener a la RNAPII en una conformación de elongación cerrada que resulta inaccesible para la maquinaria de reparación, reprimiendo así la reparación por TC-NER (Li et al., 2014). En línea con esta observación, se demostró que SPT5 compite con CSB por la unión a RNAPII (Kokic

et al., 2021; Xu et al., 2017), lo que sugiere que la RNAPII podría pasar de la elongación activa con SPT5 unido, a un estadio de pausa o detención, cuando SPT5 es desplazado por CSB. Por último, el tratamiento con *triptolide*, una droga que induce la degradación específica de XPB, en células depletadas de SPT5 indujo, por un mecanismo desconocido, la degradación de RPB1 de manera independiente de VCP/p97, indicando que la RPB1 libre, no fosforilada ni unida a la cromatina, también puede degradarse (Aoi et al., 2021). Sin embargo, este resultado ha sido reportado en una figura de un solo trabajo, y por lo tanto los mecanismos subyacentes aún no han sido explorados.

Los resultados revisados en este capítulo demuestran que existe una gran diversidad de mecanismos por los cuales la RNAPII es degradada en respuesta al UV (Figura I16). Por un lado, el último recurso propone que la RNAPII es degradada para exponer la lesión cuando el *backtracking* está impedido. Sin embargo, la degradación *in cis* de la RNAPII es parte de un proceso más complejo que un simple último recurso, dado que la ubiquitinación mediada por CSA de la K1268 de RPB1 es necesaria para la reparación y el traspaso del daño a TFIIH. A su vez, otros mecanismos alternativos postulan que la RNAPII frenada en una lesión señala *in trans* la degradación de la RNAPII pausada en la región proximal al promotor. A su vez, en apoyo a este último modelo, ha sido demostrado que, en condiciones sin UV, la RNAPII es degradada en el promotor de manera dependiente de CRL3^{ARMCS}, como parte de un mecanismo de regulación del inicio de la transcripción.

Notablemente, la mayoría de los mecanismos de degradación reportados comparten un paso en común, y es la degradación específica de una RPB1 fosforilada en Serina 5. Como ya fuera discutido en secciones anteriores, la marca en Serina 5 está enriquecida en moléculas de RNAPII detenidas en el promotor, así como frenadas en una lesión, por lo que estos resultados no resultan sorprendentes y apoyan un modelo en el cual la fosforilación en Serina 5 implica una RNAPII “inestable” fácil de remover de la cromatina, mientras que una RNAPII fosforilada en Serina 2 representa una RNAPII en activa elongación cuya remoción de la cromatina resulta más difícil. Así, la mayoría de los modelos propuestos implican la degradación de RNAPII fosforiladas y unidas a la cromatina, implicando una relación directa entre una RNAPII transcripcionalmente activa y la degradación de RPB1. De esta manera, surge la pregunta respecto a cuál es la relación funcional entre la degradación de RPB1 y la respuesta transcripcional al UV.

Respuesta transcripcional al daño al ADN inducido por luz UV

En respuesta a la irradiación con luz UV, las células sufren una compleja respuesta transcripcional que implica una inhibición inicial rápida de la transcripción, seguida de una recuperación transcripcional después de 12-24 horas (Figura I17) (Mayne and Lehmann, 1982; Rockx et al., 2000). La inhibición inicial de la transcripción implica dos fases consecutivas. Inmediatamente después de la irradiación con UV, las células sufren una detención de la elongación debido al bloqueo físico que el daño en el ADN impone a la transcripción. Sin embargo, se sabe hace más de 20 años que el frenado de la RNAPII en el daño no puede explicar por sí solo la inhibición de la transcripción, ya que se demostró que extractos de células irradiadas con UV pueden inhibir eficientemente la transcripción de ADN no dañado (Rockx et al., 2000). Por lo tanto, inmediatamente después de la irradiación con UV las células sufren una detención de la elongación, que es precedida por la inhibición global de la iniciación de la transcripción, que necesariamente debe ocurrir *in trans* a la lesión (Andrade-Lima et al., 2015; Epanchintsev et al., 2017; Rockx et al., 2000; Williamson et al., 2017). Resultados recientes apoyan este modelo, dado que 45 minutos después de UV, la transcripción se restringe a los primeros 20 kb de los genes, mientras que, 3 horas después, se observa una disminución total de la RNAPII en la cromatina (Tufegdžić Vidaković et al., 2020). Sin embargo, un subconjunto de genes escapa de la detención inicial de la transcripción y se sobre-expresa fuertemente de forma transitoria en respuesta a UV (McKay et al., 2004). Teniendo en cuenta que inmediatamente después de la irradiación UV los complejos de RNAPII en activa elongación se encuentran con lesiones en el ADN con una probabilidad que depende de la longitud del gen, los genes cortos tienen menos probabilidades de dañarse y, por lo tanto, pueden escapar de la detención inmediata de la elongación transcripcional. Estos genes son particularmente cortos y muchos de ellos han sido anotados como *Immediate Early Genes* (IEGs) (McKay et al., 2004; Tufegdžić Vidaković et al., 2020). No obstante, la transcripción de estos genes debe detenerse de nuevo tras la respuesta inicial, para evitar los efectos no deseados de su expresión persistente. En este sentido, la inhibición de la degradación de RPB1 en mutantes K1268R previno el apagado de genes cortos en comparación con su contraparte WT, indicando por primera vez un rol directo de los niveles de RNAPII en la determinación de la expresión génica, donde más RNAPII se asocia simplemente con una mayor expresión génica (Tufegdžić Vidaković et al., 2020). Además, la ubiquitinación de RPB1 es alta durante la detención transcripcional y vuelve a niveles normales en la fase de recuperación tras la irradiación con UV (Nakazawa et al., 2020; Tufegdžić Vidaković et al., 2020). En consecuencia, los niveles de RNAPII emergen como un fuerte candidato para regular la inhibición transcripcional tras la irradiación con UV, específicamente en la segunda etapa de la detención transcripcional, la inhibición *in trans* del inicio de la transcripción. Aunque se desconoce el mecanismo particular que regula este proceso, estos resultados apoyan el modelo de degradación

de RPB1 en la región proximal a los promotores, remarcando su rol como centro regulador de la transcripción en respuesta al UV.

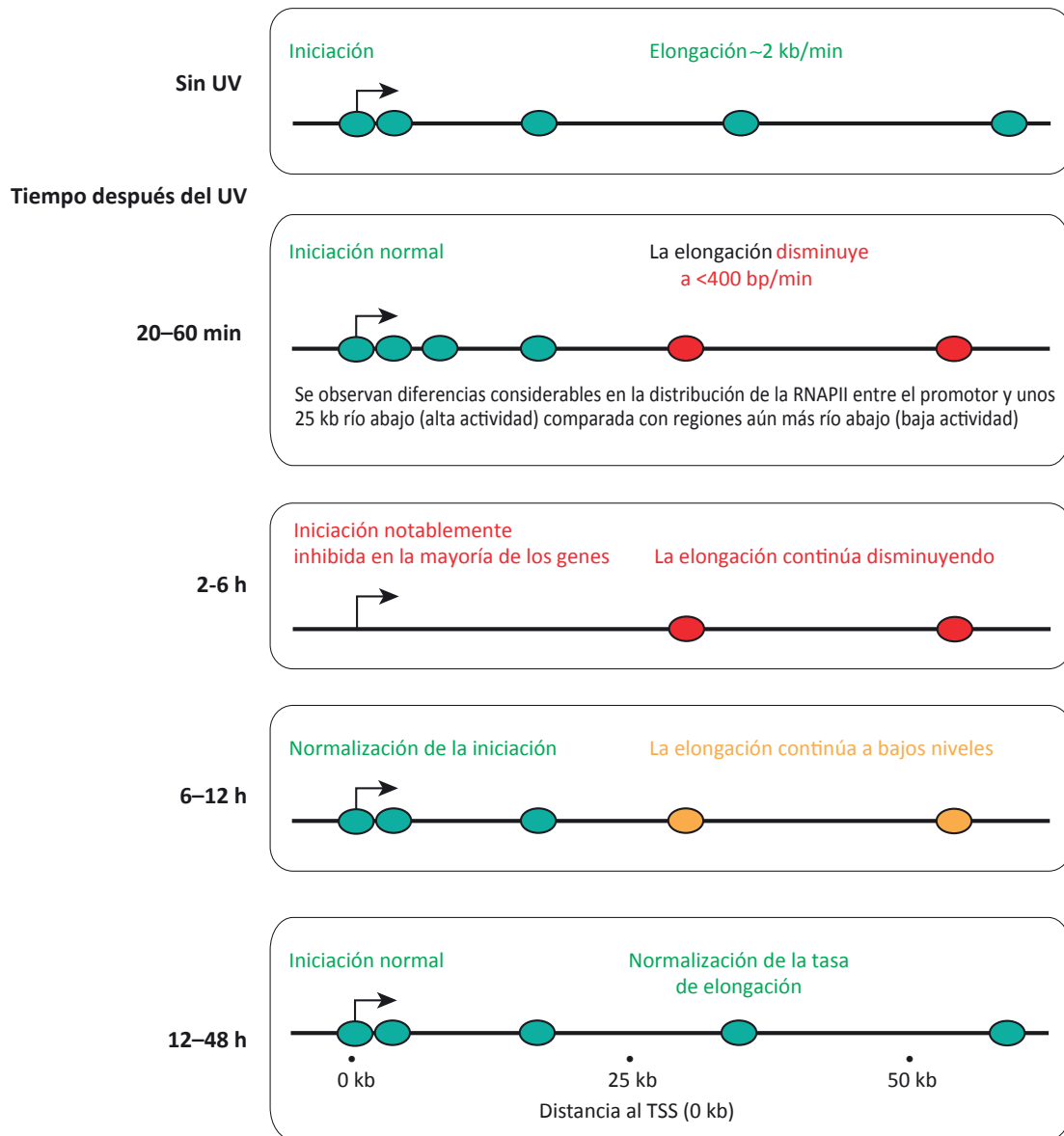


Figura I17: La inhibición de la transcripción en respuesta al UV ocurre secuencialmente. El daño en el ADN bloquea físicamente la elongación transcripcional en la primera hora luego del UV y, aproximadamente 3 horas más tarde, la iniciación transcripcional también se inhibe. La iniciación transcripcional se recupera más rápido que la elongación, la cual sigue siendo lenta durante muchas horas y regula la expresión de genes involucrados en el reinicio de la transcripción. Notablemente, la transcripción parece estar “restringida espacialmente” durante largos periodos, de modo que las primeras 20–25 kb a partir del promotor muestran mucha más actividad que las regiones más alejadas dentro de los genes río abajo del daño al ADN, lo cual explica el hecho de que prácticamente todos los genes inducidos por el daño en el ADN sean cortos. Adaptado de (Gregersen and Svejstrup, 2018)

Sin embargo, otros mecanismos implicados en la regulación de la respuesta transcripcional a la irradiación con UV han sido postulados. Uno de los genes cortos sobre-expresados después de la irradiación con UV es ATF3, un factor de transcripción negativo que se une a la región promotora de miles de genes e inhibe su transcripción, favoreciendo la inhibición transcripcional inducida por UV (Epanchintsev et al., 2017; Kristensen et al., 2013). Sin embargo, tras la inhibición transcripcional, las células deben recuperar la transcripción lentamente, unas 12 a 24 horas después de la irradiación, y se ha demostrado que ATF3 se degrada de manera específica para favorecer este proceso (Epanchintsev et al., 2017). Por lo tanto, se ha propuesto que ATF3 es un regulador importante de la respuesta transcripcional a la irradiación con UV, ya que alcanza su pico durante la detención transcripcional, pero se degrada más tarde en la fase de recuperación (Bouvier et al., 2021; Epanchintsev et al., 2017). Estos resultados apoyan un modelo en el cual la degradación de RNAPII es el determinante principal de la inhibición transcripcional poco después de la irradiación con UV, mientras que otros factores, como ATF3, podrían participar más adelante durante la recuperación de la transcripción cuando los niveles de RNAPII vuelven a la normalidad.

Además de mediar la ubiquitinación de la RNAPII en el sistema TC-NER, CSB y CSA tienen un rol fundamental durante la recuperación de la transcripción 12 a 24 horas después de la irradiación con UV (Mayne and Lehmann, 1982; Proietti-De-Santis et al., 2006), cuando las lesiones en la hebra molde han sido reparadas por TC-NER (Hu et al., 2015). La degradación de ATF3 depende de la chaperona de histonas HIRA (Bouvier et al., 2021), así como de CSB y CSA, ya que se ha demostrado que las células deficientes en CSA o CSB no pueden degradar ATF3 y, en consecuencia, la transcripción tras la irradiación con UV permanece bloqueada (Epanchintsev et al., 2017; Kristensen et al., 2013). En este sentido, ha sido demostrado que CSB facilita la asociación del complejo PAF1 (PAF1C) con la RNAPII pausada en el promotor, promoviendo la transición a elongación (Chen et al., 2017; F. X. Chen et al., 2015) y facilitando así la recuperación de la transcripción a sus niveles normales, varias horas más tarde de la irradiación con UV. De esta manera, PAF1C participa en la recuperación de la transcripción, ya que se une a la región proximal al promotor de miles de genes a los cuales también se une ATF3 y CSB (van den Heuvel et al., 2021a). Por lo tanto, CSB cumple un rol crucial dado que induce la ubiquitinación mediada por CSA de ATF3 y su degradación en el proteasoma, y al mismo recluta a PAF1C a los promotores, desempeñando así un papel crucial en la estimulación de la recuperación transcripcional tras la irradiación con UV (Figura I18).

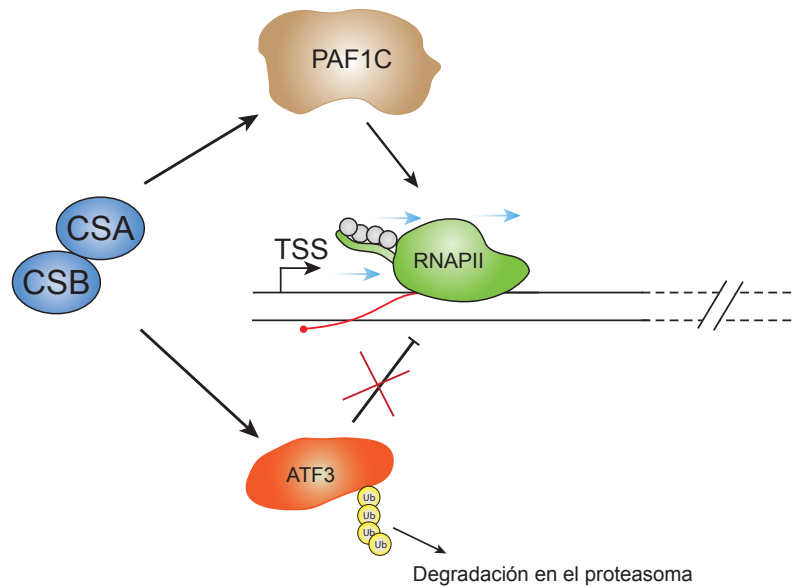


Figura I18: Rol de CSB y CSA en la recuperación transcripcional luego del UV. Además de cumplir un rol central en la reparación por TC-NER y la ubiquitinación de la RNAPII, CSB y CSA promueven la recuperación de la transcripción 12 a 24 horas luego de la irradiación con UV. Por un lado, CSB facilita la actividad E3 Ubiquitina ligase de CSA, induciendo la ubiquitinación y degradación de ATF3, el cual es un regulador negativo de la transcripción. Por otro lado, CSB promueve el reclutamiento de PAF1C, que estimula la transición a elongación de RNAPIIs pausadas en la región proximal al promotor, estimulando de este modo el reinicio de la transcripción.

En paralelo a la drástica inhibición transcripcional, inmediatamente después de la irradiación con UV las células exhiben una desaceleración de sus tasas de elongación, lo que se ha demostrado que modula globalmente el procesamiento co-transcripcional de los ARNm (Muñoz et al., 2009). La disminución de la tasa de elongación persiste por más tiempo que la detención transcripcional, ya que se ha demostrado que la transcripción se recupera más rápido que las tasas de elongación (Andrade-Lima et al., 2015; Williamson et al., 2017) y, a su vez la desaceleración de las tasas de elongación favorece el uso de *Alternative Last Exons (ALEs)*, induciendo así la expresión de isoformas cortas de *splicing* (Williamson et al., 2017). Un ejemplo es *ASCC3*, un gen cuyo *splicing* alternativo se modula en respuesta a la irradiación con UV, cambiando de un ARNm largo que codifica para la proteína *ASCC3*, a una ARNnc corto (ALE). Mientras que se ha propuesto que la proteína codificada por la isoforma larga participa en el mantenimiento de la detención transcripcional en respuesta a la irradiación con UV, la isoforma corta no codificante presenta funciones necesarias para la recuperación transcripcional (Williamson et al., 2017). En consecuencia, la desaceleración global de las tasas de elongación resulta fisiológicamente relevante para la regulación de la respuesta transcripcional al daño en el ADN inducido por UV.

Capítulo 3: La Respuesta al Daño al ADN (DDR) y el rol de la quinasa ATR

Los efectores centrales de la DDR

Como se describió en el capítulo anterior, el ADN está constantemente expuesto a diversos agentes genotóxicos y las células cuentan con variados mecanismos de reparación. En conjunto, estos mecanismos conforman la llamada “respuesta al daño en el ADN” (DNA Damage Response, DDR), que funciona de manera concertada gracias a la acción de diversas quinasas, siendo ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (ATM and Rad3-related), DNA-PK (DNA Protein Kinase) algunas de las más estudiadas. Estas quinasas integran la información sobre el estado celular y coordinan una respuesta concertada que promueve la reparación del daño, el arresto del ciclo celular y la supervivencia (Blackford and Jackson, 2017).

ATR, ATM y DNA-PK pertenecen a la familia de quinasas *class-IV phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinase* (PIKK) (Awasthi et al., 2016). La particularidad de esta familia de quinasas es que poseen un origen evolutivo como quinasas de lípidos, pero divergieron como quinasas de proteínas, y fosforilan residuos Serina o Treonina seguidos por Glutamina (SQ/TQ) (Bakkenist and Kastan, 2004). A su vez, las quinasas de la familia PIKK presentan una gran homología estructural, sobre todo en sus dominios con actividad catalítica, por lo que no resulta sorprendente que exista una activación cruzada de los efectores río abajo de las quinasas de la DDR (Awasthi et al., 2016). De particular interés para esta tesis, la activación de ATM y ATR promueve la fosforilación de diversas proteínas encargadas de activar *checkpoints* del ciclo celular, induciendo el arresto del ciclo y la reparación del daño (Figura I19). ATM se activa principalmente en respuesta a DSBs (Paull, 2015) y gatilla la reparación por NHEJ y HR, mientras que ATR protege la integridad del genoma durante la replicación previniendo el colapso de horquillas de replicación arrestadas (Branzei and Foiani, 2008). Además, ATR puede activarse en respuesta a DSBs, pero a través de un mecanismo que depende de ATM (Doksani et al., 2009). Por su parte, DNA-PK también se activa en respuesta a DSBs y, junto con los efectores Ku70 y Ku80, promueve la reparación por NHEJ.

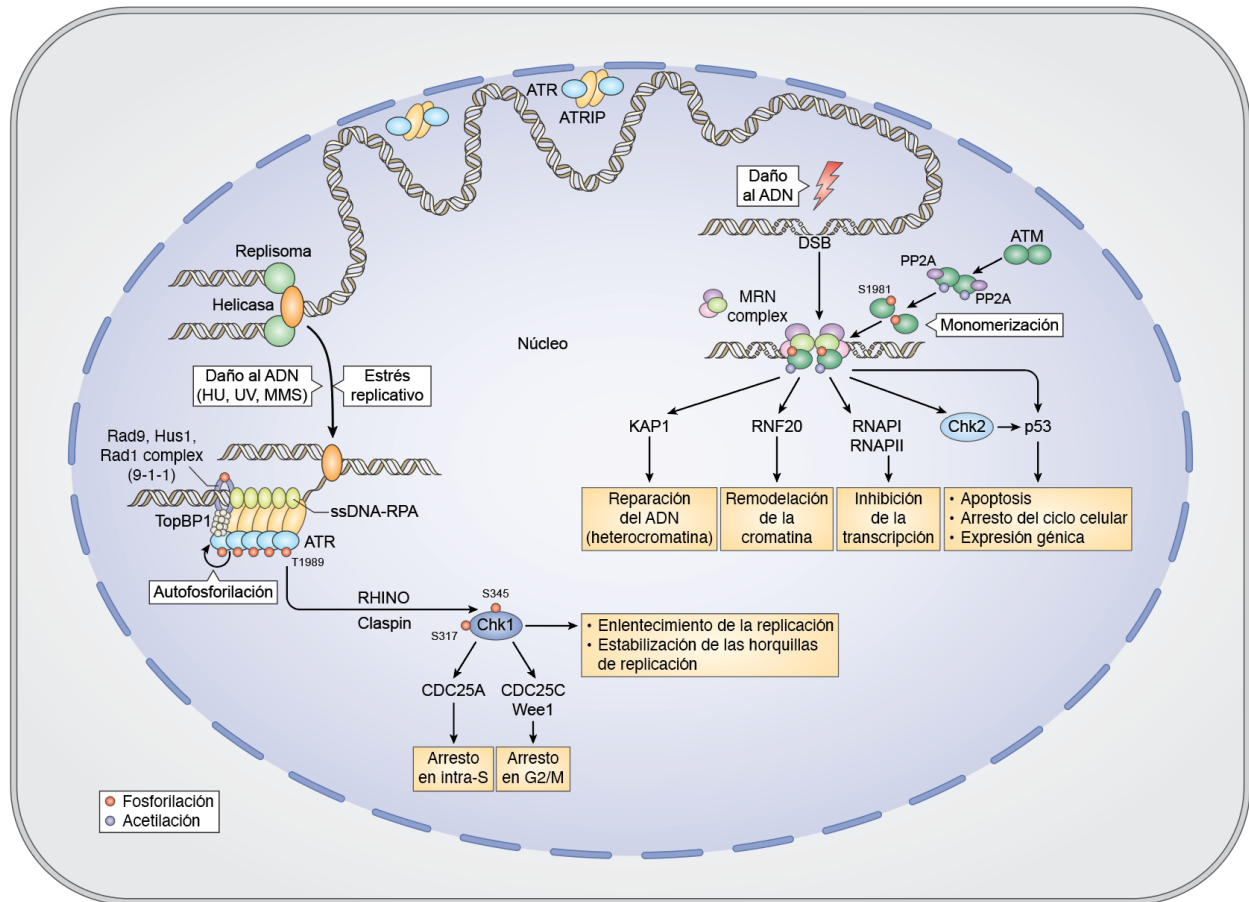


Figura I19: Mecanismos de activación de ATR y ATM y su rol en la coordinación de la DDR. (Izquierda) En respuesta al daño al ADN, el desacoplamiento en el replisoma entre la helicasa y las ADN polimerasas genera el arresto de la horquilla de replicación y la concomitante exposición de ssDNA, que es recubierto por la proteína RPA. ATR y ATRIP son reclutados al complejo ssDNA-RPA y, gracias a la acción concertada del complejo Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) y TOPBP1, ATR se activa. Esto lleva a su autofosforilación en el residuo T1989, así como la fosforilación de diversos factores río abajo, siendo las fosforilaciones de CHK1 en el residuo S317 y S345 los más estudiados. La activación de ATR y CHK1 induce la estabilización de las horquillas de replicación arrestadas, la inhibición del disparo de orígenes de replicación inactivos, el arresto del ciclo celular y la reparación del daño (no mostrado). (Derecha) En respuesta a la formación de DSB, el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) es reclutado a los extremos del ADN. Esto induce la monomerización de ATM, que se autofosforila en el residuo S1981 y se activa, en un proceso que además depende de la fosfatasa PP2A y diversas acetilaciones. La activación de ATM fosforila diversos factores, siendo CHK2 y p53 los más estudiados. Esto induce el arresto del ciclo celular, la remodelación de la cromatina, la reparación del daño por HR o NHEJ (no mostrado) y la regulación de la respuesta transcripcional. Adaptado gentilmente por la Dra. Luciana Giono a partir de (Awasthi et al., 2016).

ATM

En ausencia de daño agudo, ATM se encuentra inactiva formando un homodímero (Bakkenist and Kastan, 2003). En respuesta a la inducción de DSB, el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) se une a los extremos romos del ADN, lo que favorece el reclutamiento de ATM y su autofosforilación en el residuo Serina 1981 (Lee and Paull, 2005). En consecuencia, el homodímero se disocia y ATM fosforilada y monomérica es capaz de fosforilar diversos factores, siendo CHK2, p53 y H2AX los más estudiados. De esta manera, ATM “marca” la región circundante al DSBs, facilitando el reclutamiento de factores necesarios para la reparación por recombinación homóloga (HR) o no homóloga (NHEJ). La decisión de reparar por HR o NHEJ depende de varios factores, incluido el estadio del ciclo celular, dado que la reparación por HR requiere una cromátide hermana, que se encuentra disponible durante la fase S (dependiendo del avance de la replicación), la fase G2, y la fase M del ciclo celular. Por su parte, la reparación por NHEJ está disponible en cualquier fase del ciclo. Otro aspecto clave es un proceso conocido como *DNA end resection*, en el que el complejo MRN cumple un rol fundamental. Un requisito necesario para la reparación por HR es la presencia de *overhangs* 3' de ssDNA. Dado que los extremos en un DSB son romos, las actividades endonucleasa y exonucleasa del complejo MRN llevan a cabo el *DNA end resection* y promueven la formación de ssDNA a partir del DSB, favoreciendo el reclutamiento del factor RAD51, que asiste en la invasión de la cromátide hermana y la reparación por HR. Si el proceso de *DNA end resection* se ve impedido, la reparación ocurre principalmente por NHEJ (Qiu and Huang, 2021).

La activación de ATM en respuesta a DSBs no solo cumple un papel esencial en la señalización y reparación del daño, sino que también tiene un rol central en el control de la expresión génica. ATM fosforila y estabiliza el factor de transcripción p53, induciendo la expresión de genes asociados al arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis (Matsuoka et al., 2007, 1998). Además, la activación de ATM induce la remodelación de la cromatina y genera la formación de híbridos ADN:ARN (*R-loops*) lo cual, presumiblemente, facilita el reconocimiento del daño (Shiloh and Ziv, 2013). Finalmente, ha sido propuesto que en respuesta al UV, y no a la inducción de DSB, ATM es activada por un mecanismo no-canónico, afectando el *spliceosoma* y, por lo tanto, los patrones de *splicing* y *splicing* alternativo (Tresini et al., 2015).

En conjunto, estos mecanismos demuestran que ATM no solo actúa como un sensor del daño en el ADN, sino que también desempeña un papel activo en la regulación de la expresión génica mediante la modulación del procesamiento del ARN, el control de la dinámica transcripcional y la activación de vías dependientes de p53 que contribuyen a preservar la estabilidad genómica y la homeostasis celular.

ATR

A diferencia de ATM, ATR se activa en respuesta a un rango más amplio de lesiones en el ADN, dado que su activación depende de la exposición de regiones de ssDNA. En particular, la presencia de lesiones en el ADN que impiden el avance normal de ADN Polimerasas replicativas generan el arresto de las horquillas de replicación, con la concomitante exposición de grandes regiones de ssDNA. Estas regiones de ssDNA son recubiertas por la proteína RPA, que estabiliza las hebras expuestas y funciona como una plataforma para el reclutamiento de ATR a través de su subunidad ATRIP (Zou and Elledge, 2003). Sin embargo, el reclutamiento de ATR por sí solo no es suficiente para su activación completa, ya que este proceso requiere además de proteínas co-activadoras como TOPBP1. En este sentido, el complejo heterotrimérico RAD9-RAD1-HUS1 (911), reconoce específicamente el extremo 5' de las juntas entre ssDNA y dsDNA, y facilita la interacción entre TOPBP1 y ATR, estimulando su activación (Delacroix et al., 2007).

Una vez activado, ATR se autofosforila en el residuo Treonina 1989 (Nam et al., 2011) y fosforila diversos efectores río abajo, siendo CHK1 el más estudiado. La fosforilación de CHK1 promueve la inactivación de la fosfatasa CDC25, cuya principal función es estimular la actividad de complejos Ciclina-CDK. Al inactivar CDC25, se impide la activación de estos complejos y se bloquea la progresión desde la fase S hacia la fase G2/M del ciclo celular (Cimprich and Cortez, 2008). Este arresto transitorio del ciclo celular le otorga a la célula el tiempo necesario para promover la reparación del daño, dado que, si las horquillas de replicación no son estabilizadas y el daño reparado, aumenta la probabilidad de que se formen DSB y la situación sea aún más grave (Williams and Zhang, 2021). Por otra parte, la activación de orígenes de replicación a lo largo del genoma está estrictamente regulada y ocurre de manera ordenada en el tiempo y el espacio. Así, la activación de ATR y CHK1 inhibe el disparo de orígenes de replicación gracias a la inactivación de factores necesarios para la replicación, como el complejo Ciclina A-CDK1 y CDC45. En particular, CDC45 forma parte de la helicasa CMG (CDC45-MCM-GINS), que estimula la apertura de la doble hebra del ADN y el inicio de la síntesis de ADN en la horquilla de replicación. Al regular negativamente la actividad de estos factores, ATR y CHK1 limitan la densidad de horquillas de replicación activas en el genoma dañado (Saldivar et al., 2017).

Además de inducir el arresto del ciclo celular y prevenir el disparo de nuevos orígenes de replicación, la activación de ATR cumple un rol fundamental en la estabilización de horquillas de replicación arrestadas. En la horquilla de replicación, una helicasa desnaturaliza el ADN mientras ADN Polimerasas sintetizan nuevas hebras complementarias. En presencia de una lesión en el ADN, la helicasa no reconoce el daño y continúa la

desnaturalización del ADN, mientras que, por el contrario, las ADN Polimerasas no son capaces de sortear el daño, lo que favorece el desacoplamiento entre la helicasa y las ADN Polimerasas. Esta situación aumenta la cantidad de ssDNA expuesto, favoreciendo el arresto de la horquilla de replicación. Dado que esta situación puede llevar a la formación de DSBs, ATR cumple un rol fundamental al reclutar diversos factores que previenen el colapso de la horquilla arrestada. Uno de los mecanismos más conocidos que estabilizan la horquilla de replicación arrestada es el *Fork reversal* o regresión de la horquilla, en el que las hebras de ADN recién sintetizadas se aparean entre sí, disminuyendo la exposición de ssDNA y la posibilidad de generar DSBs. De esta manera, ATR regula la actividad de diversos factores, como la translocasa de ADN SMARCAL1 y helicasas como BLM, que participan en el equilibrio necesario entre la regresión de la horquilla y su resolución, estabilizando la horquilla arrestada y permitiendo reanudar la replicación una vez que el daño es reparado (Saldivar et al., 2017).

Además de prevenir el colapso de la horquilla de replicación, ATR estimula la reparación del daño al ADN. Por un lado, la regresión de la horquilla de replicación arrestada estimula el reclutamiento de factores de HR, como RAD51. Además, ATR también estimula la reparación por el sistema NER. La proteína RPA que recubre el ssDNA expuesto en horquillas de replicación arrestada, también se une al ssDNA expuesto como intermediario del proceso de reparación por el sistema NER y estimula la activación de ATR en células arrestadas en G1 (Hanasoge and Ljungman, 2007; Kemp, 2017; Matsumoto et al., 2007, 2007; Ray et al., 2016). A su vez, en respuesta al UV, ATR fosforila al factor XPA y previene su degradación en el proteasoma (Lee et al., 2014). Si bien se creyó durante muchos años que XPA era de localización exclusivamente nuclear (Musich et al., 2017), ha sido demostrado que XPA puede encontrarse en el citoplasma, y en respuesta a la irradiación con UV, ATR también promueve la traslocación nuclear de XPA, estimulando la reparación por el sistema NER (Wu et al., 2007). De esta manera, resulta evidente que ATR es un factor clave en la DDR, dado que reconoce el daño, señala su presencia y promueve la reparación.

Además de estabilizar las horquillas de replicación arrestadas, ATR estimula su reinicio a través de diversos mecanismos que pueden implicar el *repriming* mediado por PrimPol (una primasa y ADN polimerasa), el *bypass* de la lesión a través de TLS, el *template-switching*, o la Recombinación Homóloga. Si la horquilla colapsa y se generan DSB, los mecanismos de Recombinación Homóloga pueden a su vez facilitar el reinicio de la replicación. Aunque no está claro el rol de ATR en la regulación específica de PrimPol, se ha demostrado que ATR fosforila a las polimerasas de translesión REV1 y Pol η , lo que sugiere que promueve el *bypass* de la lesión. Si bien la estimulación del *fork reversal* y la regulación de la remodelación de la cromatina aún son objeto de estudio, existe un consenso sobre el rol anti-apoptótico de ATR dado que previene el colapso de las horquillas de

replicación arrestadas durante la fase S y de esta manera disminuye la inestabilidad genómica asociada al estrés replicativo (Saldivar et al., 2017).

Además de su rol anti-apoptótico durante la fase S del ciclo celular, roles no canónicos de ATR fuera del núcleo celular apoyan este rol anti-apoptótico. Diversos estudios realizados en los últimos años demostraron que ATR puede localizarse en la mitocondria, donde su conformación estructural influye en la decisión entre supervivencia o apoptosis. Gracias a la presencia de la Prolina 429 en su secuencia primaria, ATR puede encontrarse en una conformación *cis* o *trans* (Benjamin A. Hilton et al., 2015). En respuesta al UV, ATR se estabiliza en su conformación *cis*, en la cual se expone un dominio BH3 en su región N-terminal, capaz de interactuar con tBid en la mitocondria. Esta interacción previene que tBid active la oligomerización de Bax-Bak, necesaria para la formación de poros en la membrana externa mitocondrial, la consecuente liberación del citocromo C al citoplasma y la formación del apoptosoma, eventos necesarios para la activación de caspasas efectoras de la apoptosis (Makinwa et al., 2020). De esta manera, sumado a su función nuclear, ATR cumple un rol fundamental en la regulación del destino celular en la mitocondria, previniendo la activación de la apoptosis y favoreciendo la reparación del daño (Biswas et al., 2022).

Rol de ATR en la regulación transcripcional y la apoptosis

En función de los resultados revisados en este capítulo, resulta claro que ATR tiene un marcado rol anti-apoptótico en células en activa división. En consecuencia, la inhibición de ATR en células en fase S favorece la muerte celular debido al colapso de las horquillas de replicación. Sin embargo, el laboratorio del Dr. Aziz Sancar demostró que la inhibición de ATR en células arrestadas en G1 induce, por mecanismos desconocidos, el efecto opuesto en cuanto a la supervivencia celular (Kemp and Sancar, 2016). De esta manera, el rol de ATR resulta paradójico: En células en fase S tiene un rol anti-apoptótico, mientras que en células arrestadas en G1 posee un rol pro-apoptótico. Así, las funciones de ATR no se encuentran limitadas a la fase S, dado que ATR puede activarse durante todo el ciclo celular mediante el ssDNA expuesto durante la reparación del daño por el sistema NER (Kemp, 2017; Vrouwe et al., 2011). En este sentido, resultados publicados por nuestro grupo de investigación demostraron que la activación de ATR por el sistema NER controla el estado de fosforilación de la RNAPII y modula la expresión génica (Muñoz et al., 2017). A su vez, ha sido ampliamente demostrado que la expresión génica en respuesta al daño al ADN es pro-apoptótica (Muñoz et al., 2017, 2009). De esta manera, es presumible que ATR favorezca la muerte celular en células arrestadas en G1 a través del control de la actividad de la RNAPII y, por lo tanto, de manera independiente de la replicación (Figura I20). En esta tesis de doctorado, abordaremos

los mecanismos a través de los cuales ATR modula la actividad de la RNAPII en células arrestadas en G1, regulando de esa manera la respuesta transcripcional a la irradiación UV.

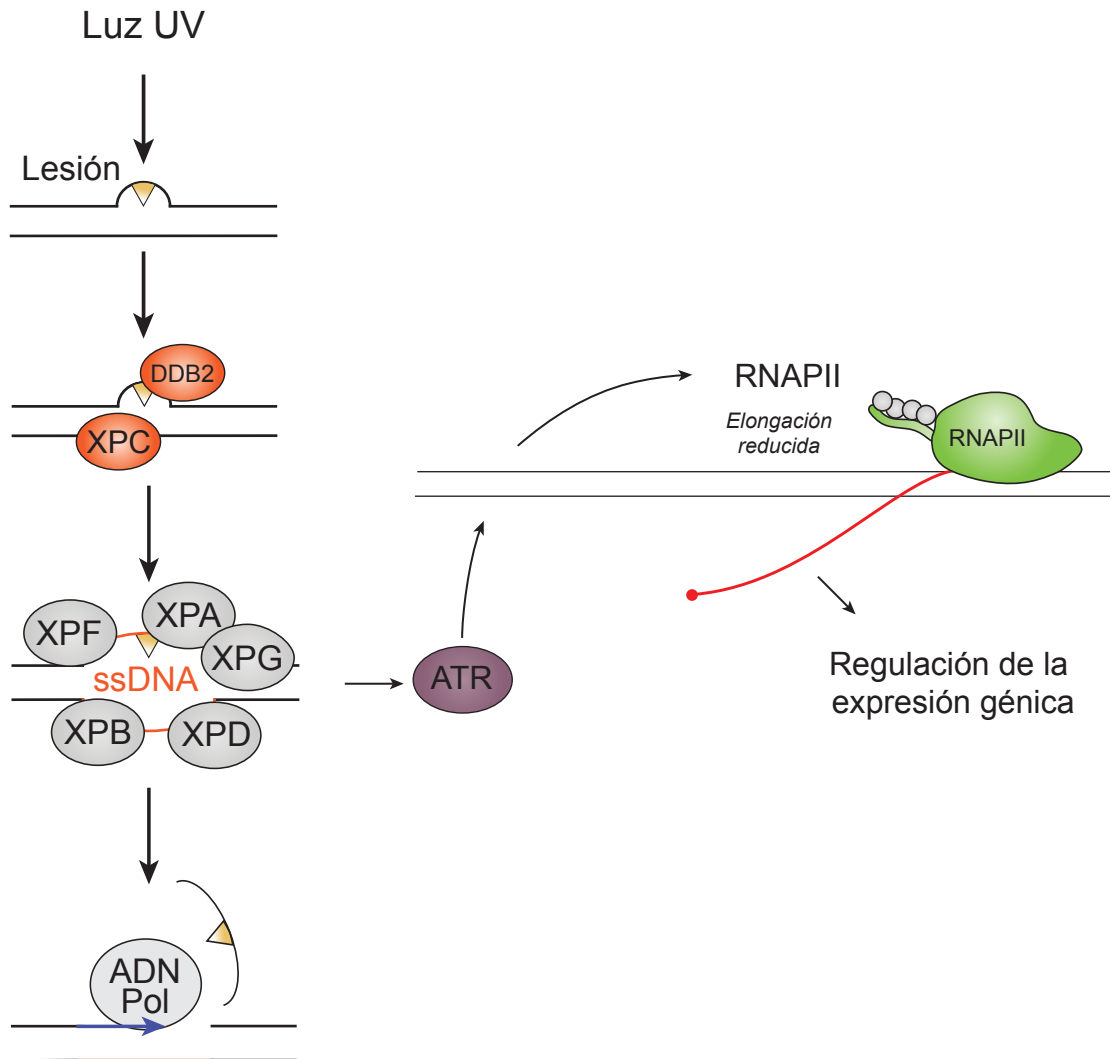


Figura I20: Activación de ATR a través del sistema NER y su rol en la regulación de la expresión génica. En respuesta al daño al ADN, la reparación a través del sistema NER expone ssDNA capaz de activar a ATR. A su vez, la activación de ATR regula el estado de fosforilación del CTD de la RNAPII y de esta manera modula la respuesta transcripcional, induciendo una disminución en la tasa de elongación de la RNAPII y en consecuencia la expresión de isoformas de splicing pro-apoptóticas. Se desconoce el mecanismo a través del cual ATR modula la actividad de la RNAPII. Adaptado de (Cambindo Botto et al., 2018).

Objetivos

Objetivo general:

Comprender los mecanismos subyacentes y las implicancias fisiológicas de la respuesta transcripcional ante el daño al ADN inducido por luz ultravioleta.

Objetivos específicos:

1. Describir los mecanismos que controlan los niveles de RPB1 en respuesta al daño al ADN y su impacto en la represión global de la transcripción.

- a. Estudiar el rol de TC-NER en la degradación de RPB1 a tiempos cortos post-UV.
- b. Estudiar el rol de GG-NER en la degradación de RPB1 a tiempos largos post-UV.
- c. Caracterizar la degradación de RPB1 estimulada de manera independiente de la transcripción.
- d. Describir el rol de complejos E3 ligasa en la degradación de RPB1.
- e. Investigar el impacto fisiológico de la degradación de RPB1 en la respuesta transcripcional al UV.

2. Investigar el rol de la quinasa ATR en la regulación de la actividad de la RNAPII y su rol en la inducción de patrones de expresión génica específicos de respuesta al daño.

- a. Identificar factores fosforilados por ATR en células arrestadas en G1 a través de una estrategia experimental de proteómica cuantitativa: *SILAC-Proteomics*
- b. Identificar factores fosforilados por ATR en células arrestadas en G1 a través de una estrategia experimental de proteómica cualitativa: *Shotgun-Proteomics*
- c. Evaluar el rol del sistema NER en la activación de ATR en células arrestadas en G1.
- d. Caracterizar el rol de ATR en la regulación de la expresión génica a través del análisis por RT-qPCR y ensayos de secuenciación.

Resultados

Sección 1: Rol del sistema NER en la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN

Debido a la gran cantidad de factores que intervienen en el reconocimiento y la reparación del daño en el ADN por el sistema NER, recomendamos al lector que tenga a mano la representación esquemática de este mecanismo para facilitar la comprensión de esta sección de resultados (Figura I14).

La luz UV constituye uno de los principales agentes genotóxicos a los que se enfrentan los seres vivos de forma cotidiana. La irradiación de ADN con luz UV genera lesiones, como los CPDs y los 6-4PPs, que amenazan la integridad del genoma y comprometen procesos como la transcripción y la replicación. Para contrarrestar el daño en el ADN inducido por luz UV, los seres humanos contamos con el sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER), que remueve de manera eficiente las lesiones. Más allá de su rol en la reparación del genoma, el sistema NER también participa en el control de la maquinaria transcripcional a través de la degradación de RPB1, la subunidad mayor y catalítica de RNAPII. Si bien el “modelo del último recurso” postula que sólo los complejos de RNAPII estancados en una lesión son marcados para su degradación, en esta sección estudiamos distintos mecanismos que modulan la degradación global de RPB1, expandiendo a su vez el rol del sistema NER en la regulación transcripcional ante el daño en el ADN inducido por la luz UV.

Establecimiento del modelo de estudio

La piel humana es la primera barrera entre el interior y el exterior de nuestro cuerpo, y por lo tanto está constantemente expuesta al UV. En particular, la epidermis es la capa externa y se compone de varias capas estratificadas de queratinocitos, incluida una capa basal replicativa y varias capas suprabasales no replicativas, por lo que los queratinocitos representan el tipo celular más común de la piel. En consecuencia, decidimos utilizar una línea celular inmortalizada derivada de queratinocitos humanos, denominada HaCaT (Boukamp et al., 1988), para comprender el rol del sistema NER en la degradación de RPB1.

El sistema NER se encarga de reparar el daño en el ADN durante todo el ciclo celular. Sin embargo, durante la fase S, el daño en el ADN genera conflictos entre ADN Polimerasas y ARN Polimerasas, lo que dificulta el estudio específico del sistema NER (Hamperl et al., 2017; Helmrich et al., 2013; Lalonde et al., 2021; Lloyd et al., 2021).

Por lo tanto, nuestro objetivo inicial fue generar una condición experimental que minimizara la activación de vías asociadas al estrés replicativo y nos permitiera analizar de manera específica el rol del sistema NER en la degradación de RPB1 ante la irradiación con UV. Para ello, decidimos valernos de protocolos publicados que indican que las células HaCaT se arrestan en la fase G1 del ciclo celular cuando se encuentran a alta confluencia y son crecidas en condiciones de bajo Suero Fetal Bovino (FBS), que se utiliza para su mantenimiento en cultivo (Kemp and Sancar, 2016). De esta manera, se plaquearon células a un 100% de confluencia y se cultivaron en FBS 0,5 % durante 48 horas. Luego, las células fueron cosechadas y teñidas con yoduro de propidio (PI) para el análisis por citometría de flujo de la cantidad de ADN. En la Figura R1, se observa que las células privadas de FBS exhiben un pronunciado arresto del ciclo celular en G1, en concordancia con los protocolos publicados. Por una cuestión de practicidad, en esta tesis nos referiremos a esta condición experimental como “células privadas de FBS”, si bien 0,5% FBS no implica una privación total del FBS.

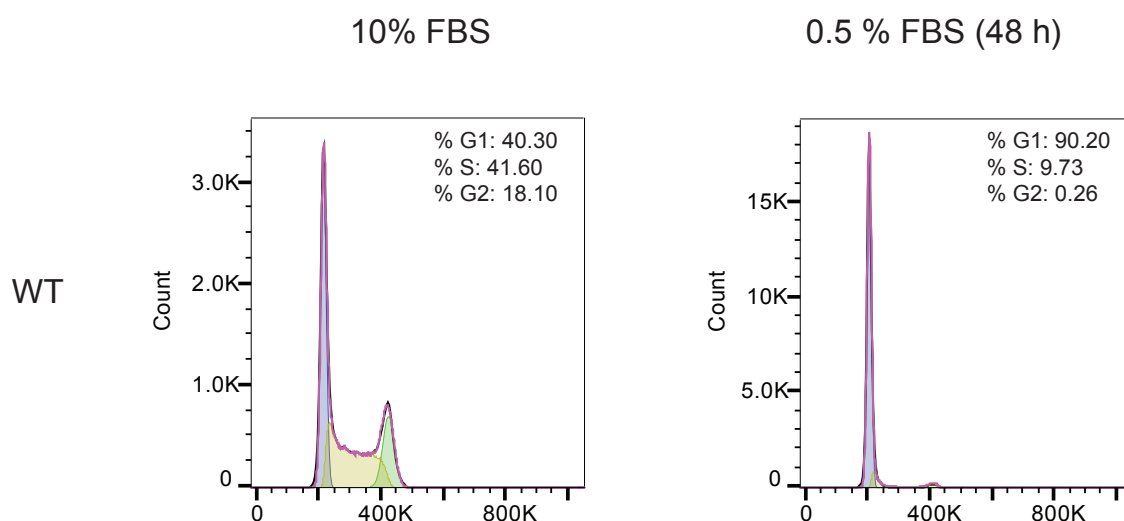


Figura R1. Células HaCaT WT se arrestan en la fase G1 del ciclo celular cuando son privadas de FBS: Células HaCaT WT fueron incubadas en condiciones normales (10% FBS) o plaqueadas el 100% de confluencia y privadas de Suero Fetal Bovino (0,5% FBS) durante 48 horas. Las células fueron cosechadas, fijadas y teñidas con yoduro de propidio (PI) para el análisis por citometría de flujo del contenido de ADN. Se muestran los histogramas del ciclo celular y el porcentaje de células en cada fase del ciclo. El experimento se repitió dos veces, y se muestra un experimento representativo. Células HaCaT se arrestan en G1 cuando son cultivadas a alta confluencia y privadas de FBS durante 48 h.

A continuación, decidimos comprobar que células HaCaT arrestadas en G1 conservan la respuesta esperada al UV en términos de degradación y fosforilación de RPB1. Tal como se describió en la introducción de esta tesis, complejos de RNAPII transcripcionalmente activos que se encuentran con una lesión en el ADN constituyen el primer paso en el reconocimiento del daño por el sistema TC-NER, lo cual gatilla la reparación de las lesiones y

la degradación de RPB1 en el proteasoma. De esta manera, pre-incubamos células arrestadas en G1 con el inhibidor del proteasoma MG-132 durante 1 hora, irradiamos con distintas dosis de UV y cosechamos 3 horas más tarde en buffer Laemmli 2X. El análisis de los niveles de RPB1 en respuesta al UV se realizó por western blot (WB) utilizando anticuerpos específicos que reconocen el extremo N-terminal. En la Figura R2 se observan los dos efectos esperados al realizar un WB contra RPB1 en células irradiadas con UV. Por un lado, un aumento de la banda que corresponde a la isoforma fosforilada de RPB1 (RNAPII_o o I_{lo}) y, en simultáneo, una disminución de la isoforma no fosforilada (RNAPII_a o I_{la}). Este aumento en la relación I_{lo}/I_{la} ha sido históricamente interpretado como una “hiper-fosforilación” de RPB1 en respuesta al UV. Por otro lado, e independientemente de la relación I_{lo}/I_{la}, se observa una disminución de los niveles totales de RPB1, que contempla ambas isoformas, I_{lo} y I_{la}, y el tratamiento con MG-132 previno la disminución de los niveles totales de RPB1. Estos resultados confirman que en células HaCaT arrestadas en G1, el UV induce los efectos esperados 3 horas luego de la irradiación: la degradación de RPB1 en el proteasoma, así como un aumento en la relación I_{lo}/I_{la}. En consecuencia, los resultados que se mostrarán en esta sección fueron obtenidos en células HaCaT arrestadas en G1.

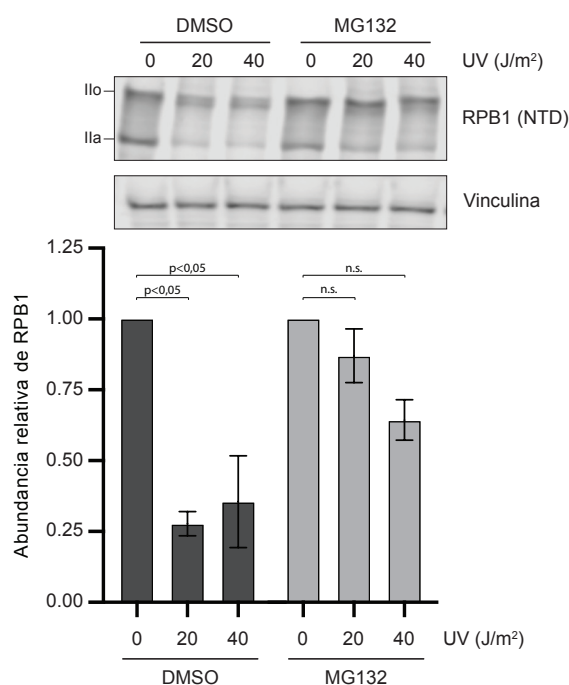


Figura R2. Células HaCaT arrestadas en G1 se comportan de manera esperada en términos de fosforilación y degradación de RPB1 en respuesta al UV: Células HaCaT arrestadas en G1 fueron incubadas con el inhibidor del proteasoma MG132 (10 μ M) durante 1 hora antes de la irradiación con las dosis indicadas de luz UV. Las células fueron cosechadas 3 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada mediante western blot utilizando un anticuerpo contra el dominio N-terminal (NTD) de RPB1 y Vinculina como control de carga. I_{lo} y I_{la} indican las formas fosforiladas y no fosforiladas de RPB1. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM

de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. Células HaCaT arrestadas en G1 muestran la respuesta esperada 3 horas luego de la irradiación con UV: hiperfosforilación de RPB1 y su degradación en el proteasoma.

Generación y caracterización de una línea celular deficiente en el sistema GG-NER

Para comprender los mecanismos que controlan los niveles de RPB1, y considerando que los modelos actuales de degradación consideran principalmente moléculas de RPB1 fosforiladas y transcripcionalmente activas, generamos líneas celulares deficientes en el reconocimiento global del genoma (GG-NER), que sólo pueden reconocer el daño a través de RNAPIIs en activa elongación (TC-NER). Para ello, utilizamos la tecnología CRISPR-Cas9 para generar líneas celulares *Knockout* (KO) para los factores XPC y DDB2, así como una línea celular doble KO para ambos factores en simultáneo (dKO XPC-DDB2 o dKO). En la Figura R3 se muestran ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos contra XPC y DDB2 que confirman el genotipo KO para las tres líneas celulares.

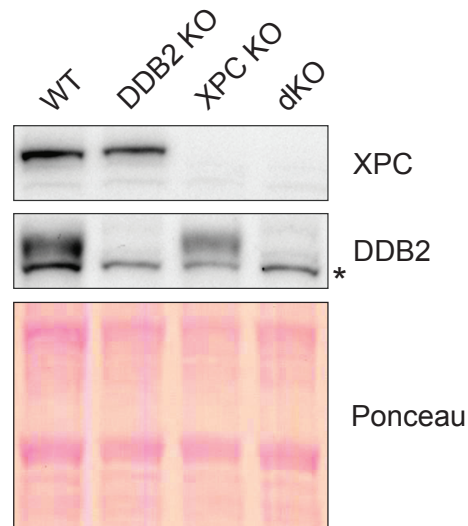


Figura R3. Generación de líneas celulares deficientes en el sistema GG-NER: Ensayo de western blot mostrando los niveles de XPC y DDB2 en células HaCaT WT, DDB2 KO, XPC KO y XPC/DDB2 doble KO (dKO). La tinción de proteínas totales con Ponceau se muestra como control de carga. El asterisco en el western blot de DDB2 indica una banda no específica. Los WB confirman el genotipo de las líneas CRISPR KO generadas.

Para confirmar que la línea celular dKO es deficiente en el sistema de reconocimiento y reparación por el sistema GG-NER, realizamos un ensayo de southern blot seguido por la incubación con anticuerpos específicos que reconocen el daño en el ADN. En la Figura R4 se observa que los niveles de 6-4PPs disminuyen con el tiempo luego de la irradiación con luz UV en células WT, mientras que en las células dKO los niveles se mantienen

constantes. Estos resultados confirman que las células dKO son deficientes en el reconocimiento y reparación del daño por el sistema GG-NER.

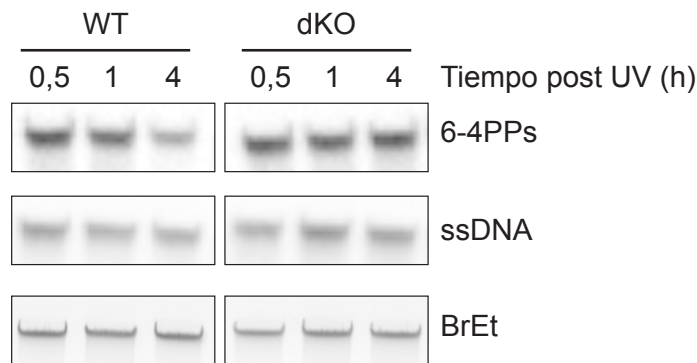


Figura R4. Las células dKO son deficientes en la reparación del daño en el ADN: Células HaCaT WT y XPC/DDB2 doble KO (dKO) arrestadas en G1 fueron irradiadas con 10 J/m² de luz UV y cosechadas en los tiempos indicados. El ADN genómico fue purificado y sometido a análisis mediante southern blot. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos que reconocen fotoproductos pirimidín-pirimidona 6-4 (6-4PPs) y ssDNA. La membrana revelada contra ssDNA y la tinción con bromuro de etidio (BrEt) del ADN total se muestran como control de carga. Este experimento se repitió al menos dos veces, y se muestra un experimento representativo. Células dKO XPC-DDB2 son deficientes en la reparación del daño en el ADN.

Por último, analizamos por tinción con PI y citometría de flujo la cantidad de ADN en células dKO privadas de FBS por 48 horas y confirmamos que, al igual que su contraparte WT (Figura R1), las células dKO se arrestan eficientemente en G1 (Figura R5).

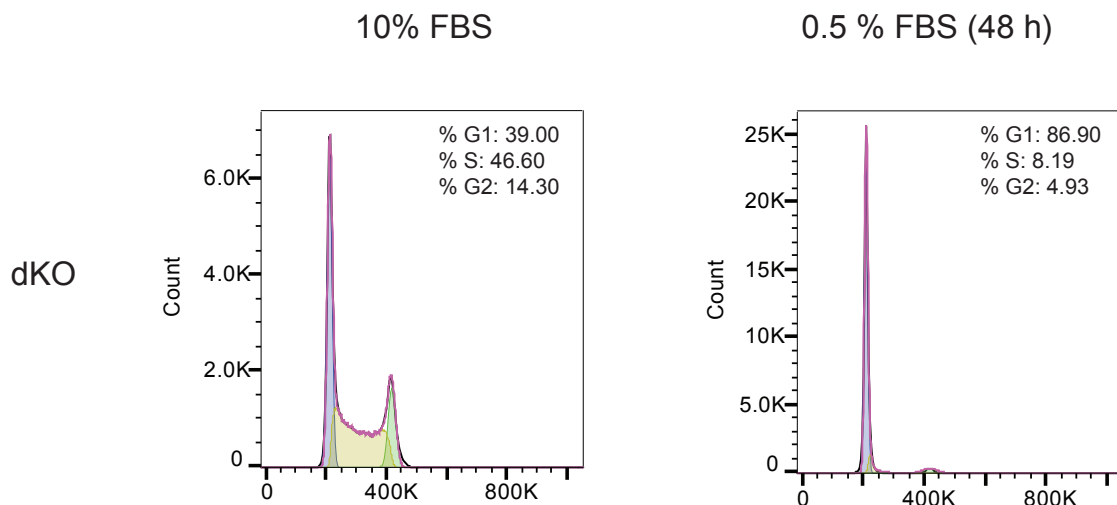


Figura R5. Las células dKO se arrestan en la fase G1 del ciclo celular cuando son privadas de FBS: Células HaCaT XPC-DDB2 dKO (dKO) fueron incubadas en condiciones normales (10% FBS) o plaqueadas el 100% de confluencia y privadas de Suero Fetal Bovino (0,5% FBS) durante 48 horas. Las células fueron cosechadas, fijadas y teñidas con yoduro de

propidio (PI) para el análisis por citometría de flujo del contenido de ADN. Se muestran los histogramas del ciclo celular y el porcentaje de células en cada fase del ciclo. El experimento se repitió dos veces, y se muestra un experimento representativo. Las células dKO se arrestan en G1 al igual que las células WT.

El sistema TC-NER controla la degradación de RPB1

Una vez establecida y caracterizada la línea dKO deficiente en el sistema GG-NER, evaluamos la degradación de RPB1 en respuesta al UV, para confirmar que son competentes en el sistema TC-NER. Para ello, irradiamos células WT y dKO con dosis crecientes de UV, cosechamos las células 3 horas más tarde, y analizamos por ensayos de western blot los niveles totales de RPB1. En la Figura R6.A se observa una reducción similar en los niveles totales de RPB1 en respuesta al UV entre células WT y dKO. Estos resultados sugieren que la línea celular dKO es competente para TC-NER, que induce la degradación de RPB1 3 horas después de irradiar. Para confirmar estos resultados, incubamos durante 3 horas células con la droga Illudin S, un agente alquilante del ADN que genera una lesión reconocida de manera exclusiva por TC-NER (Jaspers et al., 2002; Olivieri et al., 2020). Al igual que en respuesta al UV, en la Figura R6.B observamos una reducción similar en los niveles totales de RPB1 entre células WT y dKO. Estos resultados confirman que TC-NER induce la degradación de RPB1 en las primeras horas luego de irradiar y, a su vez, sugieren que las células dKO, deficientes en GG-NER, son competentes para TC-NER.

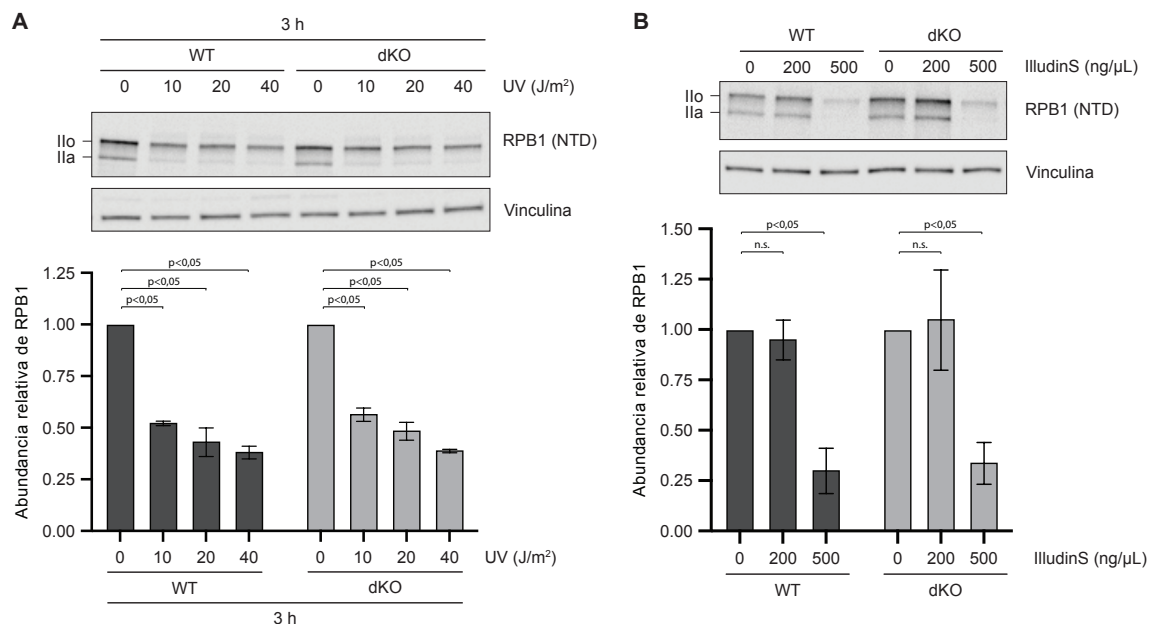


Figura R6. RPB1 es degradada en células dKO a través del sistema TC-NER a tiempos cortos: (A) Células HaCaT WT y XPC/DDB2 doble KO (dKO) arrestadas en G1 fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 3 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada mediante western blot utilizando anticuerpos contra el dominio N-terminal (NTD) de RPB1 y Vinculina como control de carga. Ilo y Ila indican las formas fosforiladas y no fosforiladas de RPB1. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. (B) Células HaCaT WT y XPC/DDB2 doble KO (dKO) arrestadas en G1 fueron incubadas durante 3 h con las

dosis indicadas de Illudin S. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada de la misma manera que antes. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. Células dKO exhiben los patrones esperados de degradación de RPB1 mediada por TC-NER a tiempos cortos luego de la irradiación, lo cual sugiere que, a pesar de ser deficientes en GG-NER, son competentes en TC-NER.

El sistema GG-NER controla la degradación de RPB1

El sistema TC-NER le toma aproximadamente 8 horas completar el reconocimiento y la reparación del daño en la mayoría de los genes transcripcionalmente activos al momento de la irradiación con UV, mientras que el sistema GG-NER se encuentra activo por períodos de tiempo más largos (Hu et al., 2017, 2015). En consecuencia, investigamos si la reparación mediada por GG-NER podría modular los niveles de RPB1 12 horas después de la irradiación con UV. Con este fin, irradiamos células WT y dKO con UV y cosechamos las células 12 horas más tarde. En la Figura R7 se observa que las células dKO poseen niveles proteicos más altos de RPB1 que las WT en respuesta al UV, sugiriendo, sorprendentemente, que el reconocimiento del daño mediado por GG-NER cumple un rol en el control de los niveles de RPB1 a tiempos largos después de la inducción del daño.

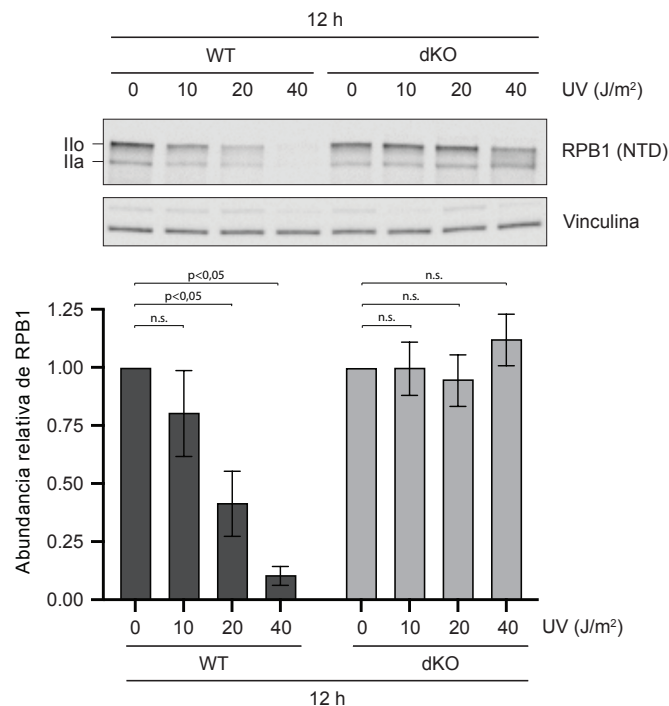


Figura R7. Células dKO previenen la degradación de RPB1 a tiempos largos: Células HaCaT WT y XPC/DDB2 doble KO (dKO) arrestadas en G1 fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada de la misma manera que antes. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de dos

experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. Las células dKO, deficientes en GG-NER, previenen la degradación de RPB1 a tiempos largos después de irradiar.

Para descartar efectos específicos de los clones dKO con los que se realizaron estos experimentos, analizamos los niveles de RPB1 en células KO para XPC o DDB2 por separado. En la Figura R8.A se observa que, 12 horas luego de la irradiación, los clones KO simples para XPC o DDB2 también presentan mayores niveles de RPB1. Al igual que las células dKO, 3 horas después de la irradiación no se observaron diferencias respecto a las células WT (resultados no mostrados). Además, realizamos experimentos de *knockdown* (KD) a través de la transfección con un siRNA específico para XPC. En la Figura R8.B se muestra el efecto del siRNA en la disminución de los niveles de XPC y en la Figura R8.C se observa que células XPC KD se comportan de la misma manera que las células XPC KO y dKO. En su conjunto, estos resultados demuestran que el reconocimiento del daño por el sistema GG-NER modula, por un mecanismo desconocido, la degradación de RPB1 a tiempos largos luego de la irradiación con UV.

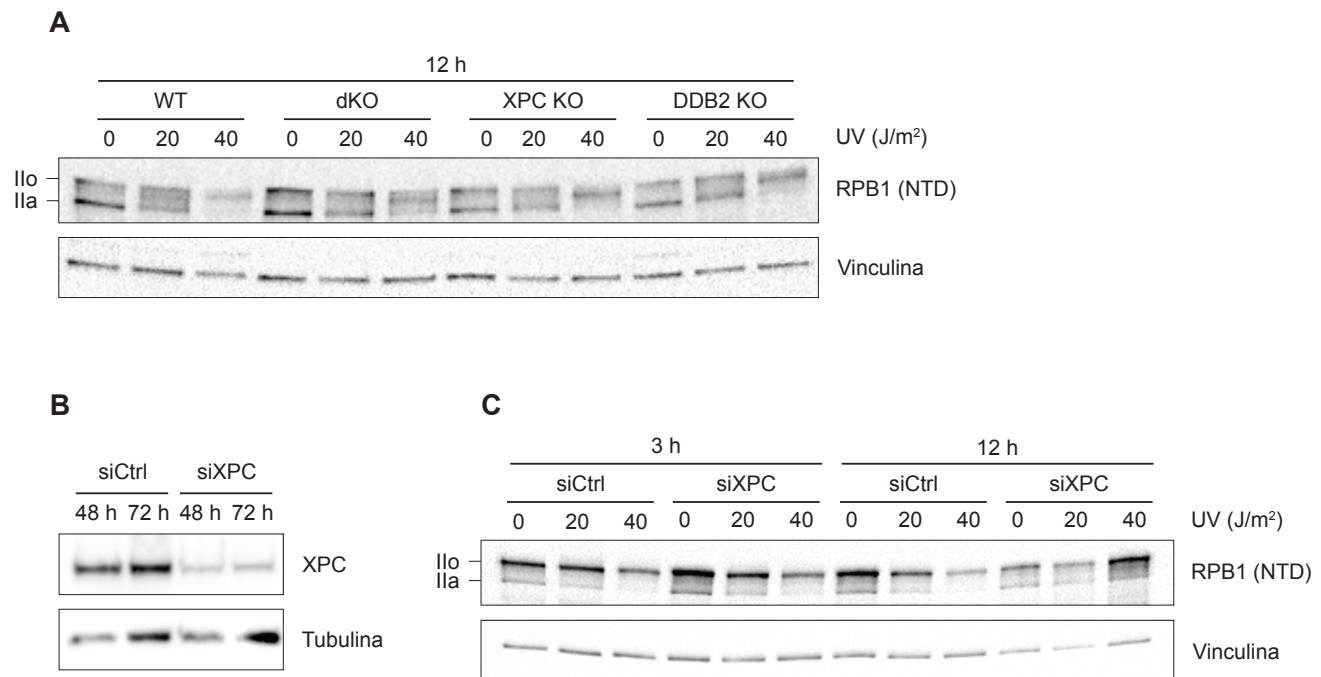


Figura R8. Deficiencias en el sistema GG-NER previenen la degradación de RPB1: **(A)** Células HaCaT WT, XPC/DDB2 doble KO (dKO), XPC KO y DDB2 KO arrestadas en G1 fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como se hizo anteriormente. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. **(B)** Células HaCaT WT fueron transfectadas con siRNA Control (siCtrl) o siRNA contra XPC (siXPC) y cosechadas 48 horas o 72 horas después. La disminución inducida por el siRNA contra XPC fue evaluada mediante western blot utilizando anticuerpos contra XPC y Tubulina como control de carga. Se muestran imágenes de un experimento representativo. **(C)** Células HaCaT WT fueron transfectadas con siCtrl o siXPC. Las células fueron incubadas en FBS 0,5% por 48 h, completando 72 horas luego de la transfección. Finalmente, las células fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 3 o 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestra un experimento representativo de dos

experimentos independientes. Distintos genotipos deficientes en GG-NER exhiben la misma prevención de la degradación de RPB1 que células dKO a tiempos largos después de la irradiación.

Como ya se mencionó, el sistema de reconocimiento por TC-NER se encuentra activo en las primeras horas luego de la irradiación, mientras que el sistema GG-NER se encuentra activo por períodos de tiempo mucho más largos. Para descartar que 12 horas después de la irradiación el sistema TC-NER pueda seguir estando activo, y no depender exclusivamente de la bibliografía publicada, decidimos analizar la degradación de RPB1 en células deficientes para distintos factores de TC-NER. Para ello, transfectamos células WT con siRNAs contra CSA (siCSA) o CSB (siCSB) (Figura R9.B), y analizamos los niveles de RPB1 3 y 12 horas luego de la irradiación con UV. En la Figura R9.A se observa que 3 horas después de la irradiación, células transfectadas con siCSA y siCSB presentan mayores niveles proteicos de RPB1 que células transfectadas con el siRNA control. Estos resultados confirman que en las primeras horas luego de la irradiación el sistema TC-NER se encuentra activo e induce la degradación de RPB1. Al analizar los niveles de RPB1 12 horas luego de la irradiación, observamos que células KD para CSA y CSB exhiben la misma disminución en los niveles totales de RPB1 que células transfectadas con el siRNA control. Estos resultados confirman que a tiempo largo el sistema TC-NER no está involucrado en el control de la degradación de RPB1. Si bien a tiempo corto luego de la irradiación no se observa una prevención total de la degradación de RPB1 en células transfectadas con los siRNA contra CSA y CSB, esto se debe presumiblemente a que la eficiencia del KD no es del 100%, y por lo tanto el remanente proteico de estos factores puedan reconocer el daño e inducir la ubiquitinación y degradación de RPB1.

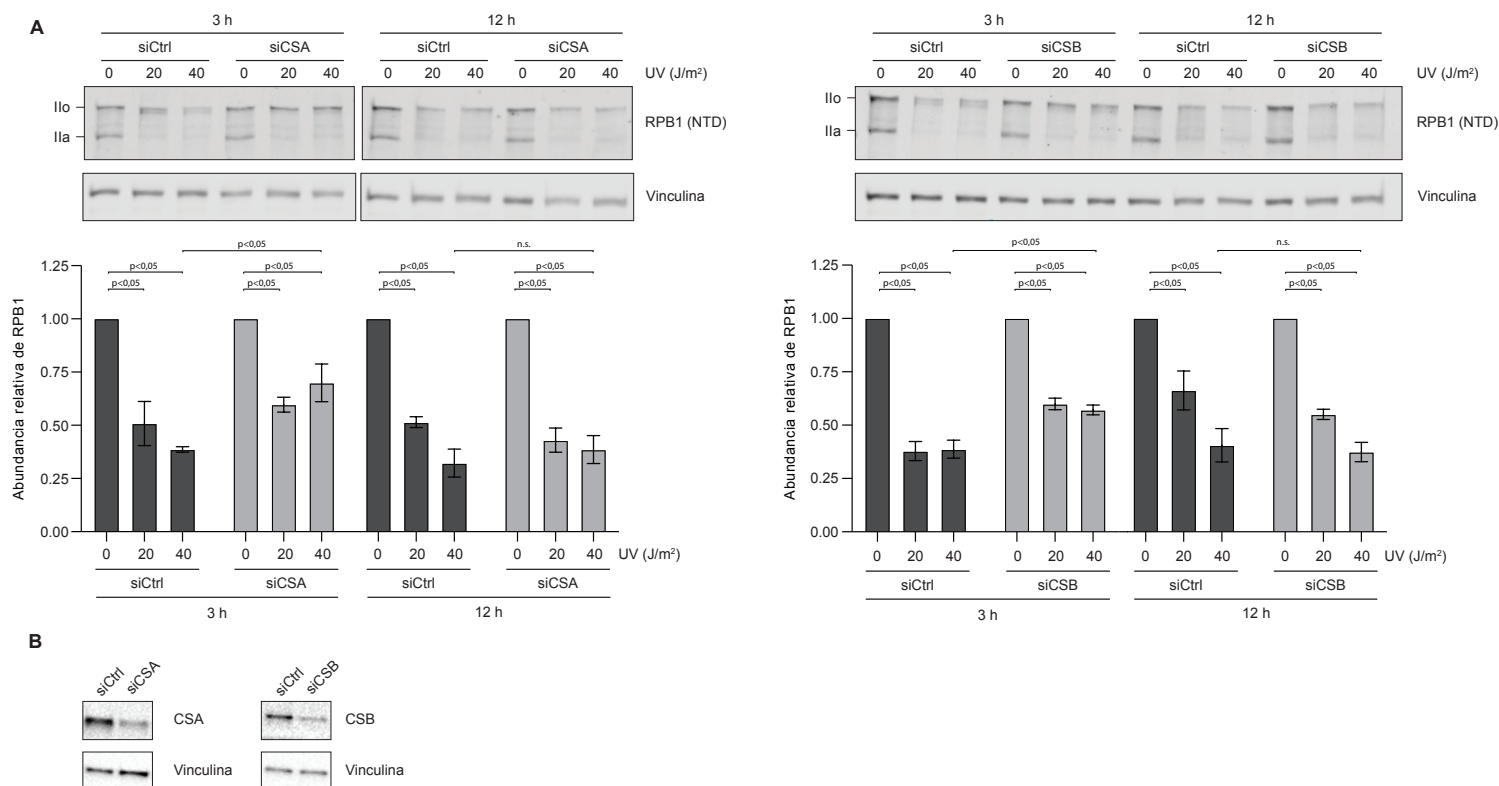


Figura R9. El sistema TC-NER controla la degradación de RPB1 a tiempos cortos, pero no a tiempos largos: (A) Células HaCaT WT fueron transfectadas con si RNA Control (siCtrl) o siRNAs contra CSA (siCSA; izquierda) o CSB (siCSB; derecha). Las células fueron arrestadas en G1 por privación de suero durante 48 horas, completando 96 horas luego de la transfección. Finalmente, las células fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 3 o 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada de la misma manera que antes. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de tres experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. **(B)** Células HaCaT WT fueron transfectadas con siCtrl, siCSA o siCSB y cosechadas 96 horas después. La disminución inducida por los siRNA correspondientes fue evaluada mediante western blot utilizando anticuerpos contra CSA, CSB y Vinculina como control de carga. Se muestran imágenes de un experimento representativo. Deficiencias en el reconocimiento por TC-NER previenen la degradación de RPB1 a tiempos cortos luego de la irradiación, mientras que no la modulan a tiempos largos.

Los resultados hasta aquí presentados apoyan un modelo secuencial de control de los niveles de RPB1: a tiempos cortos TC-NER reconoce el daño y controla la degradación de RPB1, mientras que, a tiempos largos, cuando TC-NER no se encuentra más activo, el reconocimiento por GG-NER controla la degradación.

La reparación por el sistema NER induce la degradación de RPB1

Para comprender el mecanismo por el cual el sistema GG-NER controla la degradación de RPB1, utilizamos la tecnología CRISPR-Cas9 para generar una línea celular KO para XPA (XPA KO) (Figura R10.A). En estas células, el

ADN dañado es reconocido eficientemente por los dos sistemas, se induce la reparación, pero el proceso no puede completarse. En la Figura R10.B se observa que, 3 horas luego de la irradiación, células XPA KO muestran una disminución similar de los niveles totales de RPB1 que células WT. Dado que el reconocimiento del daño por TC-NER induce la ubiquitinación y degradación de RPB1 antes de que XPA sea reclutado al complejo de reparación, no resulta sorprendente que la degradación de RPB1 sea similar entre células WT y XPA KO. En cambio, 12 horas luego de la irradiación, células XPA KO exhiben niveles aún menores de RPB1 en respuesta al UV en comparación con células WT. Estos resultados sugieren que el reconocimiento del daño por el sistema GG-NER estimula la reparación, lo cual a su vez activa un mecanismo que favorece la ubiquitinación de RPB1 y su degradación. De esta manera, en células XPA KO en que el daño es reconocido pero la reparación no se puede completar, la degradación de RPB1 se encuentra exacerbada.

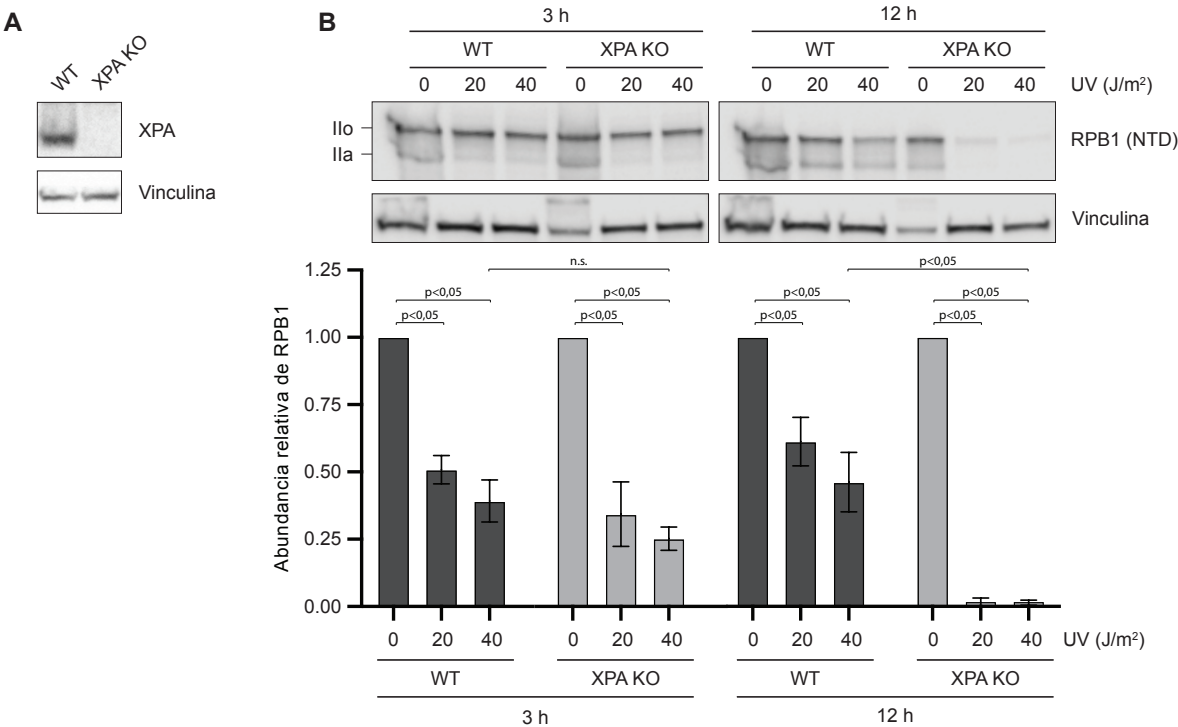


Figura R10. Células deficientes en la reparación por NER exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos: (A) Ensayo de western blot mostrando los niveles proteicos de XPA en células HaCaT WT y XPA KO. Se utilizó Vinculina como control de carga. (B) Células HaCaT XPA KO arrestadas en G1 fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 3 o 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. Células XPA KO, deficientes en el proceso de reparación del daño por el sistema NER, exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos después de irradiar.

Para confirmar que la disminución exacerbada en los niveles de RPB1 en células XPA KO se debe a su degradación en el proteasoma, pre-inhibimos células WT y XPA KO con MG132, irradiamos las células y cosechamos 3 y 12 horas más tarde. En la Figura R11.A se observa que la inhibición del proteasoma previno la hiperdegradación de RPB1 en células XPA KO. Además, para descartar efectos específicos del clon XPA KO, transfectamos células WT con un siRNA contra XPA (Figura R11.B) y observamos resultados similares a los obtenidos con células XPA KO (Figura R1.C). Estos resultados sugieren que deficiencias en el sistema de reparación NER generan una hiperdegradación de RPB1 en el proteasoma a tiempos largos luego de la irradiación.

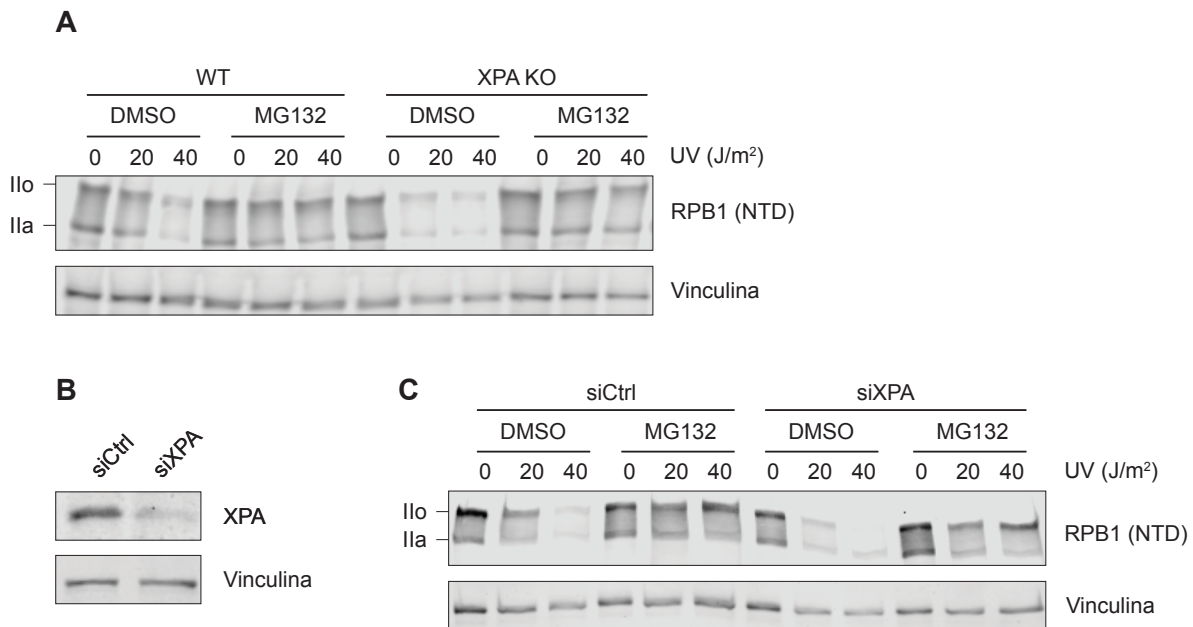


Figura R11. Células deficientes en la reparación por NER exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos: **(A)** Células HaCaT WT y XPA KO arrestadas en G1 fueron incubadas durante 1 hora con el inhibidor del proteasoma MG132 (10 μ M), luego irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y finalmente cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. **(B)** Células HaCaT WT fueron transfectadas con siRNA Control (siCtrl) o contra XPA (siXPA) y cosechadas 72 h después. El efecto del siRNA fue evaluado mediante western blot utilizando anticuerpos contra XPA y Vinculina como control de carga. Se muestran imágenes de un experimento representativo. **(C)** Células HaCaT WT fueron transfectadas con siCtrl o siXPA. Las células fueron arrestadas en G1 por privación de suero durante 48 horas, completando 72 horas luego de la transfección. Finalmente, las células fueron irradiadas con las dosis indicadas de UV y cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada de la misma manera que antes. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. La hiperdegradación de RPB1 en células XPA KO se previene en presencia del inhibidor del proteasoma MG132. Además, células XPA KD se comportan igual que las XPA KO.

Si bien XPA es un conocido factor necesario para la reparación del daño, el primer paso luego del reconocimiento es el reclutamiento de TFIIH a la lesión. Por lo tanto, y para descartar funciones específicas de XPA, utilizamos

espironolactona (SP) (Alekseev et al., 2014), un fármaco esteroideo que induce rápidamente la degradación en el proteasoma de la helicasa XPB, parte de TFIIH (Figura R12.A). En consecuencia, en células tratadas con SP, TFIIH puede reclutarse a la lesión, pero carece de la subunidad XPB. Incubamos células WT con SP durante 1 hora, irradiamos con UV y cosechamos 3 y 12 horas más tarde. En la Figura R12.B se observa que, 3 horas luego de la irradiación con UV, células tratadas con SP exhiben niveles similares de RPB1 respecto a su contraparte tratada con el vehículo. En cambio, 12 horas luego de la irradiación, células tratadas con SP muestran menores niveles de RPB1 respecto a las WT, con un p-valor de 0,0602 que, si bien no es menor a 0,05, acompaña las tendencias y los resultados observados a lo largo de esta tesis. Además, la inhibición del proteasoma con MG-132 previno esta disminución (resultados no mostrados). Al igual que lo observado en células XPA KO, estos experimentos sugieren que deficiencias en el sistema de reparación generan una hiperdegradación de RPB1.

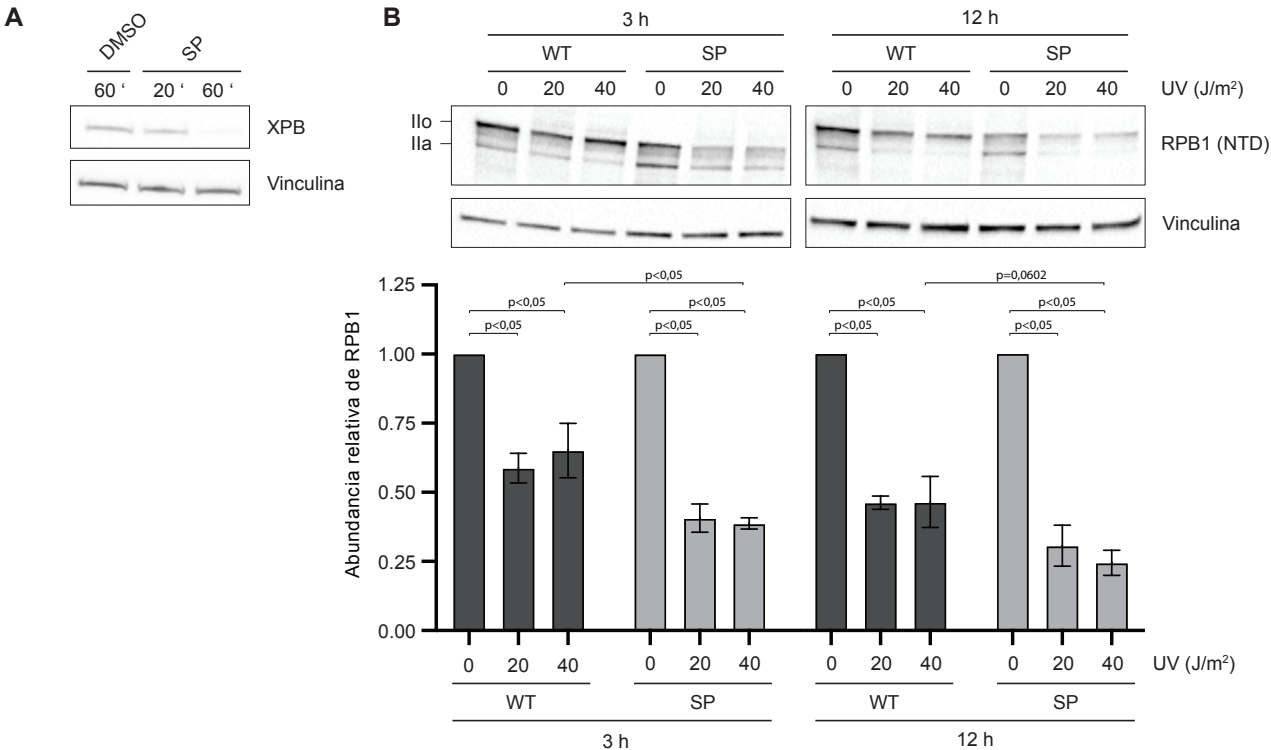


Figura R12. Células deficientes en la reparación por NER exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos: **(A)** Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron incubadas durante 20 o 60 minutos con espirinolactona (SP; 2,5 μ M). El efecto del SP fue evaluado mediante western blot utilizando anticuerpos contra XPB y Vinculina como control de carga. Se muestran imágenes de un experimento representativo. **(B)** Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron incubadas durante 1 hora con espirinolactona (SP, 2.5 μ M) para inducir la degradación de XPB. Luego, las células fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 3 o 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de tres experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. Células depletadas de XPB, deficientes en el proceso de reparación del daño por el sistema NER, exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos después de irradiar.

Los resultados mostrados hasta este punto sugieren fuertemente que células donde el daño es reconocido, pero el proceso de reparación no se puede completar, presentan una hiper-degradación de RPB1 en respuesta al UV. Sin embargo, esto podría deberse a roles específicos tanto de XPA, como de XPD. Por lo tanto, decidimos generar células deficientes en varios factores del sistema de reparación NER. Para ello, transfectamos siRNAs contra XPD, la otra helicasa de TFIIH, y contra las endonucleasas XPF y XPG (Figura R13.A). En la Figura R13.B se muestra que 12 horas después de la irradiación, en todas las células en las que el proceso de reparación se encuentra impedido, se observa una hiperdegradación de RPB1. Por último, inhibimos la síntesis de ADN, que es la etapa final del proceso de reparación. Para ello decidimos utilizar afidicolina, un inhibidor de ADN polimerasas (Baranovskiy et al., 2014). En este experimento cobra particular relevancia la utilización de células arrestadas en G1, dado que al inhibir las ADN polimerasas sólo se está inhibiendo el último paso del sistema NER, y los resultados observados no están asociados al estrés replicativo que induce la afidicolina en células proliferativas. Por lo tanto, incubamos durante 1 hora con afidicolina, irradiamos las células y cosechamos 3 y 12 horas más tarde. En la Figura R12.C se observa que células tratadas con afidicolina muestran menos niveles de RPB1 que las tratadas con el vehículo a tiempos largos luego del UV. Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de ADN también induce la hiperdegradación de RPB1.

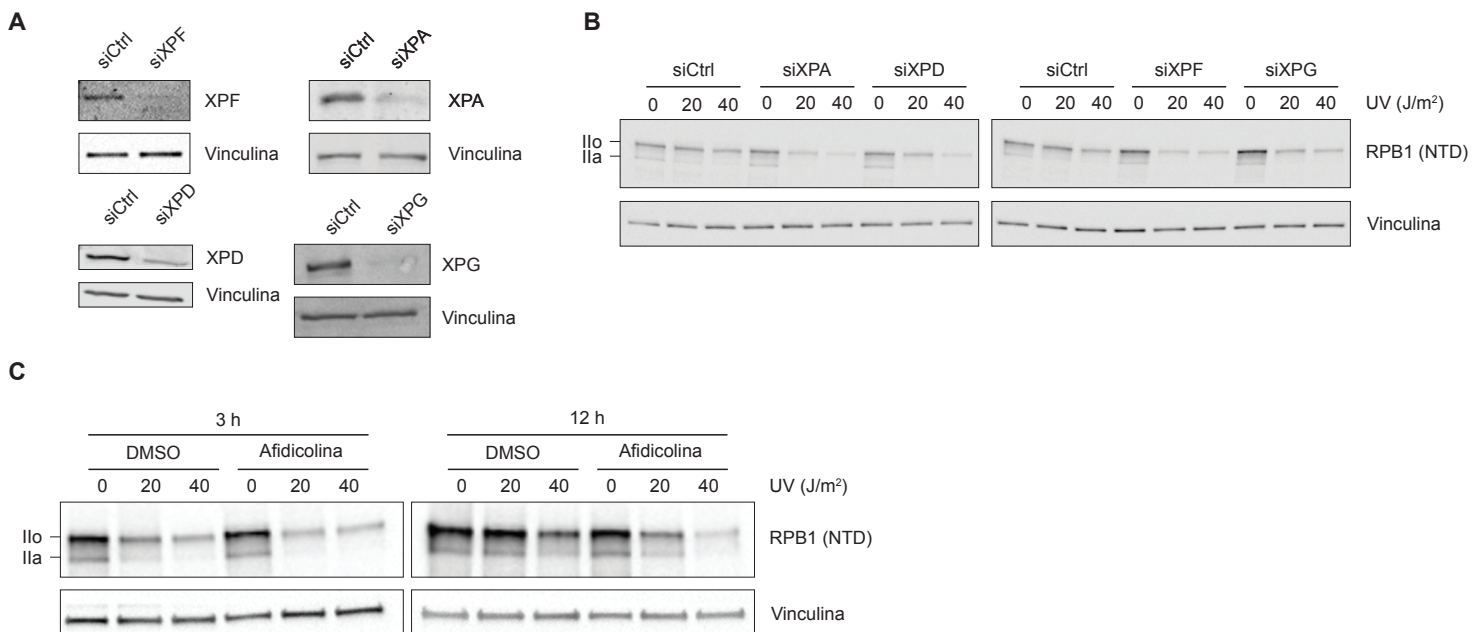


Figura R13. Células deficientes en la reparación por NER exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos: **(A)** Células HaCaT WT fueron transfectadas con siRNAs dirigidos contra XPA, XPD, XPF y XPG y cosechadas 72 horas más tarde. La disminución de cada factor XP fue evaluada mediante western blot utilizando anticuerpos específicos y Vinculina como control de carga. Se muestran imágenes representativas de un experimento. **(B)** Células HaCaT WT

fueron transfectadas con siRNAs contra XPA, XPD, XPF y XPG. Las células fueron arrestadas en G1 por privación de suero durante 48 h horas, completando 72 h luego de la transfección. Finalmente, las células fueron irradiadas con las dosis indicadas de luz UV y cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. **(C)** Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron incubadas durante 2 horas con afidicolina (300nM), irradiadas con las dosis indicadas de UV y cosechadas 3 y 12 después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran las imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 relativa a la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Impedir la reparación del daño a través del KD de los factores NER XPA, XPD, XPF y XPG, así como impedir la síntesis de ADN, induce una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos después de la irradiación con UV

En conjunto, estos resultados sugieren que el reconocimiento del daño por el sistema GG-NER estimula la reparación, lo cual a su vez activa una cascada de señalización que controla los niveles de RPB1. De esta manera, un menor reconocimiento del daño implica menor degradación de RPB1, mientras que un proceso de reparación incompleto resulta en niveles exacerbados de degradación.

El hecho de que células deficientes en el proceso de reparación exhiban una hiperdegradación de RPB1 permite suponer que la exposición prolongada de intermediarios de reparación mantiene activa la vía que induce la ubiquitinación y degradación de RPB1. Dado que este proceso involucra helicasas, endonucleasas y ADN polimerasas, nos preguntamos si quinasas clásicas de la DDR modulan la degradación de RPB1 por esta vía. Para ello, pre-inhibimos células HaCaT WT arrestadas en G1 con inhibidores farmacológicos contra ATM, ATR y DNA-PK, irradiamos con UV y cosechamos las células 12 horas después de la irradiación. En la Figura R14 se observa que la inhibición de las tres quinasas genera la misma disminución en los mismos niveles de RPB1 que células tratadas con vehículo. Estos resultados descartan un rol prominente de estas quinasas en la modulación de los niveles de RPB1.

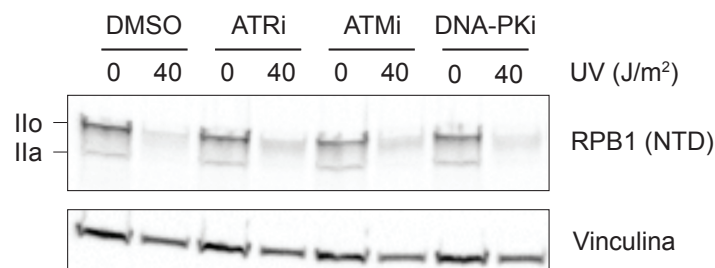


Figura R14. Las quinasas de la DDR no modulan la degradación de RPB1: Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron incubadas durante 1 h con inhibidores de ATR (VE-822, 1 μ M), ATM (KU60019, 3 μ M) o DNA-PK (NU7441, 1 μ M) irradiadas con 40 J/m² y cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. Inhibir las tres quinasas más estudiadas de la DDR no previene la degradación de RPB1 en células WT.

La degradación de RPB1 mediada por GG-NER es independiente de la transcripción y ocurre *in trans* respecto a la lesión

Dado que en el sistema GG-NER no hay moléculas de RNAPII involucradas, los resultados presentados hasta aquí sugieren que el reconocimiento del daño por GG-NER estimula la reparación, lo cual a su vez activa una vía que controla la degradación de RPB1. Por lo tanto, este mecanismo debe ser necesariamente *in trans* respecto a la lesión. En consecuencia, cualquier molécula de RPB1 podría ser dirigida para su degradación por esta vía, y no necesariamente moléculas de RPB1 formando parte de complejos de RNAPII transcripcionalmente activos que se encuentran con una lesión. Para evaluar el estado transcripcional de las moléculas de RPB1 que son marcadas para su degradación, decidimos utilizar el fármaco 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB), un pan-inhibidor de quinasas del CTD de RPB1 que favorece la acumulación de la isoforma no fosforilada, respecto a la isoforma fosforilada. De esta manera, el tratamiento con DRB previene la fosforilación de RPB1, inhibiendo así la transcripción (Chodosh et al., 1989). Por lo tanto, pre-inhibimos durante 3 horas con DRB células WT, irradiamos con UV y cosechamos 12 horas más tarde. En la Figura R15.A se muestra que en células tratadas con DRB, la isoforma no fosforilada supera ampliamente a la isoforma fosforilada, y se observa una marcada disminución de los niveles de RPB1 luego de la irradiación con UV. Estos resultados sugieren que las moléculas de RPB1 no fosforiladas y transcripcionalmente inactivas pueden ser dirigidas para su degradación en el proteasoma. Para comprender con mayor detalle el rol de la regulación transcripcional en la degradación de moléculas de RPB1 no fosforiladas, utilizamos inhibidores específicos de las dos principales quinasas del CTD involucradas en la regulación transcripcional: CDK7 y CDK9. Como se detalló en el Capítulo 1 de la introducción de esta tesis, CDK7 fosforila el CTD de RPB1 en la Serina 5 y estimula la iniciación de la transcripción, mientras que CDK9 fosforila principalmente la Serina 2, y estimula la elongación productiva. Pre-inhibimos células WT durante 1 hora con un inhibidor de CDK7 (THZ1), o con un inhibidor de CDK9 (BAY1251152), y en ambas condiciones observamos resultados similares a los observados con DRB: una clara reducción en los niveles de la isoforma no fosforilada de RPB1 en respuesta a la exposición con UV (Figura R15.B)

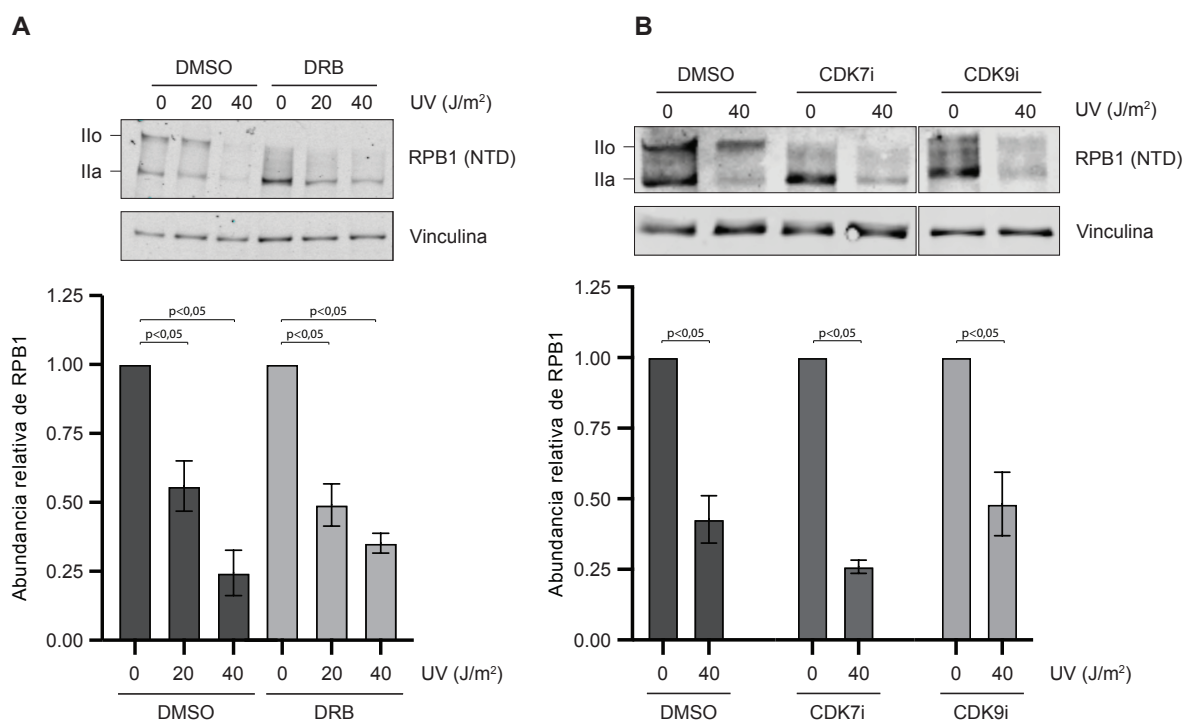


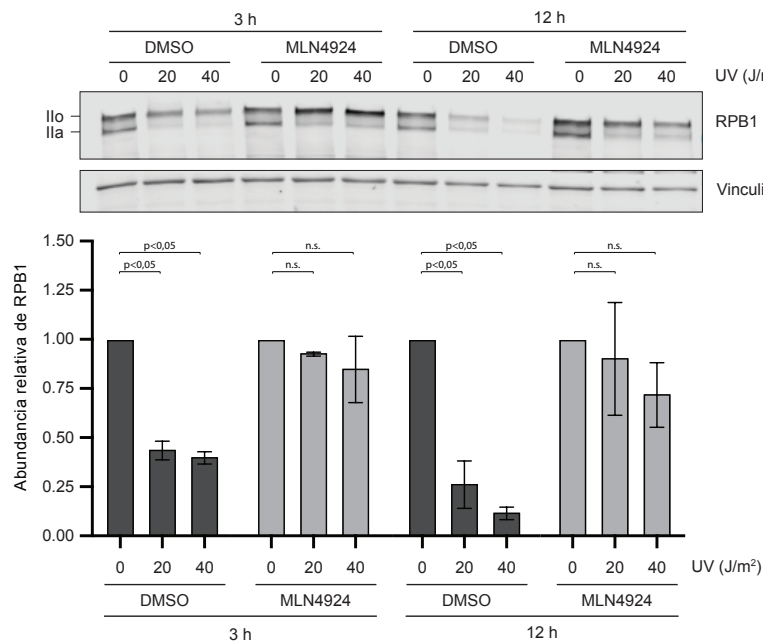
Figura R15. Las moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas pueden ser dirigidas a la degradación: (A) Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron incubadas durante 3 horas con el inhibidor de quinasas DRB (100 μ M) y luego irradiadas con las dosis indicadas de luz UV. Las células fueron cosechadas 12 horas después de la irradiación. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 en relación con la condición de 0 J/m² de tres experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. **(B)** Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron irradiadas con 40 J/m² de luz UV. Inmediatamente después de la irradiación, se añadió el inhibidor de CDK7 THZ1 (100 nM) o el inhibidor de CDK9 BAY 1251152 (400 nM), y las células fueron cosechadas 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. La isoforma no fosforilada y transcripcionalmente inactiva de RPB1 es degradada a tiempos largos luego de la irradiación con UV.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección respaldan la hipótesis de que las moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas pueden ser dirigidas para su degradación. En este sentido, la disminución de la isoforma de RPB1 no fosforilada en células tratadas con UV se interpretó hasta ahora como una conversión hacia la isoforma fosforilada, que luego sería degradada. Sin embargo, en vista de los resultados aquí presentados, la desaparición observada de la banda no fosforilada puede además reflejar su degradación.

La degradación de RPB1 mediada por el sistema NER depende de E3 ligasas de la familia CRL

El hecho de que el sistema GG-NER controle la degradación de RPB1 de manera independiente de la actividad transcripcional, en un mecanismo *in trans* respecto a la lesión, abre el interrogante respecto a qué complejo E3 Ligasa es activado para inducir la ubiquitinación de RPB1. En este sentido, diferentes complejos E3 Ligasa de ubiquitina han sido asociados al sistema de reparación NER y a la ubiquitinación de RPB1. La mayoría de estos complejos forman parte de la familia de E3 Ligasas “Cullin-RING Ligases” (CRL), las cuales comparten la característica de necesitar la conjugación de NEDD8 a las culinas para su activación catalítica. Para comprender el rol de la familia de CRLs en la degradación de RPB1, utilizamos el inhibidor de la neddilación MLN4924, que previene la activación de toda la familia de CRLs (Soucy et al., 2009). Para ello, pre-inhibimos células WT durante 1 hora con MLN4924, irradiamos con UV y cosechamos luego de 3 y 12 horas. En la Figura R16.A se observa que, tanto a tiempo corto como a tiempo largo, el tratamiento con MLN4924 previno por completo la degradación de RPB1 en respuesta al UV. Además, la pre-inhibición por 1 hora con MLN4924 seguido del agregado de Illudin S también previno la degradación de RPB1 mediada específicamente por TC-NER (Figura R16.B). Estos resultados confirman que E3 ligasas de la familia CRL están involucradas en la degradación de RPB1 mediada por TC-NER a tiempo corto, y sugieren que esta familia está también involucrada en la degradación mediada por GG-NER a tiempo largo.

A



B

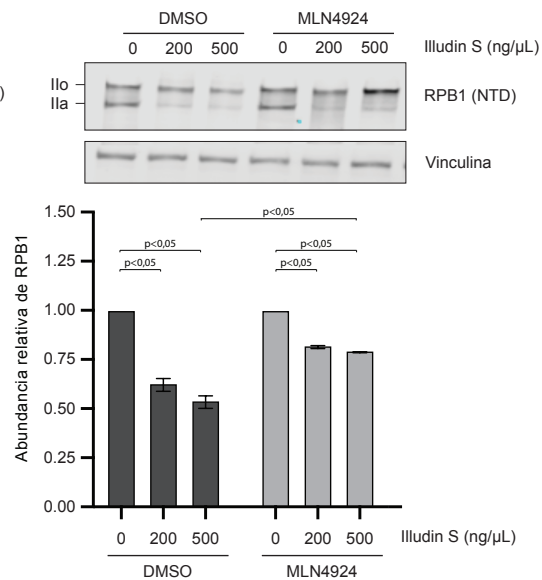


Figura R16. E3 ligasas de la familia CRL controlan la degradación de RPB1: **(A)** Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron incubados durante 1 hora con el inhibidor de nedilación MLN4924 (10 μ M) antes de la irradiación con las dosis indicadas de luz UV. Las células fueron cosechadas 3 o 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 en relación con la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. **(B)** Células HaCaT arrestadas en G1 fueron incubadas durante 1 hora con el inhibidor de nedilación MLN4924 (10 μ M) antes de añadir las dosis indicadas de Illudin S. Las células fueron cosechadas 3 h después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 en relación con la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. La inhibición de las E3 ligasas de la familia de CRLs previene la degradación global de RPB1 tanto a tiempo corto como tiempo largo, así como la inducida específicamente por TC-NER en células tratadas con Illudin S.

El hecho de que la inhibición de la familia de CRLs prevenga la degradación a tiempos largos permite suponer que esta familia de E3 ligasas está involucrada en la degradación de moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas. Por lo tanto, pre-inhibimos células WT con DRB y MLN4924 y observamos una prevención en la degradación de moléculas de RPB1 no fosforiladas 12 horas luego de la irradiación (Figura R17). Estos resultados sugieren que la actividad E3 ligasa de la familia de CRLs es responsable del control de la degradación de RPB1 mediada por el reconocimiento de las lesiones por GG-NER. En conjunto, estos resultados confirman que la familia de CRLs está involucrada en la ubiquitinación global de RPB1, aunque no nos permiten conocer en detalle los factores que confieren la especificidad al complejo E3 ligasa en cada uno de los escenarios.

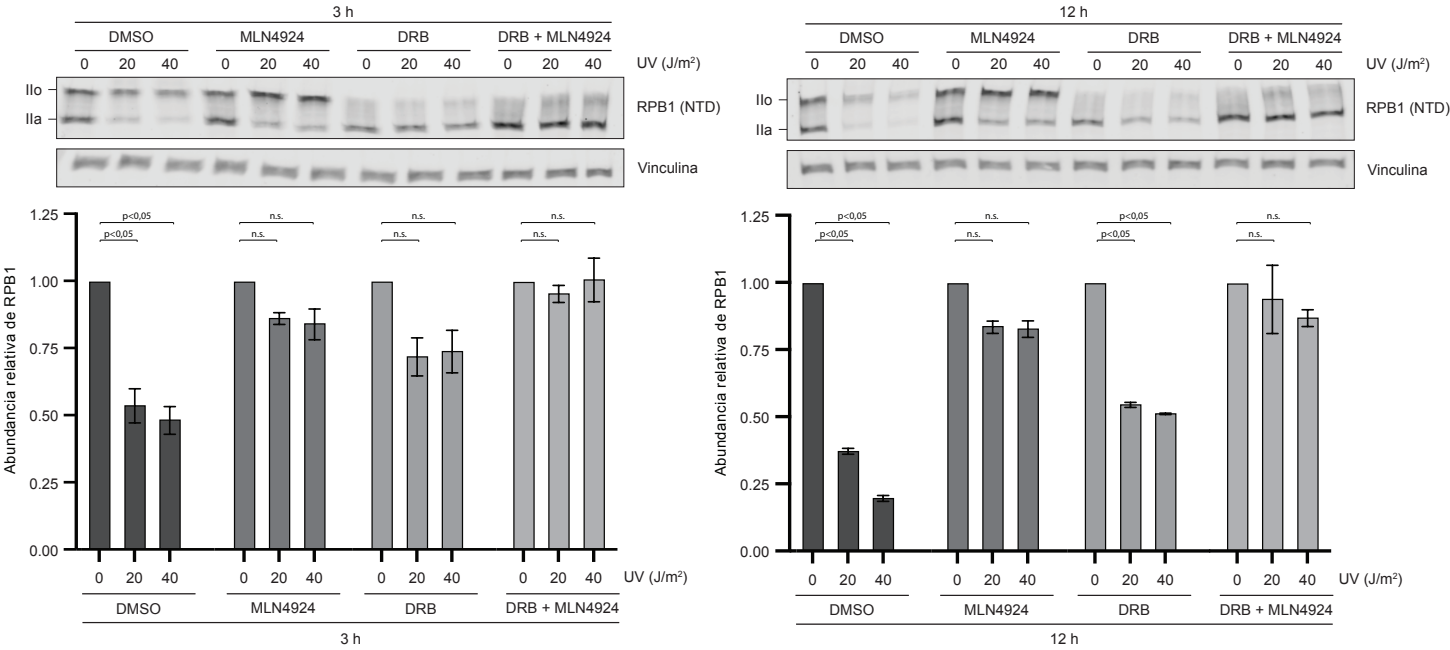


Figura R17. E3 ligasas de la familia CRL controlan la degradación de moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas: **(A)** Células HaCaT arrestadas en G1 fueron incubadas con el inhibidor de nedilación MLN4924 durante 1

hora (10 μ M), con el inhibidor de quinasas DRB (100 μ M) durante 3 horas, o una combinación de ambos, antes de la irradiación con las dosis indicadas de luz UV. Las células fueron cosechadas 3 o 12 horas después. La abundancia relativa de RPB1 fue evaluada como antes. Se muestran imágenes de un experimento representativo y la media $\pm$ SEM de la abundancia de RPB1 en relación con la condición de 0 J/m² de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. La inhibición de las E3 ligasas de la familia de CRLs previene la degradación de moléculas de RPB1 no fosforiladas y transcripcionalmente inactivas.

Regulación transcripcional en células deficientes en el sistema NER

Ha sido demostrado que en células donde RPB1 no puede ser degradada se observa un aumento en la expresión génica en respuesta al daño (Tufegdžić Vidaković et al., 2020), y también hemos mostrado en esta tesis que células deficientes en GG-NER presentan mayores niveles de RPB1 a tiempos largos después de la irradiación (Figura R7). Por lo tanto, decidimos analizar los niveles globales de transcripción en células WT y deficientes en el reconocimiento por GG-NER. Para ello, irradiamos con luz UV células WT y dKO, y cosechamos las células 12 horas luego de la irradiación. 15 minutos antes de cosechar las células, marcamos metabólicamente los transcritos nacientes con un pulso del análogo de uridina 4sU. Luego, purificamos ARN total y unimos covalente la molécula biotina al 4sU incorporado al ARN naciente durante el pulso de 15 minutos. Finalmente, realizamos ensayos de dot blot de ARN total y revelamos con estreptavidina acoplada a una molécula fluorescente. Dado que la estreptavidina se une con alta afinidad a la biotina, estos experimentos permiten conocer los niveles totales de los transcritos sintetizados durante los 15 minutos previos a cosechar las células. En la Figura R18 se observa que, en respuesta a la irradiación con 20 J/m² de UV, células dKO presentan niveles más altos en la síntesis total de ARN que las células WT, en el momento en el cual a su vez exhiben mayores niveles de RPB1 (Figuras R7 y R8). Sin embargo, con 40 J/m² de UV se observan los mismos niveles de transcripción naciente. Estos resultados sugieren que, en respuesta al daño al ADN, células deficientes en GG-NER muestran mayores niveles de RPB1 y, en consecuencia, mayores niveles en la actividad transcripcional de RNAPII. Sin embargo, no nos permiten descartar el rol de otros factores en la regulación transcripcional cuando el daño resulta excesivo, como es el caso del factor de transcripción ATF3.

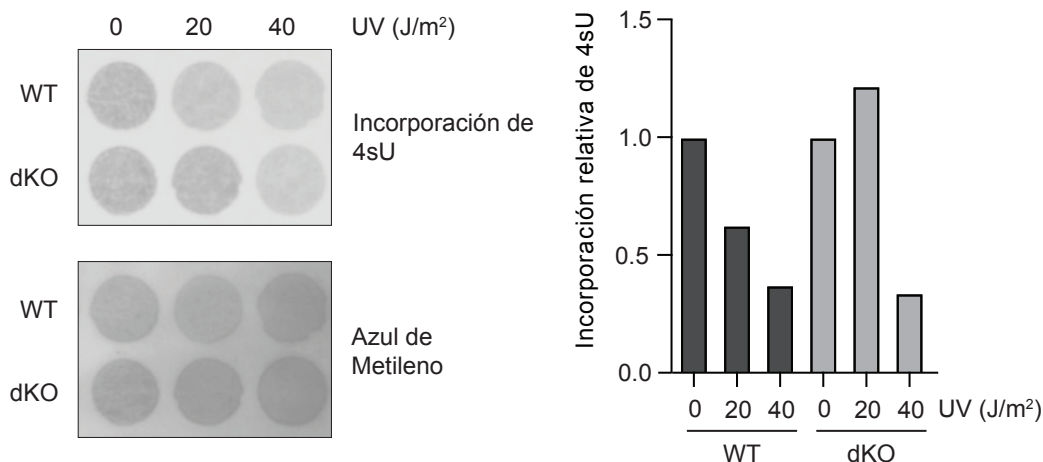


Figura R18. Los niveles de RPB1 modulan la transcripción. Células HaCaT WT o XPC-DDB2 dKO (dKO) arrestadas en G1 fueron irradiadas con las dosis indicadas de UV y cosechadas 12 h después. 15 minutos antes de cosechar, las células fueron tratadas con un pulso de 15 minutos de 4sU (1 mM) y luego se purificó ARN total. El ARN total fue biotinilado y sometido a un ensayo de dot blot. La membrana fue incubada con estreptavidina acoplada a un fluoróforo, revelando el ARN naciente incorporado durante el pulso de 4sU. La tinción con azul de metileno del ARN total se muestra como control de carga. Panel izquierdo: membranas de 4sU y azul de metileno de un experimento. Panel derecho: niveles de incorporación de 4sU relativos al ARN total. Mayores niveles de RPB1 exhiben un aumento en los niveles totales de transcripción con 20 J/m², pero no con 40 J/m².

Los resultados mostrados en esta sección apoyan un modelo secuencial del control de la degradación de RPB1: a tiempos cortos por TC-NER, mientras que a tiempos largos por GG-NER. De esta manera, el reconocimiento por GG-NER estimula la reparación del daño y a su vez activa una cascada de señalización que induce la activación de E3 ligasas de la familia de CRLs que promueven la ubiquitinación y degradación de RPB1. Esta señalización debe ser necesariamente *in trans*, dado que moléculas transcripcionalmente inactivas de RPB1 puedan ser dirigidas para su degradación. De esta manera, la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN no es un paso exclusivamente necesario para la reparación, sino que constituye un mecanismo involucrado en el control de la expresión génica y la respuesta celular ante el daño al ADN, donde mayor reparación implica menores niveles de RPB1, facilitando la represión global de la transcripción.

Sección 2: Rol de la quinasa ATR en la respuesta transcripcional al daño al ADN

Tal como se describió en la introducción de esta tesis, en respuesta al daño al ADN se observan cambios globales en la regulación transcripcional. En la Sección 1 de Resultados describimos el rol del sistema NER en la degradación de RPB1 y su impacto en la represión global de la transcripción. Sin embargo, el daño al ADN también genera la inducción de un programa transcripcional específico que escapa a esta represión, e involucra la expresión de genes de respuesta al daño y la disminución global en la tasa de elongación de RNAPII. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que, en células irradiadas con luz UV, la quinasa ATR se activa mediante el sistema NER, lo cual favorece la hiperfosforilación de RPB1, reduciendo así su tasa de elongación y modulando la respuesta de *splicing* alternativo (Muñoz et al., 2017). A la vez, como ha sido demostrado por nuestro grupo de investigación, esta respuesta transcripcional favorece la inducción de isoformas de *splicing* alternativo pro-apoptóticas (Muñoz et al., 2009). Si bien durante la fase S del ciclo celular ATR desempeña un claro rol anti-apoptótico dado que previene el colapso de horquillas de replicación arrestadas, resultados del laboratorio del Dr. Aziz Sancar mostraron que, en células HaCaT arrestadas en G1, ATR tiene un rol pro-apoptótico (Kemp and Sancar, 2016). Estos resultados sugieren que la actividad de ATR no se restringe a la estabilización de horquillas de replicación en fase S, sino que también está involucrada en la regulación transcripcional a lo largo de todo el ciclo celular. En esta sección de resultados, profundizaremos en los mecanismos moleculares por los cuales ATR modula la actividad de la RNAPII y la inducción del programa transcripcional específico de respuesta al daño al ADN que escapa a la represión global de la transcripción.

La inhibición de ATR previene la hiperfosforilación del CTD de RPB1

Tomando como punto de partida los resultados publicados por nuestro grupo que muestran que la inhibición de ATR previene la hiperfosforilación de RPB1 en respuesta al UV (Figura R19, extraída de Muñoz et al., 2017), decidimos investigar los mecanismos moleculares subyacentes a esta regulación. La héptada consenso del CTD de RPB1 está conformada por los aminoácidos Tirosina-Serina-Prolina-Treonina-Serina-Prolina-Serina (YSPTSPS), mientras que ATR fosforila Serinas o Treoninas seguidas de Glutamina (SQ/TQ). De esta manera, resulta improbable que ATR sea una quinasa del CTD de RPB1, dado que esta no posee la secuencia consenso necesaria. Si bien RPB1 posee 6 sitios SQ/TQ cerca de su extremo amino-terminal, incluso si ATR fosforilara estos residuos, difícilmente pueden ser responsables de inducir el retraso en la corrida electroforética de la banda Ilo de RPB1. En consecuencia, ATR debe modular el estado de fosforilación del CTD de RPB1 de manera indirecta. Para identificar los factores fosforilados por ATR encargados de esta modulación, realizamos ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos que reconocen la secuencia consenso de ATR en su estado

fosforilado (p-(SQ/TQ)), seguido por análisis por espectrometría de masas. Realizamos dos enfoques experimentales distintos y utilizamos diversos inhibidores de ATR para así garantizar que los factores identificados son sustratos de ATR *bona fide*. Tal como ha sido discutido en la Sección 1 de Resultados, realizamos estos experimentos en células arrestadas en G1 para prevenir la activación de ATR por el estrés replicativo, y considerar sólo su activación mediada por el sistema NER.

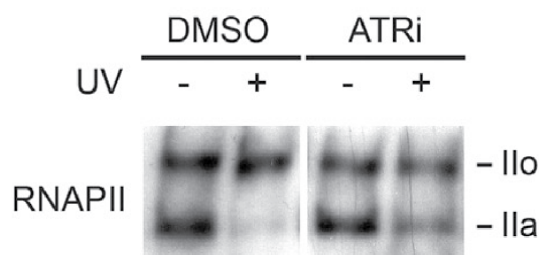


Figura R19, extraída de Muñoz et al., 2017. La inhibición de ATR previene la hiperfosforilación de RPB1 en respuesta al UV: Se incubaron células HaCaT con el inhibidor de ATR ETP-46464 durante 1 hora, se irradió con 15 J/m² de UV y se cosechó para el análisis por western blot 3 horas más tarde. Se observa que la inhibición de ATR previene la hiperfosforilación de RPB1 en respuesta al UV.

Identificación de factores fosforilados por ATR a través de proteómica cuantitativa: SILAC-Proteomics

El primer enfoque experimental que nuestro grupo de investigación decidió utilizar para la identificación de factores fosforilados por ATR consistió en realizar un SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), seguido de inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce la secuencia consenso de ATR en su estado fosforilado (p-(SQ/TQ)) y análisis por espectrometría de masas de los factores inmunoprecipitados (*SILAC-Proteomics*). Esta estrategia de proteómica permite estudiar de manera cuantitativa cambios en la abundancia relativa de proteínas entre las distintas condiciones experimentales.

Los resultados publicados que se muestran en la Figura R19 se obtuvieron utilizando ETP-46464, un potente inhibidor de ATR, pero con baja especificidad, dado que puede presentar efectos pleiotrópicos sobre otras quinasas de la DDR (Toledo et al., 2011). Por lo tanto, el primer paso fue la puesta a punto del AZ20, un inhibidor más reciente y con mayor selectividad hacia ATR (Weber and Ryan, 2015). En respuesta a estrés replicativo, ATR fosforila diversos factores, siendo CHK1 su sustrato mejor caracterizado, con fosforilaciones reportadas en los residuos Serina 317 y Serina 345. Sin embargo, estudios previos del laboratorio del Dr. Aziz Sancar demostraron que CHK1 no se expresa en células arrestadas en G1 y, en línea con estos resultados, nuestro grupo fue incapaz

de detectar CHK1 en células arrestadas en G1 (Kemp and Sancar, 2016). Dado que la falta de expresión de CHK1 en G1 impide su uso como marcador de la actividad de ATR, evaluamos el efecto del inhibidor AZ20 sobre la activación de ATR en células en activa proliferación. Para ello, se incubaron células HaCaT WT con AZ20 1 μ M durante 1 hora, se irradió con UV y se cosecharon las células 3 horas más tarde. En la Figura R20 se observa que la pre-inhibición con AZ20 1 μ M previene la fosforilación de CHK1 y los patrones globales de p-(SQ/TQ), por lo que se utilizó esta concentración de inhibidor para realizar el ensayo SILAC seguido de análisis por espectrometría de masas en células arrestadas en G1.

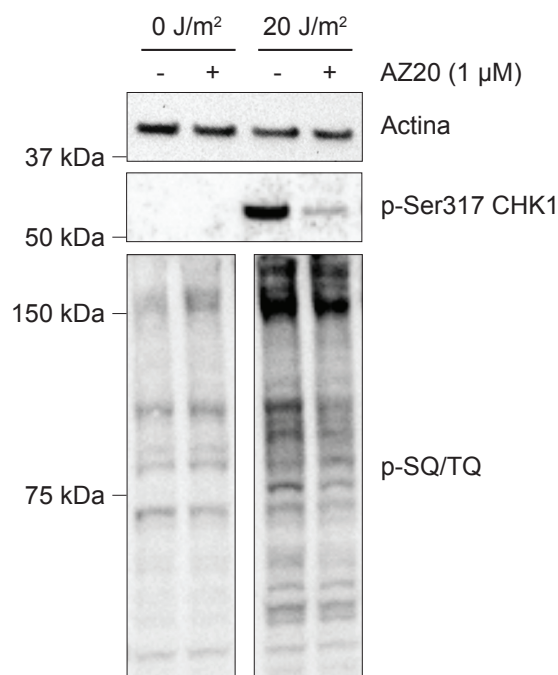


Figura R20. El inhibidor AZ20 previene la activación de ATR: Células HaCaT WT en activa proliferación fueron incubadas durante 1 hora con el inhibidor de ATR AZ20 (1 μ M), irradiadas con UV (20 J/m²), incubadas luego en presencia de inhibidor por 3 horas y finalmente cosechadas. Se midieron por western blot los niveles de p-Ser317 de CHK1, los niveles totales de p-(SQ/TQ) y de actina como control de carga. Se observa que el AZ20 previene la fosforilación de CHK1 en su serina 317, así como una disminución en los patrones globales de fosforilación en residuos SQ/TQ.

Una vez puesta a punto la concentración de inhibidor, se realizó el ensayo de SILAC seguido de inmunoprecipitación de p-(SQ/TQ) y análisis por espectrometría de masas. La estrategia de SILAC consiste en el marcado metabólico de proteínas mediante la incorporación de aminoácidos esenciales enriquecidos con isótopos estables durante el crecimiento celular. De esta manera, las proteínas sintetizadas en cada condición experimental presentan una firma isotópica distintiva *Light* (L) o *Heavy* (H), que permite *pool*ear los extractos proteicos antes de la inmunoprecipitación y luego analizarlos en un mismo ensayo de espectrometría de masas.

Este enfoque permite la cuantificación de la abundancia relativa de proteínas entre muestras de distintas condiciones, reduciendo la variabilidad técnica y permitiendo detectar cambios sutiles en la abundancia de las proteínas.

Para conocer los factores fosforilados por ATR en respuesta al UV, se realizaron por simplificado dos experimentos de SILAC en paralelo. En la Figura R21 se muestra una representación esquemática del diseño experimento utilizado:

- SILAC 1: Se comparó entre células Control (H) o irradiadas con UV (L). Al realizar la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti p-(SQ/TQ), este experimento permite identificar proteínas fosforiladas en residuos SQ/TQ en respuesta al UV.
- SILAC 2: Se comparó entre células irradiadas con UV y tratadas con inhibidor de ATR (H), y células irradiadas con UV pero sin inhibidor de ATR (L). Este experimento permite identificar proteínas cuya fosforilación en residuos SQ/TQ en células irradiadas con UV depende específicamente de ATR.

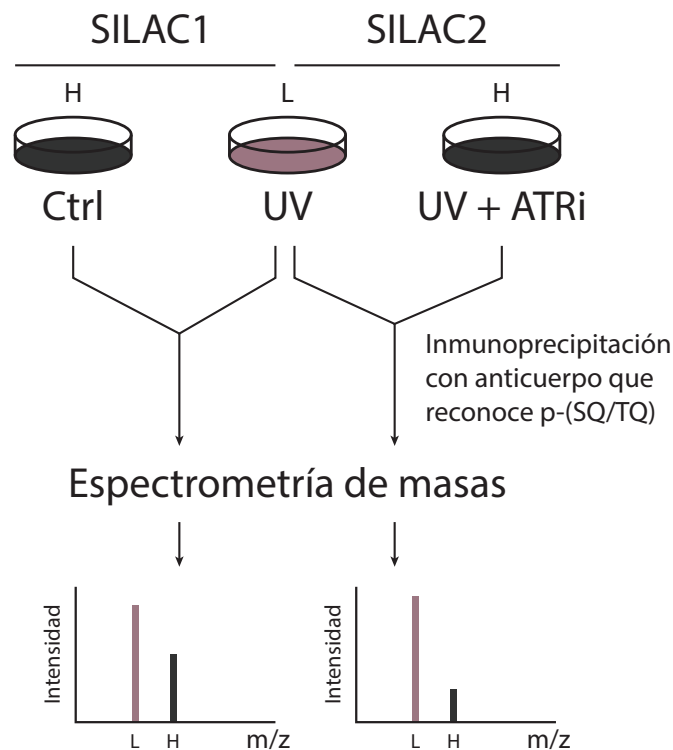


Figura R21: Esquema experimental utilizado para los experimentos de proteómica cuantitativa “SILAC-Proteomics”: Se representa esquemáticamente el diseño experimental utilizado. Para el SILAC1, las células no irradiadas fueron

crecidas con aminoácidos *Heavy* (H), mientras que las irradiadas con UV con aminoácidos *Light* (L). Para el SILAC2, las células irradiadas con UV y tratadas con AZ20 1 μ M (ATRi), fueron crecidas con aminoácidos *Heavy* (H), mientras que las células irradiadas con UV e incubadas con vehículo (DMSO), fueron crecidas con aminoácidos *Light* (L). Se utilizó el mismo extracto proteico de células irradiadas con UV (L), en ambos SILAC, para poder comparar entre ellos. Antes de realizar la inmunoprecipitación, los extractos proteicos H y L de cada SILAC fueron *pooleados* y finalmente los extractos inmunoprecipitados sometidos a análisis por espectrometría de masas. Este diseño experimental permite cuantificar diferencias relativas en la abundancia de las proteínas identificadas entre las condiciones de cada SILAC, así como comparar entre ambos experimentos de SILAC.

Para el SILAC1, se estableció un umbral a partir del cual la diferencia H/L resulta significativa, y consideramos positivas aquellas proteínas con una relación H/L baja, es decir, que se encuentran enriquecidas en las muestras tratadas con UV (L), respecto a las Control (H). Además, fueron curadas manualmente y consideradas positivas aquellas proteínas que no fueron identificadas en las células Control, pero sí fueron identificadas en las células irradiadas con UV. Estas proteínas no exhiben una relación H/L, y por lo tanto se definen como “ON-OFF”. De esta manera, se consideraron positivas sólo a las proteínas que son fosforiladas en SQ/TQ en respuesta al UV.

De manera análoga, en el SILAC2 se estableció un umbral a partir del cual la diferencia H/L resulta significativa y fueron consideradas positivas aquellas proteínas que presentan una relación H/L baja, es decir, que son más abundantes en la condición irradiada con UV en ausencia de inhibidor de ATR (L), respecto a irradiadas con UV en presencia del inhibidor de ATR (H). También fueron consideradas aquellas proteínas “ON-OFF” que no fueron identificadas en la condición UV + inhibidor de ATR, pero sí fueron identificadas en las células tratadas con UV en ausencia del inhibidor. De esta manera, se consideraron positivas a las proteínas que “dejan de estar fosforiladas” en presencia del inhibidor de ATR.

Dado que se utilizó el mismo extracto proteico de células irradiadas con UV (L), es posible comparar las diferencias en la relación H/L, así como la identificación “ON-OFF”, entre experimentos de SILAC. De esta manera, el solapamiento entre los factores considerados en el SILAC1 y el SILAC2 permite identificar proteínas fosforiladas en residuos SQ/TQ en respuesta al UV (SILAC1), cuya fosforilación depende específicamente de ATR (SILAC2). Resulta relevante destacar que usar el mismo extracto proteico de células irradiadas con UV y sin inhibidor de ATR (L) en los dos SILAC nos permite comparar entre ellos, pero representa una limitación metodológica dado que no contamos con una condición experimental que sea sin UV y con inhibidor de ATR.

De esta manera, los datos de cada SILAC fueron analizados de manera individual y luego solapados, para identificar exclusivamente los factores enriquecidos en la fracción UV (L) de ambos experimentos de SILAC en simultáneo. Los resultados obtenidos, tanto cuantitativamente (relación H/L), como cualitativamente (ON-OFF),

se muestran en la Tabla R1. Se observa que en el SILAC 1 (Ctrl-UV), todos los factores identificados luego del solapamiento son factores ON-OFF, es decir, que no estaban fosforilados en células sin irradiar, y se fosforilan en respuesta al UV. Para estos factores fosforilados en respuesta al UV identificados en el SILAC1, en el SILAC 2 se observa que la inhibición de ATR previene parcialmente su fosforilación, dado que la mayoría de estos factores presenta una disminución de la relación H/L, y sólo una porción minoritaria muestra ausencia completa en presencia del inhibidor (ON-FF).

Nombre del gen	SILAC 1			SILAC 2			1	2	3
	Relación H/L normalizada	Intensidad L (UV)	Intensidad H (Ctrl)	Relación H/L normalizada	Intensidad L (UV + DMSO)	Intensidad H (UV + AZ20)			
ACIN1	ON-OFF	463800000	0	-1,97835	135820000	14802000		✓	✓
MED13L	ON-OFF	138170000	0	-1,86659	77086000	9550700	✓		
POP1	ON-OFF	44475000	0	-1,83074	568240000	38776000	✓		
MED23	ON-OFF	450290000	0	-1,46578	140790000	34356000			
SEN3	ON-OFF	325870000	0	-1,45052	434000000	81045000			✓
MED6	ON-OFF	376500000	0	-1,44046	91641000	19771000			
PELP1	ON-OFF	71454000	0	-1,37083	144200000	39136000	✓		
NR2F2	ON-OFF	459230000	0	-1,30415	249850000	70342000			
RBM15	ON-OFF	13788000	0	-1,29917	19556000	3780000	✓		✓
SMARCC1	ON-OFF	15397000	0	-1,25453	10657000	1187700		✓	
MED1	ON-OFF	211030000	0	-1,24438	321740000	97262000	✓	✓	
MED14	ON-OFF	190990000	0	-1,19363	72687000	22693000			
MED15	ON-OFF	255330000	0	-1,12221	132320000	54388000			
LAS1L	ON-OFF	173980000	0	-1,11344	49952000	8935800			✓
MED4	ON-OFF	244900000	0	-1,09271	81433000	24673000			
NOL9	ON-OFF	247110000	0	-1,05781	53671000	14943000			✓
DKC1	ON-OFF	60909000	0	-1,0357	84846000	23812000			
CDK19	ON-OFF	185260000	0	-1,01045	183730000	61674000		✓	
SAP18	ON-OFF	77180000	0	-0,989306	72813000	23931000			
DST	ON-OFF	106480000	0	ON-OFF	697890000	0			✓
PIK3C2A	ON-OFF	13331000	0	ON-OFF	8343700	0			
AFF1	ON-OFF	927530	0	ON-OFF	3821700	0			
ZFP36L1	ON-OFF	8023000	0	ON-OFF	3665000	0			
MAGOH	ON-OFF	11076000	0	ON-OFF	2146100	0			✓
DCLRE1C	ON-OFF	54291000	0	ON-OFF	1771900	0			

Tabla R1. Factores identificados por “SILAC-Proteomics”: Se muestran los resultados del análisis del experimento de SILAC seguido de proteómica, identificados a partir del solapamiento de los resultados de los SILAC 1 y 2. En ambos experimentos se consideraron aquellos factores que se encuentran enriquecidos en la condición UV (L). Se observa que todos los factores identificados en el SILAC1 corresponden a factores “ON-OFF”, ya que no fueron identificados en el extracto Control (H). En el SILAC2, la mayoría de los factores identificados presenta una relación H/L normalizada negativa, lo cual indica que se encuentran enriquecidos en el extracto UV + DMSO (L), respecto a UV + AZ20 (H). El análisis y filtrado de los datos se describe en Materiales y Métodos, y fue realizado según (Kidiyoor et al., 2020). Las

columnas 1, 2 y 3 corresponden a los trabajos ([1]Matsuoka et al., 2007), ([2] Olsen et al., 2010) y ([3] Kidiyoor et al., 2020) respectivamente, y los *ticks* negros informan que los genes correspondientes fueron identificados en estos trabajos, al analizar fosforilaciones en sitios SQ/TQ. Se observa que múltiples subunidades del complejo Mediador (marcadas en **negrita**) son putativos sustratos de ATR, entre otros factores identificados.

Entre los factores identificados, se destacan múltiples subunidades del complejo Mediador (MED1, MED4, MED6, MED13L, MED14, MED15, MED23 y CDK19), así como factores de transcripción (NR2F2, AFF1), factores regulatorios asociados al *Exon Junction Complex* (MAGOH, ACIN1, SAP18), remodeladores de la cromatina (SMARCC1), entre otros. Estos resultados sugieren que efectivamente ATR está involucrado en la regulación transcripcional en respuesta al UV, ya sea a través de la regulación del inicio de la transcripción, la fosforilación del complejo Mediador, o a través de la regulación *per se* del proceso *splicing*.

Las tres columnas en la derecha de la Tabla R1 muestran factores identificados a través de ensayos de proteómica en células proliferativas, que fueron publicados por otros grupos de investigación y coinciden con los factores obtenidos por nuestro grupo. Notablemente, entre los factores concurrentes, se encuentran las subunidades del complejo Mediador MED1 y MED13L.

En la Figura R22 se generó una red de interacciones utilizando la base de datos STRING con los factores identificados en la Tabla R1 (Szkłarczyk et al., 2023). Se observan 4 *clusters* de interacción, siendo el *cluster* formado por las subunidades identificadas del complejo Mediador el de mayor tamaño. Varias de estas subunidades no poseen residuos SQ/TQ en su secuencia primaria, por lo que estos resultados sugieren que ATR fosforila selectivamente algunos de ellos, lo cual facilita a su vez la co-inmunoprecipitación del resto del complejo al utilizar anticuerpos anti p-(SQ/TQ).

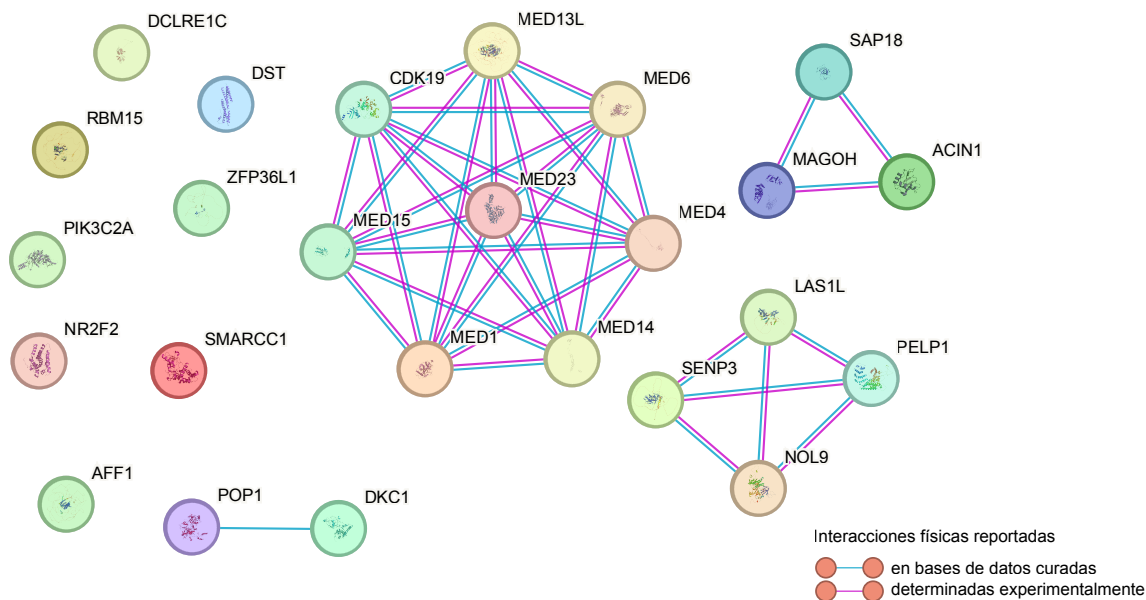


Figura R22. Red de interacciones de los factores identificados en la Tabla R1: Se utilizó la base de datos STRING (Szklarczyk et al., 2023) para realizar una red de interacciones de los factores identificados en el ensayo de *SILAC-Proteomics*. Los nodos representan los factores, mientras que las líneas que los conectan representan interacciones físicas reportadas, en bases de datos curadas tanto bibliográfica como experimentalmente (celeste), o determinadas puntualmente de manera experimental (rosa). Se observa que las subunidades del complejo Mediador forman un cluster de interacción, dado que forman parte del mismo complejo.

Identificación de factores fosforilados por ATR a través de proteómica cualitativa: *Shotgun-Proteomics*

Para validar los resultados obtenidos a través de la proteómica cuantitativa, decidimos realizar un nuevo ensayo de proteómica, al repetir un esquema experimental similar, pero esta vez realizando un análisis cualitativo de “*Shotgun-Proteomics*”, en donde simplemente detectamos factores “ON-OFF”, es decir, que se encuentran en una condición, pero no en otra.

En este ensayo utilizamos los inhibidores de ATR VE-822 y AZD6738, dos compuestos más modernos y selectivos hacia ATR en comparación con el AZ20, que además están siendo utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (Weber and Ryan, 2015). Como ya se mencionó, dada la falta de expresión de CHK1 en células arrestadas en G1 analizamos el efecto de los inhibidores en la activación de ATR utilizando células proliferativas, y luego utilizamos la concentración elegida de cada inhibidor en las células arrestadas en G1. Para ello, incubamos células HaCaT WT con dosis crecientes de cada inhibidor durante 1 hora, irradiamos las células

y las cosechamos 3 horas más tarde. En la Figura R23 se muestran ensayos de western blot utilizando anticuerpos que reconocen la fosforilación en el residuo Serina 345 de CHK1, la fosforilación en el residuo Treonina 1989 de ATR y los patrones globales de p-(SQ/TQ). Se observa que tanto el VE-822 (5 μ M) como el AZD6738 (2 μ M) previenen de manera similar la fosforilación de CHK1 en su Serina 345 en respuesta al UV, por lo que decidimos utilizar estas concentraciones en los ensayos posteriores. El compuesto AZD6738 es el inhibidor de ATR más moderno de los que hemos utilizado, y su alta especificidad hacia ATR se puede observar dado que, si bien previene la fosforilación de CHK1 en su Serina 345, modula parcialmente los patrones globales de p-(SQ/TQ). En cambio, el compuesto VE-822 exhibe una prevención mucho mayor de los patrones globales de p-(SQ/TQ). Dado que los residuos SQ/TQ también son fosforilados por otras quinasas de la DDR, estos resultados confirman la alta especificidad del compuesto AZD6738 hacia ATR. Por último, resulta relevante destacar que, si bien los inhibidores previenen la auto-fosforilación del residuo T1989 de ATR, se observa una fosforilación basal que genera que la inducción en respuesta al UV resulte muy sutil, y por lo tanto no resulte un buen indicador de la inhibición de ATR.

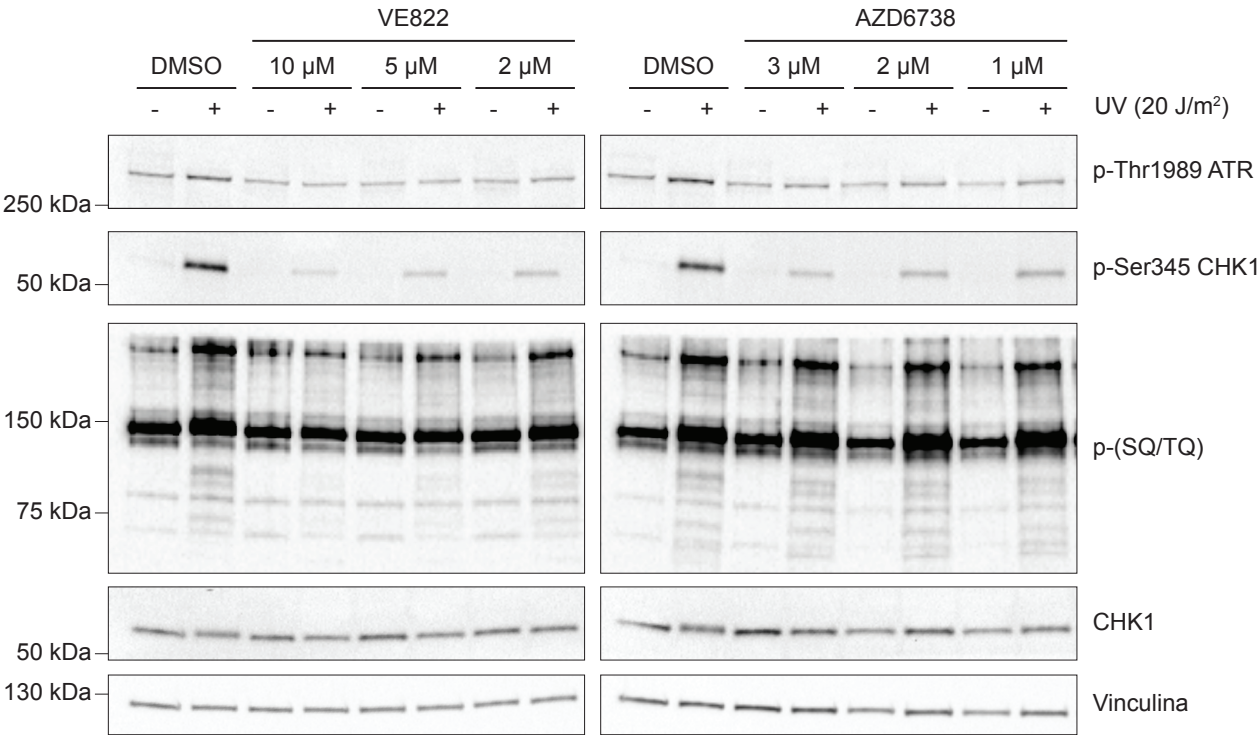


Figura R23. Los inhibidores VE-822 y AZD6738 previenen la activación de ATR: Células HaCaT WT en activa proliferación fueron pre-incubadas durante 1 hora con las concentraciones indicadas de VE-822 y AZD6738, irradiadas con UV (20 J/m²), incubadas luego en presencia de inhibidor por 3 horas y finalmente cosechadas. Se midieron por western blot los niveles de CHK1 p-Ser345, los niveles totales de CHK1, los niveles de p-(SQ/TQ), los niveles de ATR p-

T1989 y de Vinculina como control de carga. Se observa que los inhibidores VE-822 y AZD6738 previenen la fosforilación de CHK1 en su serina 345, así como de ATR en su T1989. El inhibidor VE-822 previene cambios en los patrones globales de p(SQ/TQ), mientras que el inhibidor AZD6738 lo hace parcialmente, confirmando su mayor especificidad por ATR.

Una vez puesta a punto la concentración de ambos inhibidores, realizamos el ensayo de proteómica cualitativa. Para ello, utilizamos el esquema experimental que se muestra más abajo (Figura R24), que consiste en el pre-tratamiento durante 1 hora con cada uno de los inhibidores de ATR (VE-822 (5 μ M) o AZD6738 (2 μ M)), la irradiación con luz UV (20 J/m²) y el cosechado de las células 3 h más tarde. Los extractos proteicos obtenidos se utilizaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación con anti-p-(SQ/TQ) y posterior análisis por espectrometría de masas.

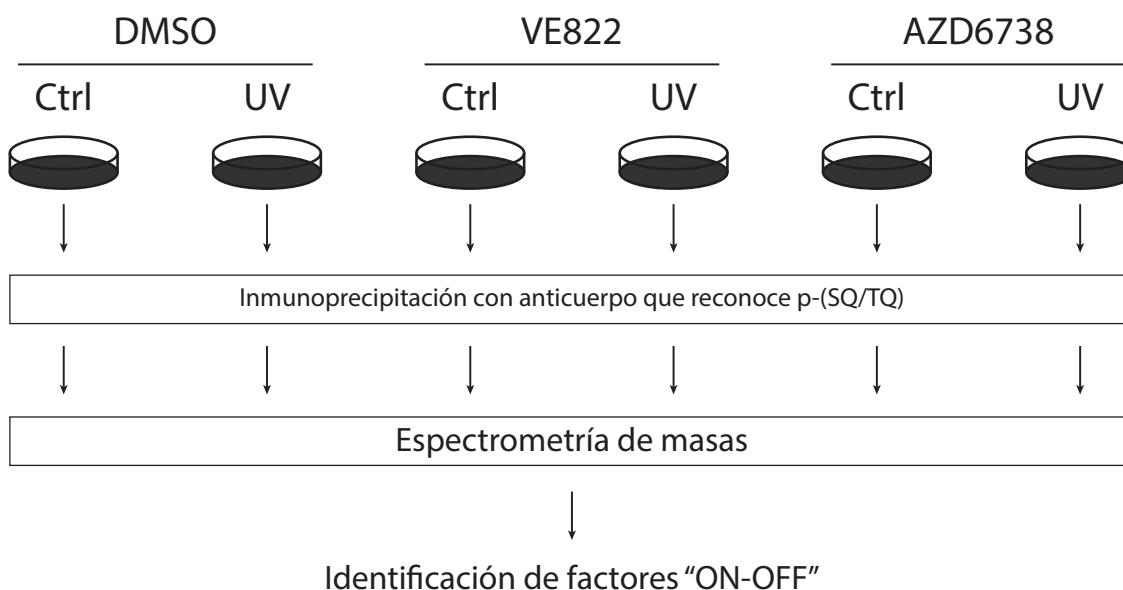


Figura R24. Esquema experimental utilizado para los experimentos de proteómica cualitativa “Shotgun-Proteomics”: Se representa esquemáticamente el diseño experimental utilizado para el ensayo de proteómica cualitativa. Para la identificación de factores fosforilados por ATR en respuesta al UV, se utilizó un esquema similar al mostrado en la Figura R22. Células HaCaT WT arrestadas en G1 se pre-incubaron durante 1 hora con AZD6738 (2 μ M) y VE-822 (5 μ M), irradiadas con 20 J/m² de UV, incubadas luego en presencia de cada inhibidor por 3 horas y finalmente cosechadas para realizar inmunoprecipitaciones utilizando un anticuerpo que reconoce la secuencia consenso de ATR fosforilada (p-(SQ/TQ)). Finalmente, los extractos inmunoprecipitados fueron inyectados secuencialmente en un espectrómetro de masas para la identificación de los factores obtenidos en cada condición experimental.

Al igual que para el experimento de *SILAC-Proteomics*, consideramos como positivos a aquellos factores identificados únicamente en células irradiadas con UV, y no en células sin irradiar o irradiadas en presencia de los inhibidores de ATR. De esta manera, podemos identificar factores que son fosforilados en SQ/TQ en respuesta al UV de manera específica por ATR. Gracias al desarrollo de los métodos de proteómica en los últimos años, ya

no resulta necesario realizar el marcado metabólico de las proteínas a través de SILAC para poder estimar cuantitativamente diferencias en la abundancia relativa de las proteínas identificadas en cada condición. Sin embargo, dado que el experimento fue realizado por simplificado, sólo podemos ser lo más restrictivos posibles en el análisis, analizando cualitativamente los factores “ON-OFF”.

En la Figura R25.A se listan los factores fosforilados por ATR en respuesta al UV en células arrestadas en G1, mientras que la Figura R25.B muestra la red de interacciones de los factores identificados. Notablemente, se observa nuevamente que el *cluster* de mayor tamaño identificado corresponde a subunidades del complejo Mediador, por lo que estos resultados apoyan fuertemente el rol de ATR en la fosforilación de este complejo. Al igual que en la proteómica cualitativa, muchos de estos factores fueron identificados en ensayos de proteómica publicados por otros grupos, destacándose nuevamente la subunidad MED1. Remarcamos que no todos los factores identificados poseen sitios SQ/TQ en su secuencia primaria, por lo que no podemos descartar que ATR fosforile otras secuencias no canónicas también reconocidas por el anticuerpo anti p-(SQ/TQ), que haya fosforilaciones indirectas o bien que algunos de estos factores co-inmunoprecipiten.

Por último, es importante destacar que las queratinas son uno de los contaminantes más comunes en los ensayos de espectrometría de masas. Sin embargo, el *cluster* de queratinas observado en la Figura R25 no debe confundirse con un contaminante, dado que las HaCaT son derivados de queratinocitos humanos y expresan una gran cantidad de queratinas que regulan su diferenciación (Colombo et al., 2017). Las proteínas que se unen inespecíficamente a los anticuerpos o a las *beads* magnéticas durante la inmunoprecipitación son luego filtradas en el análisis de los datos, por lo que este resultado sugiere que ATR fosforila diversas queratinas en respuesta al UV, y probablemente cumpla un rol regulatorio del estado de diferenciación de las HaCaT.

A

Factores "ON-OFF" <i>Shotgun-Proteomics</i>	
AFF4	MED24
BAG2	MED4
CAV2	MLL1
CCNC	MRPS12
CLK3	MRT04
CMAS	MTA2
DAP3	NCBP2
DCD	NPM3
DSTN	NR2F2
EXOSC7	POLR3B
KDM1B	RFWD3
KRT31	RPL7L1
KRT32	RPSS
KRT34	SEN3
KRT35	SUZ12
KRT36	TKT
KRT38	VIRMA
KRT85	WDR18
LYZ	WDR82
MED1	WTAP
MED14	ZC3H14
MED16	ZMYND8
MED17	ZNF592
MED23	ZNF687

B

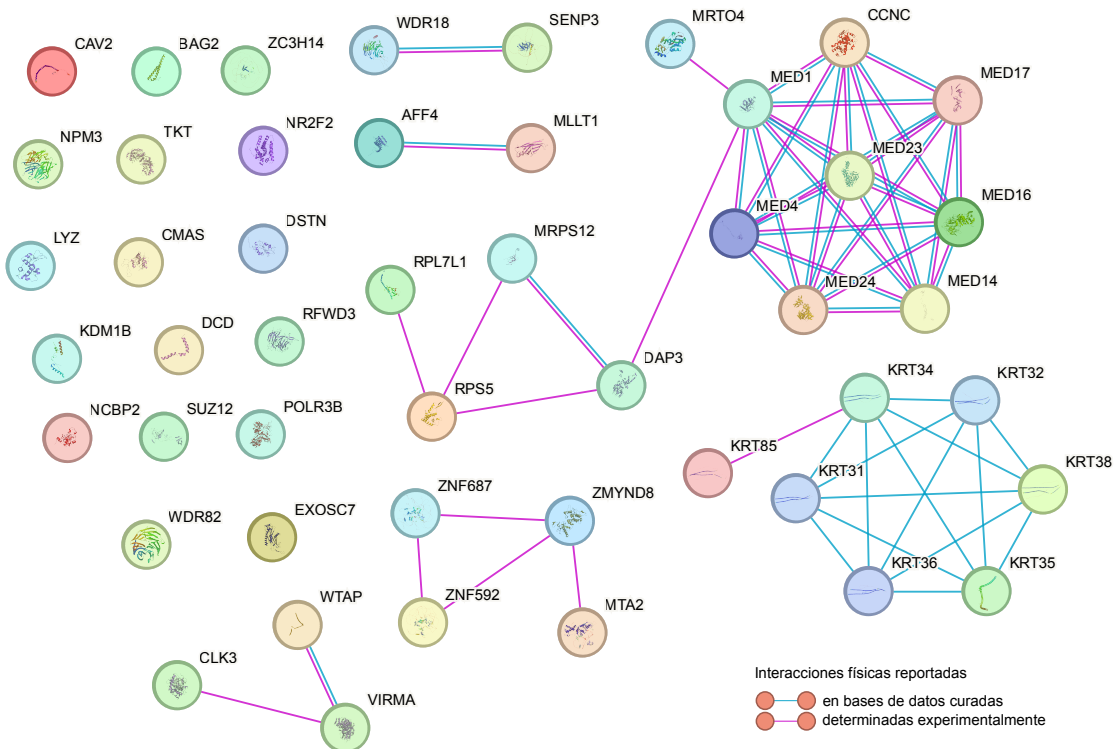


Figura R25. Factores identificados por “Shotgun-Proteomics”: (A) Se muestra la lista de factores identificados en el ensayo de “Shotgun-Proteomics”. Fueron considerados positivos aquellos factores que se identificaron en respuesta al UV, pero la inhibición de ATR con los dos inhibidores previno su identificación (Factores “ON-OFF”). (B) Red de interacciones generada a partir de los factores listados en (A). La red de interacción se realizó igual que en la Figura R23. Se identifican múltiples subunidades del complejo Mediador (marcadas en **negrita**) fosforiladas por ATR en respuesta al UV.

ATR fosforila al complejo Mediador en respuesta al UV

A pesar de que el ensayo de *SILAC-Proteomics* fue realizado experimentalmente por el director de esta tesis, y el ensayo de *Shotgun-Proteomics* por el propio autor, y de que ambos experimentos se llevaron a cabo con cinco años de diferencia utilizando un total de tres inhibidores distintos de ATR, los resultados convergen de forma contundente: ATR fosforila múltiples subunidades del complejo Mediador, así como diversos factores de transcripción (Tabla R1, Figura R22, y Figura R25).

A partir de los datos obtenidos en los dos ensayos de proteómica, realizamos el solapamos de los factores identificados en cada uno de ellos y obtuvimos la lista de factores que se ilustra en la Figura R26. A excepción de MED4, todos los factores identificados poseen sitios SQ/TQ en su secuencia primaria, lo cual sugiere fuertemente

que estos factores son efectivamente fosforilados por ATR. Sin embargo, el hecho de que MED4 sea identificado a pesar de no poseer sitios SQ/TQ en su secuencia primaria no nos permite descartar que este factor co-inmunoprecipite con el resto de las subunidades fosforiladas. Como ya discutimos, esto también podría deberse a que ATR pueda fosforilar otras secuencias en MED4, que también serían reconocidas por el anticuerpo anti p-(SQ/TQ).

Para comprender en mayor profundidad estos resultados, realizamos un análisis detallado de la secuencia aminoacídica de las subunidades identificadas luego del solapamiento de los resultados obtenidos a partir de los dos ensayos de proteómica. Evaluamos la cantidad de sitios SQ/TQ presentes, la posibilidad de que sean fosforilados según el predictor NetPhos3.1 (Blom et al., 1999) y cuantos de estos sitios han sido previamente identificados en ensayos de inmunoprecipitación usando anticuerpos p-(SQ/TQ) seguido de espectrometría de masas según la base de datos phosphosite.org (Hornbeck et al., 2015). MED1 posee 19 sitios SQ/TQ, de los cuales 15 podrían ser fosforilados, y 13 han sido identificados en otros ensayos. MED14 posee 11 sitios SQ/TQ, de los cuales 3 podrían ser fosforilados y 1 ha sido reportado. MED23 posee 8 sitios, de los cuales 5 podrían ser fosforilados y ninguno ha sido identificado previamente. SENP3 posee 6 sitios SQ/TQ, todos podrían ser fosforilados y ninguno ha sido reportado previamente. Lo mismo ocurre con NR2F2, que posee 7 sitios SQ/TQ, todos potencialmente fosforilables y ninguno reportado. Como ya mencionamos, MED4 no posee sitios SQ/TQ en su secuencia primaria.

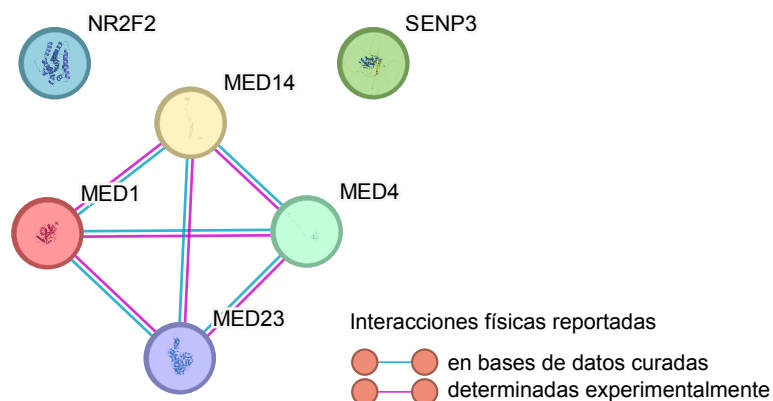


Figura R26. Factores identificados consistentemente en ambos ensayos de proteómica: Red de interacciones generada de igual manera que en las Figuras R23 y R26.B. Se muestran los factores identificados consistentemente en ambos ensayos de proteómica: *SILAC-Proteomics* (Tabla R1 y Figura R23) y *Shotgun-Proteomics* (Figura R26). Se observa que las subunidades MED1, MED4, MED14 y MED23 forman una red de interacción, dado que son subunidades del complejo Mediador. El factor NR2F2 y la sumoproteasa SENP3 también fueron identificados en los dos ensayos experimentales. Estos resultados sugieren que ATR fosforila los factores mostrados en respuesta al UV en células arrestadas en G1.

ATR fosforila al complejo Mediador: validación por western blot

Los resultados obtenidos a través de los dos ensayos de proteómica sugieren que ATR fosforila las subunidades MED1, MED14 y MED23, y potencialmente MED4. Si bien existen algunas fosforilaciones reportadas en sitios SQ/TQ en MED1, no existen anticuerpos comerciales que detecten fosforilaciones en estas subunidades del complejo Mediador. De esta manera, en los trabajos que estudian estas fosforilaciones se utilizan anticuerpos caseros o diseñados a pedido por empresas especializadas. Por lo tanto, para validar los resultados obtenidos en los ensayos de proteómica, realizamos inmunoprecipitaciones con el anticuerpo p-(SQ/TQ) y detectamos por western blot la inmunoprecipitación de las subunidades MED1, MED4 y MED23 del complejo Mediador. Para ello, pre-incubamos células HaCaT WT arrestadas en G1 con el inhibidor AZD6738 durante 1 hora, irradiamos las células con UV 20 J/m² y las incubamos por 3 horas más en presencia del inhibidor de ATR. Finalmente, las células fueron cosechadas y los extractos proteicos utilizados para realizar inmunoprecipitaciones. En la Figura R27 se observa que MED1, MED4 y MED23 inmunoprecipitan en respuesta al UV, y esto se ve prevenido en presencia del inhibidor de ATR.

De esta manera, estos resultados sugieren que ATR modula la respuesta transcripcional en respuesta al UV a través de la fosforilación de, al menos, las subunidades MED1 y MED23 del complejo Mediador; mientras que la subunidad MED4 presumiblemente co-inmunoprecipite consistentemente o sea fosforilada en un sitio no-canónico. A diferencia de estas subunidades, se observa que la proteína HSP90 no es identificada, y funciona como control de especificidad de la inmunoprecipitación y el rol de ATR en la fosforilación de sitios (SQ/TQ).

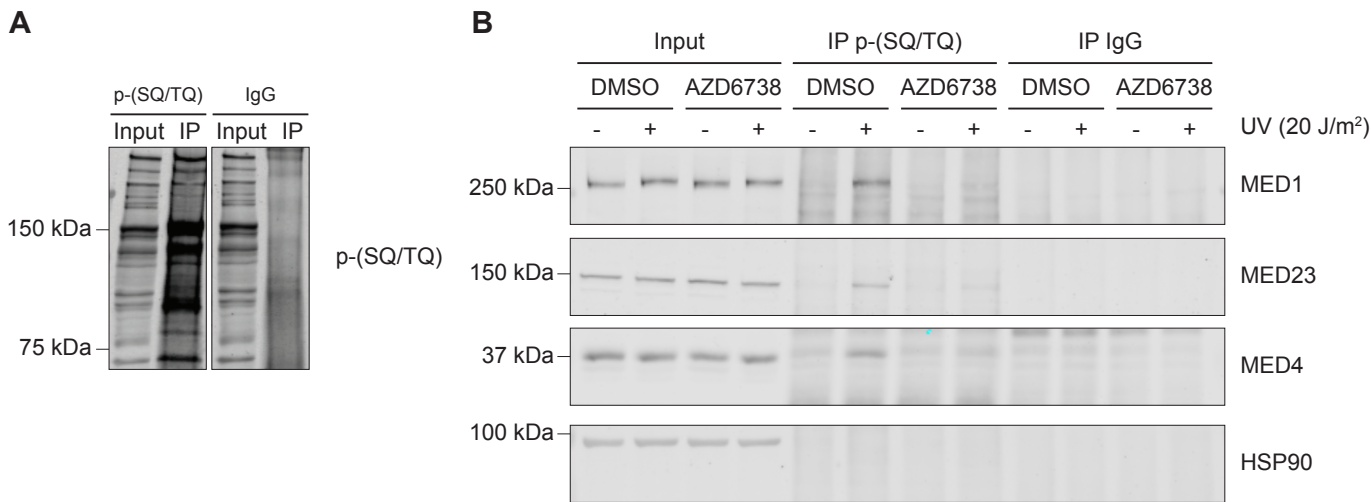


Figura R27. Validación por western blot de los ensayos de proteómica: (A) Extractos proteicos de células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron utilizados para ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti p-(SQ/TQ), o IgG Normal

(control de isotipo). Los extractos inmunoprecipitados fueron analizados por western blot utilizando el mismo anticuerpo anti p-(SQ/TQ) para confirmar la inmunoprecipitación. (B) Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron pre-incubadas durante 1 hora con AZD6738 2 μ M, irradiadas 20 J/m² de UVC y cosechadas 3 horas más tarde. Se realizó la inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti p-(SQ/TQ) o IgG normal como control y se midió por western blot la presencia de MED1, MED4, MED23, y HSP90 como control de especificidad. Se observa que los factores MED1, MED4 y MED23 son inmunoprecipitados con el anticuerpo anti p-(SQ/TQ) en respuesta al UV, y esto es prevenido en presencia del inhibidor de ATR AZD6738.

El sistema NER está involucrado en la activación de ATR y la fosforilación del complejo Mediador

Los resultados hasta aquí presentados muestran que las subunidades MED1, MED4 y MED23 inmunoprecipitan de manera dependiente de ATR en respuesta al UV. Considerando que durante la reparación del daño por el sistema NER se expone ssDNA, decidimos evaluar el rol de este sistema de reparación en la activación de ATR en ausencia de estrés replicativo. Para ello, repetimos los ensayos de inmunoprecipitación de p-(SQ/TQ) seguido de western blot, pero esta vez utilizando células arrestadas en G1 tanto WT como deficientes en el reconocimiento de lesiones por GG-NER (dKO XPC-DDB2). Al igual que en la Figura R27, en la Figura R28 se observa nuevamente que en células WT, MED1, MED4 y MED23 inmunoprecipitan en respuesta al UV y esto es prevenido en presencia del inhibidor de ATR. En cambio, en células dKO, la inmunoprecipitación de MED1, MED4 y MED23 se encuentra prevenida parcialmente en respuesta al UV, y la inhibición de ATR la previene por completo. Nuestros resultados confirman que ATR es activada en respuesta al UV, por fuera de fase S, en un mecanismo que depende del sistema NER y favorece la fosforilación de subunidades del complejo Mediador. Sin embargo, el hecho de que la inmunoprecipitación de estas subunidades del complejo Mediador se prevenga parcialmente en células dKO XPC/DDB2 no nos permite descartar que otros mecanismos estén involucrados en su activación. En la Sección 2 de Discusión profundizaremos en posibles mecanismos complementarios al sistema NER que pueden activar ATR en ausencia de estrés replicativo.

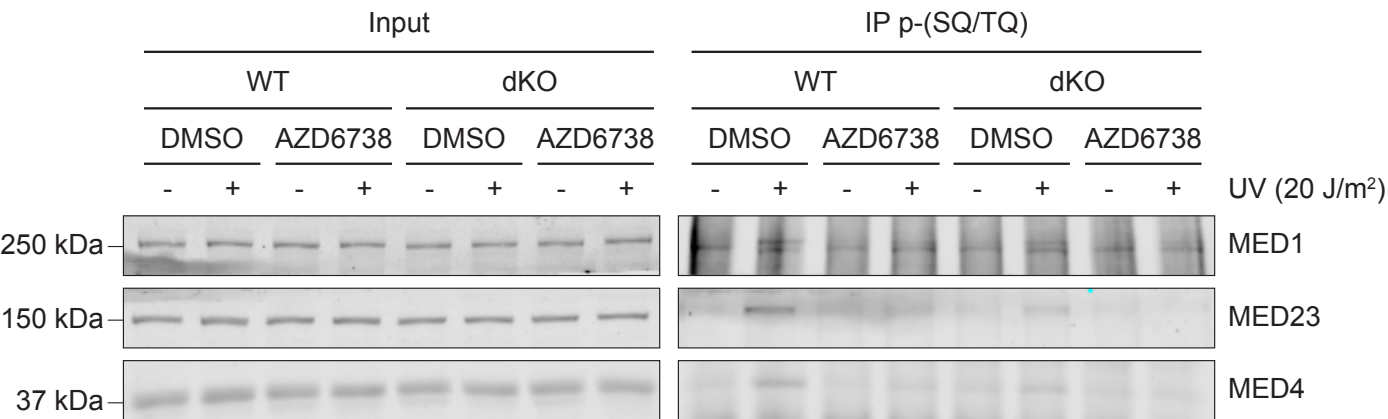


Figura R28. Deficiencias en el sistema GG-NER previenen parcialmente la inmunoprecipitación dependiente de ATR de las subunidades MED1, MED4 y MED23 en respuesta al UV: Células HaCaT WT o dKO XPC-DDB2 (dKO) arrestadas en G1 fueron pre-incubadas durante 1 hora con AZD6738 2 μ M, irradiadas con 20J/m² de luz UV y cosechadas 3 horas más tarde. Se realizó la inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti p-(SQ/TQ) y se midió por western blot la presencia de MED1, MED23 y MED4. Se observa que los factores MED1, MED23 y MED4 son inmunoprecipitados con el anticuerpo anti p-(SQ/TQ) en respuesta al UV en células WT, mientras que en células dKO este efecto está prevenido parcialmente. El inhibidor de ATR AZD6738 previene totalmente la inmunoprecipitación de los factores mencionados en ambas líneas celulares.

ATR modula la inducción de genes de respuesta a estrés

Hasta aquí, nuestros resultados sugieren que, en respuesta a la irradiación con UV, ATR fosforila de diversas subunidades del complejo Mediador, conocido regulador de la expresión génica. Para comprender el impacto de ATR en la regulación transcripcional, realizamos un ensayo de secuenciación global de ARN asociado a la cromatina utilizando células HaCaT WT arrestadas en G1 e irradiadas tanto en presencia como ausencia del inhibidor AZD6738. El análisis de ARN asociado a la cromatina nos permite conocer la abundancia de ARNs nacientes, tanto procesados como no procesados (Nojima et al., 2015). Para ello, pre-incubamos células HaCaT WT arrestadas en G1 con AZD6738 durante 1 hora, irradiamos las células con 20 J/m² de UV y las cosechamos 3 horas más tarde para la purificación, primero de la fracción cromatínica y luego de los ARNs asociados a ella. Actualmente nos encontramos analizando los datos globales ya generados, aunque, sin embargo, podemos comentar de manera preliminar sobre algunos genes individuales. CXCL8 y EGR1 son dos genes de respuesta a estrés cuya expresión aumenta en respuesta al UV, mientras que JAG1 es un gen cuya expresión se reprime en respuesta al UV. Estos genes fueron seleccionados a partir de un análisis bibliográfico y nos resultan relevantes por su regulación en respuesta al UV, y no necesariamente por el rol que cumple la proteína para la cual codifican. Además del ensayo de secuenciación, analizamos estos mismos tres genes de manera individual, a través de ensayos de RT-qPCR, siguiendo el mismo protocolo experimental que para el análisis global por secuenciación.

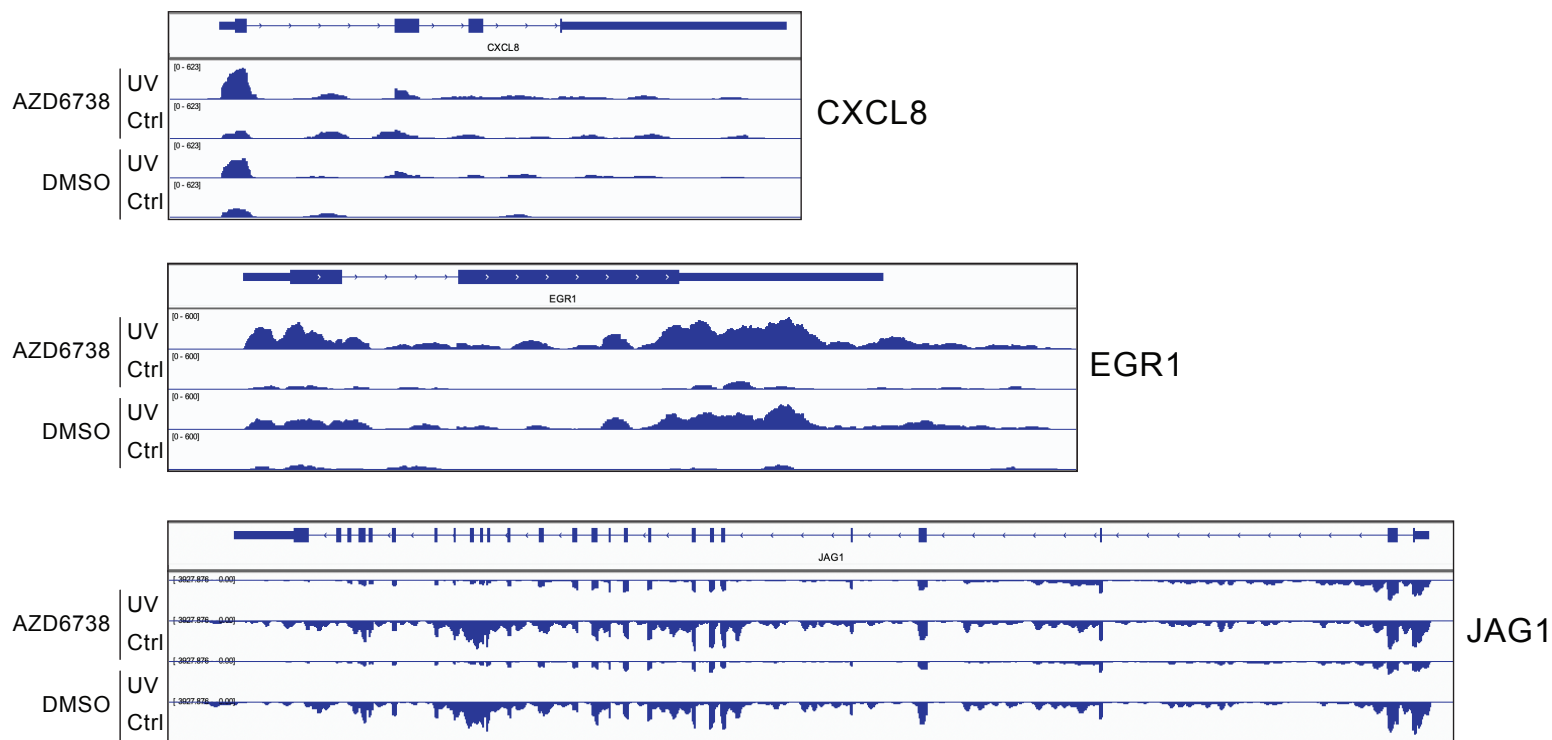


Figura R29. La inhibición de ATR aumenta la expresión de genes de respuesta a UV, pero no de genes cuya expresión se reprime: Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron pre-incubadas con AZD6738 2 μ M durante 1 hora, irradiadas con 20 J/m² de UV y cosechadas 3 horas más tarde para la purificación secuencial de cromatina y ARN, con el objetivo de obtener ARNs asociados a la cromatina. Luego, se realizó la secuenciación del ARN y las lecturas obtenidas fueron alineadas al genoma humano de referencia. Se muestra la distribución de lecturas para los genes de respuesta a estrés EGR1 y CXCL8, y del gen JAG1, cuya expresión se reprime por UV. El eje Y representa el número de lecturas por millón de lecturas mapeadas. Se observa que tanto CXCL8 como EGR1 aumentan su expresión en respuesta al UV, y la inhibición de ATR exacerba este efecto. En cambio, JAG1 muestra una disminución de los niveles de ARN en respuesta al UV, y el inhibidor de ATR no modula esta respuesta.

Genes de respuesta temprana (IEGs)

Gen sujeto al apagado transcripcional

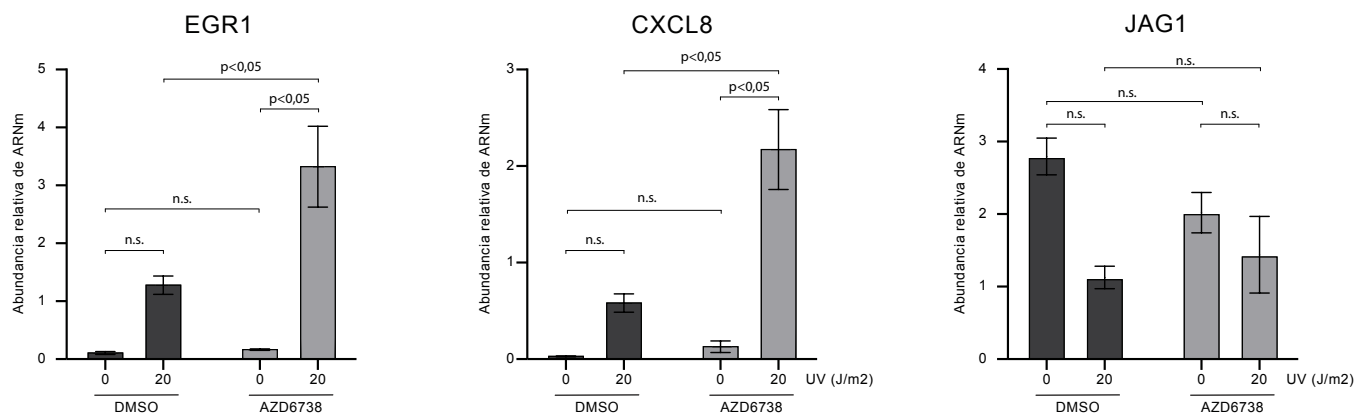


Figura R30. La inhibición de ATR aumenta la expresión de genes de respuesta a UV, pero no de genes cuya expresión se reprime: Células HaCaT WT arrestadas en G1 fueron tratadas en las mismas condiciones que en la Figura R29 y cosechadas para la purificación de ARN total. Se realizó RT-qPCR para medir los niveles de ARN mensajero maduro de los genes EGR1, CXCL8 y JAG1. Los niveles de ARN mensajero fueron relativizados al *housekeeping* U6, medido de la misma manera. Se muestra la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) de la abundancia relativa de cada gen a U6 de dos experimentos independientes. Los p-valores fueron calculados por ANOVA de dos vías. Se observa que la inhibición de ATR exacerba el efecto del UV en genes de respuesta a estrés, mientras que no modula la expresión del JAG1, cuya expresión disminuye en respuesta al UV.

En las Figuras R29 y R30 se observa, a través de dos técnicas independientes, que CXCL8 y EGR1 aumentan su expresión en respuesta al UV, y la inhibición de ATR induce un aumento (Figura R30) en la expresión de estos genes específicamente en respuesta al UV. En cambio, JAG1 disminuye su expresión en respuesta al UV, y la inhibición de ATR no modula este cambio. Estos resultados sugieren que ATR permite la inducción específica de genes de respuesta a estrés, pero de manera controlada, evitando una sobre expresión que pueda resultar deletérea en un contexto de estrés genotóxico.

En esta sección hemos presentado resultados que demuestran que, en respuesta al daño en el ADN inducido por la luz UV, el procesamiento de las lesiones por el sistema NER estimula la activación de la quinasa ATR, que fosforila diversas subunidades del complejo Mediador. Si bien no hemos dilucidado el mecanismo subyacente, estos resultados sugieren que la fosforilación del Mediador por ATR modula la respuesta transcripcional ante el daño en el ADN, previniendo la sobre-expresión de genes de respuesta a estrés. En la Sección 2 de Discusión, analizaremos los mecanismos posibles que explican estos resultados, así como su relevancia en términos del impacto en la supervivencia celular.

Discusión

Sección 1: Rol del sistema NER en la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN

Durante más de 20 años se pensó que el único mecanismo posible de degradación de RPB1 era el llamado “último recurso”, en donde la subunidad RPB1 de una RNAPII frenada en una lesión es degradada para permitir la reparación del daño por el sistema NER. Sin embargo, en los últimos 5 años fueron publicados decenas de trabajos que desafían esta visión reducida de una situación considerablemente más compleja. En esta tesis doctoral identificamos un mecanismo de control de la abundancia de RPB1 que depende de la reparación por el sistema NER, y dirige moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas para su degradación. En este contexto, hemos mostrado que la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN no es un paso estrictamente necesario para la reparación, sino que está involucrada en el control de la actividad de la RNAPII y la expresión génica ante el daño al ADN. De esta manera, mayores niveles de daño en el ADN implican mayores niveles de reparación y por lo tanto menores niveles de RPB1, facilitando la represión global de la transcripción. En esta sección discutiremos las implicancias de nuestros resultados, en el marco de la creciente bibliografía que explora la modulación de los niveles proteicos de RPB1.

Los niveles de RPB1 son controlados secuencialmente por el sistema NER: a tiempos cortos por TC-NER y a tiempos largos por GG-NER

La reparación por el sistema NER regula secuencialmente la degradación de RPB1. En las primeras horas luego del daño en el ADN inducido por la irradiación con UV, una RNAPII en activa elongación que se encuentra con la lesión representa el primer paso en el reconocimiento del daño por el sistema TC-NER. Esta situación favorece el reclutamiento de factores específicos, como CSA y CSB, que favorecen la ubiquitinación de la subunidad RPB1 de la RNAPII frenada. Si bien esta ubiquitinación cumple un rol en la modulación de la reparación, que no fue evaluado en esta tesis, la ubiquitinación de RPB1 estimulada por CSB y CSA también favorece la degradación de RPB1. De esta manera, en la Figuras R2 y R6 se observa una disminución en los niveles de RPB1 3 horas luego de la irradiación, y esta disminución es prevenida en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 (Figura R2). Además, en la Figura R6.B se observa una disminución de los niveles totales de RPB1 en células tratadas con Illudin S, una agente alquilante del ADN que induce exclusivamente la activación del sistema TC-NER. Más aún, en la Figura R9 se observa que el KD de CSA y CSB previene la degradación de RPB1 3 horas luego de la irradiación.

De esta manera, a tiempos cortos luego de la irradiación, el sistema TC-NER es mayormente responsable por la degradación de la subunidad RPB1 de la RNAPII frenada en el daño a través de las subunidades CSA y CSB.

El sistema TC-NER reconoce y repara un gran porcentaje del daño en la hebra molde de los genes unas 3 horas luego de la irradiación (Nakazawa et al., 2020) y 8 horas más tarde la reparación es casi total (Hu et al., 2017, 2015). En cambio, el sistema GG-NER reconoce el daño en el ADN a través de los factores XPC y DDB2 durante períodos de tiempo mucho mayores, que pueden ser incluso mayores que el tiempo de duplicación de la célula (Yurchenko et al., 2023). Para evaluar el rol del sistema GG-NER en la degradación de RPB1, generamos células doble KO XPC/DDB2 (Figuras R3 y R4). Utilizando estas células deficientes en el reconocimiento por GG-NER, observamos que, a tiempos cortos luego de la irradiación, la degradación de RPB1 es similar a la de células WT (Figura R6.A). Más aún, el tratamiento con Illudin S de células dKO XPC/DDB2 exhibe los mismos niveles de degradación que los observados en células WT (Figura R6.B). Estos resultados confirman que, a diferencia de TC-NER, GG-NER no cumple un rol destacable en la degradación de RPB1 a tiempos cortos. Sin embargo, a tiempos más largos la situación es completamente diferente. 12 horas luego de la inducción del daño, cuando el sistema TC-NER ya no se encuentra activo, células doble KO XPC/DDB2 exhiben una marcada prevención en la disminución de los niveles de RPB1 (Figura R7) y, de la misma manera, tanto los KO individuales de XPC y DDB2, como el KD de estos factores, exhiben un comportamiento similar (Figura R8). Si además consideramos que el KD de los factores de TC-NER, CSA y CSB, no tiene un efecto en la degradación de RPB1 a tiempos largos después de la irradiación (Figura R9), estos resultados sugieren fuertemente que el reconocimiento del daño por el sistema GG-NER es responsable de la degradación de RPB1 cuando TC-NER ya no se encuentra activo. De esta manera, proponemos un modelo secuencial del control de la degradación de RPB1, en el cual a tiempos cortos TC-NER es responsable de la degradación de RPB1, mientras que a tiempos más largos el sistema GG-NER continúa activo y es responsable de su degradación.

El proceso de reparación señala la degradación de RPB1

El hecho de que no haya moléculas de RPB1 involucradas en el reconocimiento del daño por GG-NER, abre el interrogante respecto a cuál es el mecanismo que señala para su degradación. A través de la utilización de diversas estrategias genéticas y farmacológicas, demostramos que el procesamiento del daño por los factores de reparación comunes a ambas vías de reconocimiento es responsable de esta señalización. En la Figura R10 y R11 mostramos que células XPA KO y KD exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos luego de la irradiación, que depende del proteasoma. De la misma manera, en la Figura R12 mostramos que células en las

cuales se indujo el KD farmacológico de XPB, también exhiben una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos luego de la irradiación. Finalmente, en la Figura R13 mostramos que el KD de XPA, XPD, XPF y XPG, así como la inhibición de la síntesis del ADN a través del tratamiento con afidicolina, induce una hiperdegradación de RPB1 a tiempos largos luego de la irradiación. En consecuencia, proponemos que el proceso de reparación del daño induce la activación de una cascada de señalización responsable de la degradación de RPB1. De esta manera, en células dKO XPC/DDB2 en las que el daño no es reconocido la degradación se encuentra prevenida. En cambio, en células en las que el daño es reconocido, pero el proceso de reparación no se puede completar, debe necesariamente existir una sobre-activación de la señal que estimula la degradación de RPB1, y por eso observamos una marcada hiperdegradación en células deficientes para XPA, XPB, XPD, XPF, XPG y la síntesis de ADN.

Considerando que el proceso de reparación contempla helicasas, endonucleasas y la exposición de ssDNA, resulta lógico pensar que las quinasas de la DDR, ATR, ATM y DNA-PK, podrían ser responsables de señalar la degradación de RPB1. Sin embargo, en la Figura R14 mostramos que la inhibición de estas quinasas no previene la degradación de RPB1 a tiempos largos luego de la irradiación. Si bien no hemos podido dilucidar cual es la señal que induce la degradación de RPB1, es posible hipotetizar una gran diversidad de mecanismos que podrían ser responsables de señalar la degradación de RPB1. Por ejemplo, podría ser posible que la señal involucre topoisomerasas que liberan el estrés topológico en el ADN asociado al proceso de reparación, aunque resulta improbable pensar que estos mecanismos no involucren a las quinasas de la DDR. Por otro lado, también podría ser posible que cambios estructurales en TFIIH sean responsables de la señalización. Dado que TFIIH se disocia de su módulo CAK cuando se une al daño en el ADN, pero este módulo resulta crucial para estimular el inicio de la transcripción, quizás un desbalance en la asociación de TFIIH al módulo CAK sea el responsable de la señalización. Sea cual sea el caso, nuestros resultados sugieren claramente que la exposición prolongada de intermediarios de reparación, producto de deficiencias en los factores responsables de la reparación, inducen una hiperdegradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN. De esta manera, identificar la señal resulta indispensable para dilucidar el mecanismo de manera completa, por lo que resulta un tema relevante para investigaciones futuras.

Degradación *in cis* vs *in trans* de RPB1

Como ya hemos discutido, nuestros resultados apoyan un modelo en el cual el sistema NER controla secuencialmente la degradación de RPB1. A tiempos cortos, TC-NER estimula la degradación *in cis* de la

subunidad RPB1 de una RNAPII frenada en una lesión. En cambio, a tiempos más largos, el reconocimiento del daño por el sistema GG-NER estimula la reparación, lo cual a su vez señala la degradación de RPB1. Dado que no hay moléculas de RNAPII involucradas en el reconocimiento por GG-NER, esta degradación debe ser necesariamente *in trans* respecto a la lesión.

Sin embargo, el sistema TC-NER también estimula la reparación del daño, por lo que también debería estimular la degradación de RPB1 *in trans*. De esta manera, los mecanismos de degradación de RPB1 dependientes de TC-NER *in cis* e *in trans* podrían co-existir. El hecho de que no observemos hiperdegradación a tiempo corto en células deficientes en el proceso de reparación, como en células XPA KO (Figura R10), se deba presumiblemente a que la degradación *in cis* por CSA y CSB antecede al proceso de reparación, y por lo tanto enmascara la degradación *in trans* señalizada por la reparación. En este sentido, resultados de nuestro grupo de investigación que no forman parte de esta tesis doctoral, apoyan este modelo. A través del uso de α -amanitina, una droga que induce el frenado de la RNAPII en el daño y provoca el reclutamiento de los factores de TC-NER, así como gracias al uso de mutantes de RPB1 resistentes a la degradación inducida por esta droga, nuestro grupo demostró que la reparación del daño inducida por TC-NER en respuesta al tratamiento con α -amanitina, también estimula la degradación *in trans* de RPB1 (Choudhary et al., en revisión).

En este contexto, dos trabajos recientemente publicados demostraron que, en respuesta al daño al ADN, RPB1 es degradada cuando está pausada en la región proximal al promotor, incluso de genes no dañados, demostrando que los niveles de RPB1 también pueden regulados *in trans* (Bay et al., 2022; Steurer et al., 2022). Sin embargo, existen diferencias entre nuestros resultados y los mostrados en estos trabajos en términos del estado de fosforilación de RPB1, que serán discutidos más adelante, y permiten hipotetizar que el escenario es incluso más complejo de lo pensado inicialmente.

De esta manera, existe una diferencia sustancial entre la degradación *in cis* o una cascada de señalización *in trans* que controla los niveles de RPB1. La degradación *in cis* presumiblemente facilite la reparación de lesiones, como plantea el modelo del “último recurso” mientras que, en una cascada de señalización *in trans*, la degradación de RPB1 no está relacionada con la reparación, sino con el control general de la respuesta transcripcional ante el daño en el ADN. Entonces, es posible que la degradación *in cis* e *in trans* co-existan. La luz ultravioleta, uno de los agentes citotóxicos más comunes utilizados en la investigación, induce diferentes tipos de lesiones que bien podrían condicionar la vía de elección, es decir, la degradación *in cis* o *in trans*. Aparte de los dímeros de pirimidina, la exposición a la luz UV favorece el *crosslink* entre aminoácidos aromáticos y ácidos nucleicos

(Greenberg, 1979). En este sentido, datos de crio-microscopía electrónica de un complejo de RNAPII en activa elongación mostraron que dos residuos de fenilalanina y seis de tirosina están lo suficientemente cerca, a menos de diez ángstroms, de un nucleótido de ADN o ARN (PDB: 8B3D). De esta manera, el *crosslink* entre los residuos de RPB1 y el ADN o ARN podría representar un escenario en el que se favorezca la degradación *in cis*. Más aún, resultados recientes demostraron que efectivamente CSA y CSB resuelven el *crosslink* entre la RNAPII y el ADN al estimular la ubiquitinación y degradación de RPB1 (Carnie et al., 2024; Oka et al., 2024; van Sluis et al., 2024).

Degradación de moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas

En relación a la actividad transcripcional de la molécula de RPB1 que es degradada en el proteasoma, el marco conceptual hasta ahora apuntaba hacia moléculas de RPB1 que forman parte de complejos transcripcionalmente activos de RNAPII. Sin embargo, los resultados mostrados en la Figura R15 y R17 muestran claramente que, en células tratadas con distintos inhibidores de la transcripción, las moléculas de RPB1 no fosforiladas (IIa), inactivas desde el punto de vista transcripcional, pueden ser degradadas. Estos resultados no sólo abren nuevos interrogantes respecto a la regulación de la expresión génica en respuesta al UV, sino que confirman que RPB1 puede degradarse *in trans* respecto a la lesión. Considerando los trabajos mencionados más arriba, que indican que la RNAPII detenida en la región proximal al promotor puede ser dirigida para su degradación (Bay et al., 2022; Steurer et al., 2022), estos resultados podrían interpretarse como la degradación de moléculas inactivas o detenidas desde el punto de vista transcripcional, con pocos o ningún nucleótido de ARN sintetizado. Sin embargo, en estos trabajos las moléculas de RPB1 degradadas en el promotor se encuentran enriquecidas en Serina 5 fosforilada, en contraste con nuestros resultados que indican que las moléculas no fosforiladas son dirigidas a su degradación. Dada la complejidad de las células humanas y la relevancia de la RNAPII en la homeostasis celular, es esperable que co-existan diferentes mecanismos encargados del control de los niveles de RPB1, activos en diferentes tipos o estados celulares.

En apoyo a la hipótesis de degradación de RPB1 en el promotor, resultados de nuestro grupo de investigación que no forman parte de esta tesis doctoral demuestran que la degradación *in trans* de moléculas no fosforiladas de RPB1 depende de su unión a la cromatina. Considerando que el único lugar en el cual existen moléculas de RPB1 no fosforiladas y unidas a la cromatina es inmediatamente después de su asociación a los promotores, estos resultados también sugieren que las moléculas transcripcionalmente inactivas de RPB1 son dirigidas para su degradación cuando están asociadas al promotor. Más aún, dos trabajos recientes demostraron que, en ausencia de estrés genotóxico, el complejo *Integrator* previene la transcripción de complejos de RNAPII

defectuosos, y deficiencias en este complejo estimulan la degradación de RPB1 frenada en el promotor, previniendo el inicio de la transcripción (Bleas et al., 2024; Cacioppo et al., 2024). De esta manera, estos resultados sugieren que los promotores son el sitio en el cual se decide el destino de una RNAPII en distintas condiciones celulares: o comienza a transcribir, o es degradada. Así, los promotores podrían ser interpretados no sólo como un sitio de regulación de la transcripción *in cis*, es decir, del gen que transcriben, sino un centro regulador global de la expresión génica, a través de la regulación de la degradación de RPB1.

Rol de la familia de E3 ligasas CRL en la degradación de RPB1 dependiente de NER

Una gran diversidad de complejos E3 ligasa han sido asociados a la ubiquitinación de RPB1 en distintos estados celulares, muchos de los cuales han sido discutidos en la Introducción de esta tesis y en (Muñoz et al., 2022). En su mayoría, se destacan por formar parte de la familia de E3 “Cullin-RING Ligases” (CRL). Las CRL, la familia más grande de E3 ligasas, comparten un mismo *core* estructural, pero usan distintos adaptadores y subunidades que le confieren especificidad. Además, esta familia de E3 ligasas requiere la conjugación de NEDD8 para su activación catalítica. Utilizando el fármaco MLN4924, un inhibidor del proceso de conjugación de NEDD8, nuestros resultados sugieren que la familia de CRL está efectivamente involucrada en la degradación de RPB1, tanto a tiempos cortos, como tiempos largos después de la irradiación (Figura R16). En este sentido, tanto CRL4^{CSA} como CRL4^{DBB2} forman parte de la familia de CRLs, poseen a la misma Culina 4 en su *core* proteico, pero se diferencian en el factor de especificidad. Nuestros resultados confirman el rol de CSA en la degradación de RPB1, dado que el KD de CSA previene la degradación de RPB1 a tiempos cortos luego de la irradiación (Figura R9). Sin embargo, el hecho de que no prevenga la degradación de RPB1 a tiempos largos (Figura R9), descarta este complejo como responsable de la degradación mediada por GG-NER.

En este sentido, ha sido recientemente identificado que CSA promueve la poli-ubiquitinación del residuo K1268 de RPB1 en respuesta al UV a tiempos cortos luego de la irradiación (Nakazawa et al., 2020; Tufegdžić Vidaković et al., 2020). La prevención de la ubiquitinación de este residuo en células K1268R, en las que la lisina es mutada por una arginina no ubiquitinable, previene la degradación de RPB1. Sin embargo, mientras que la mutación K1268R previene la degradación de RPB1, también previene el reclutamiento de TFIIH al complejo de reparación TC-NER, pero genera sólo defectos parciales en el proceso de reparación (Tufegdžić Vidaković et al., 2020). Sumado al hecho de que distintas ramificaciones de poli-ubiquitina pueden formarse a partir del residuo K48 o K63 de una ubiquitina conjugada a la K1268 de RPB1 (Nakazawa et al., 2020); así como que la enzima USP7 que remueve ubiquitinas es reclutada al complejo TC-NER, estos resultados sugieren que la ubiquitinación de RPB1

por CSA cumple un rol central en la regulación de la reparación. De esta manera, es probable que distintos pasos de ubiquitinación-deubiquitinación, así como distintas E3 ligasas, modulen el proceso de reparación y a su vez definan el destino de la RNAPII frenada en el daño. El hecho de que el KD de CSA no prevenga por completo la degradación de RPB1 a tiempos cortos (Figura R9), se debe presumiblemente a que la eficiencia del KD no es del 100%, aunque no podemos descartar que efectivamente otros complejos E3 ligasa estén involucrados en la degradación a tiempos cortos. En este sentido, la ubiquitinación de RPB1 por CSA posee un máximo a las 2 horas luego de la irradiación, mientras que antes y después esta E3 ligasa no está involucrada (Tufegdžić Vidaković et al., 2020).

A tiempos largos luego de la irradiación, tanto células dKO XPC-DDB2 como simple KO para DDB2 presentan una prevención de la degradación de RPB1 (Figura R7 y Figura R8), por lo que el complejo CRL4^{DDB2} podría ser responsable de la ubiquitinación a tiempos largos. Sin embargo, ha sido demostrado que DDB2 es degradada en respuesta al daño al ADN, y esto no depende de su interacción con el daño (Luijsterburg et al., 2007), por lo que resulta improbable que DDB2 sea la E3 ligasa de RPB1. En cambio, es factible pensar que DDB2 esté involucrada en la regulación de la degradación dado su rol en el reconocimiento del daño en el ADN, y no por ubiquitinar *in trans* a RPB1.

El hecho de que, a tiempos largos, defectos en el proceso de reparación induzcan la hiperdegradación de RPB1 a (Figuras R10, R11, R12, R13), y el inhibidor MLN4924 prevenga la degradación de RPB1 (Figura R16), sugiere que alguna, o algunas, E3 ligasas de la familia de CRL se activan de manera transitoria durante la reparación del daño, y continúan activas hasta que la estructura del ADN es restaurada. En este sentido, ha sido publicado que los complejos CRL4 se reorganizan dinámicamente en respuesta al UV (Reichermeier et al., 2020), lo que favorece aún más la hipótesis de que distintas E3 ligasas estén involucradas en esta regulación.

En este sentido, los resultados mostrados en la Figura R17 sugieren que la familia de CRLs es también responsable de la degradación de moléculas no fosforiladas de RPB1, dado que el co-tratamiento con DRB y MLN4924 previene la degradación de RPB1. En este contexto, ha sido reportado que la E3 ligasa WWP2, que forma parte de la familia de las CRL, se une preferentemente a moléculas de RPB1 no fosforiladas respecto a fosforiladas en Serina 5 o Serina 2 (R. Y. Moreno et al., 2023). Además, es capaz de inducir la ubiquitinación de RPB1 independientemente de su estado de fosforilación (Li et al., 2007) y se activa en respuesta a la formación de DSB en el ADN, como mecanismo para inhibir la transcripción y promover la recombinación homóloga (Caron et al.,

2019). De esta manera, resulta interesante evaluar el rol de WWP2 en la degradación *in trans* de moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas inducido por la reparación por el sistema NER.

El sistema NER conecta la reparación del daño con la expresión génica: RPB1 como un factor limitante bajo estrés

La idea de una conexión entre la reparación del ADN y la expresión génica se estableció hace muchos años, cuando se hizo evidente que ciertos factores, como TFIIH, juegan roles en ambos procesos. Así, se concibió la idea de que factores con roles duales pueden resultar limitantes y de esta manera conectar ambos procesos. En función de los resultados presentados en esta tesis, proponemos una capa adicional en el acoplamiento entre la expresión génica y la reparación del ADN, en la cual la reparación mediada por NER convierte a RPB1 en un factor limitante, restringiendo la actividad de RNAPII y, por lo tanto, moldeando la respuesta de expresión génica al daño del ADN.

La respuesta celular al daño en el ADN inducido por UV ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos 50 años. Por lo tanto, es ampliamente sabido que, inmediatamente después de la irradiación UV, la elongación de la transcripción se ve impedida, considerando que el daño en el ADN inducido por UV impone un bloqueo físico a la elongación de RNAPII. Sin embargo, luego del bloqueo de la elongación, ocurre una inhibición de la iniciación de la transcripción, que ocurre de manera global e independientemente del bloqueo a la elongación que impone el daño. Si bien este mecanismo resultó una incógnita durante mucho tiempo, la reciente identificación de la ubiquitinación del residuo K1268 de RPB1 en respuesta al UV permitió ampliar el panorama. La prevención de la ubiquitinación de RPB1 en células K1268R previno su degradación y, como consecuencia, células K1268R exhiben elevados niveles transcripcionales tras la irradiación UV. Esto demuestra que la degradación de RPB1 es suficiente para explicar la inhibición de la iniciación de la transcripción en respuesta a la irradiación UV (Tufegdžić Vidaković et al., 2020). De esta manera, la degradación de RPB1 emerge como un importante regulador del apagado global de la iniciación de la transcripción, proporcionando de esta manera una explicación respecto al mecanismo que gobierna este proceso (Tufegdžić Vidaković et al., 2020). En esta tesis doctoral, demostramos que deficiencias en el sistema de reconocimiento GG-NER previenen la degradación de RPB1 a tiempos largos luego de la irradiación (Figuras R7 y R8), lo cual además genera mayores niveles transcripcionales (Figura R18). Esta observación permite complementar los resultados publicados previamente, dado que los niveles de RPB1 no sólo controlan el apagado inicial de la transcripción, sino que además modulan los niveles transcripcionales de manera global a tiempos más largos. De esta manera, la presencia excesiva de daño en el ADN, reconocida por el sistema GG-

NER, previene el reinicio de la transcripción al inducir la degradación de RPB1. De todos modos, nuestros resultados no nos permiten descartar que existan otros mecanismos que también regulan el re-inicio de la transcripción, como el mecanismo que involucra a ATF3 y fue discutido extensamente en la Introducción.

Un análisis retrospectivo de datos relevantes publicados sugiere que la degradación de RPB1 dependiente del proceso de reparación por NER, que proponemos en esta tesis, podría haber sido pasada por alto. El trabajo seminal de Ratner y sus colaboradores (Ratner et al., 1998) presentó diversos resultados que sugieren que células deficientes en NER tienen niveles alterados de RPB1 en respuesta a la irradiación con UV: i) Los resultados de la Figura 1 muestran que los fibroblastos mutantes en XPD tienen niveles reducidos de RPB1 en comparación con células WT, ii) los resultados de la Figura 6 muestran lo mismo, pero esta vez utilizando fibroblastos mutantes en XPA y XPG, y iii) la Figura 6 también muestra que los fibroblastos mutantes en XPC presentan niveles más altos de RPB1 que su contraparte WT (ver Ratner et al., 1998). Además, el laboratorio del Dr. Aziz Sancar mostró un aumento en la reparación de la hebra molde en fibroblastos mutantes en XPC, un resultado que concuerda con la idea de esta tesis, en el que un contexto deficiente en GG-NER genera mayores niveles de RPB1, favoreciendo así la transcripción (Hu et al., 2015). Por lo tanto, proponemos que existe un aumento de la actividad de TC-NER en células deficientes en GG-NER, no solo porque no hay reparación por GG-NER, sino también debido al aumento en los niveles de RPB1 en respuesta a cualquier daño reconocido por NER. En este sentido, células mutantes en factores clave de reparación de NER (XPA, XPB, XPD, XPF y XPG) exhiben menores niveles de RPB1 y por lo tanto menor actividad de TC-NER.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que los niveles de RPB1 son controlados a través del sistema NER debido a que modula su degradación. Sin embargo, si observamos en detalle los resultados presentados en la Figura R2, la inhibición del proteasoma no previene por completo la disminución de los niveles de RPB1. Si bien en la mayoría de los experimentos controlamos que la disminución de los niveles RPB1 fuera producto de su degradación, al realizar controles con MG132, no podemos descartar que la síntesis de RPB1 sea relevante en la respuesta al daño al ADN. De hecho, resultados de nuestro grupo de investigación que no forman parte de esta tesis doctoral muestran que, en células WT, la expresión del gen *POLR2A*, que codifica para RPB1, disminuye su expresión a tiempos cortos, pero aumenta a tiempos más largos. Más aún, la inhibición de la síntesis de proteínas gracias al tratamiento con cicloheximida mostró una disminución aun mayor, si bien sutil, de los niveles de RPB1, tanto a tiempos cortos como largos. Sorprendentemente, la vida media de RPB1 no ha sido evaluada en profundidad en ausencia de daño, pero resulta claro que se degrada rápidamente luego de la irradiación con UV. En consecuencia, resulta de gran relevancia evaluar el rol del sistema NER en la regulación de la síntesis de

RPB1 en profundidad. De esta manera, el análisis del estado epigenético y la expresión del gen *POLR2A*, así como el procesamiento del pre-ARNm, la síntesis proteica y su degradación, deben evaluarse en detalle para comprender holística los mecanismos que controlan los niveles de RPB1.

Regulación de la abundancia de RPB1 y su impacto en patologías humanas

Dada la relevancia de la RNAPII en la expresión génica, es esperable que la abundancia de RPB1 sea crucial para un correcto funcionamiento celular. De hecho, en un estudio reciente se analizaron variaciones en el número de copias de los genes humanos y su relación con la probabilidad de desarrollar enfermedades (Collins et al., 2022). Para comprender el impacto de los niveles de RPB1 en patologías humanas, utilizamos estos datos para analizar el efecto de un aumento o disminución del dosaje génico de *POLR2A*. Como se muestra en la Figura D1, tanto duplicaciones como deleciones en el gen *POLR2A* están altamente asociadas con la aparición de enfermedades. Consistentemente, trabajos previos reportaron que pacientes con carcinoma colorrectal y cáncer de próstata presentan deleciones en heterocigosis de *POLR2A* (Li et al., 2018), mientras que, por el contrario, pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) exhiben una sobre-activación de *POLR2A*, y en consecuencia niveles elevados de RPB1. Los niveles elevados de RPB1 en células derivadas de LMA, en comparación con células hematopoiéticas normales, desafía la creencia ampliamente aceptada de que RPB1 debería expresarse en abundancia en la gran mayoría de las células vivas, bajo el argumento de que es esencial para la transcripción (Yu et al., 2019). En conjunto, estos resultados indican que cualquier tipo de alteración en los niveles de RPB1, y en consecuencia en los patrones de expresión génica, afecta el normal funcionamiento de las células, y por lo tanto los niveles de RPB1 deben estar finamente regulados para preservar la homeostasis celular. El hecho de que el sistema NER reconozca y repare diferentes tipos de lesiones, incluidas algunas derivadas del metabolismo oxidativo como las ciclopurinas, sugiere que la abundancia de RPB1 podría estar regulada no solo en una respuesta aguda al daño, sino también en distintas condiciones patológicas. De esta manera, es posible que tejidos de alta demanda energética de pacientes deficientes en el sistema NER presenten niveles anormales de RPB1 y, en consecuencia, una desregulación de la expresión génica. Por lo tanto, los mecanismos de regulación de la abundancia de RPB1 resultan altamente relevantes en términos de salud humana.

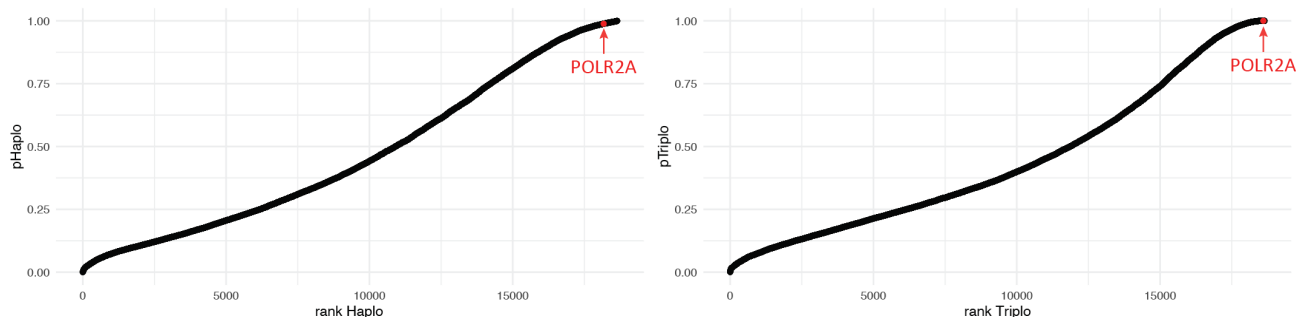


Figura D1: Sensibilidad predicha al dosaje génico a resolución de gen único. El eje Y representa la probabilidad predicha de desarrollar una enfermedad cuando un gen humano (ordenados en el eje X) se encuentra en una sola copia (Izquierda, haploinsuficiencia) o presenta una copia extra (derecha, triplosensibilidad). *POLR2A*, el gen que codifica para RPB1, se muestra en rojo y se encuentra entre los genes que presentan mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad ante variaciones en su número de copias. Figura realizada por el Dr. Manuel de la Mata a partir de los datos publicados en (Collins et al., 2022).

Modelo de control de los niveles de RPB1 por el sistema NER

En función de lo discutido hasta aquí, en la Figura D2 proponemos un modelo de control de la degradación de RPB1 por el sistema NER. A tiempos cortos después de la inducción del daño, el reconocimiento de las lesiones depende principalmente de TC-NER, que induce la degradación *in cis* de la RNAPII frenada en el daño a través de CSA. Esta RNAPII (Ilo) se encuentra fosforilada, dado que forma parte del *pool* de complejos en activa elongación. Luego, a medida que la transcripción es inhibida y el sistema TC-NER completa la reparación, GG-NER se encarga del reconocimiento de la mayoría de las lesiones. Independientemente de cómo se haya reconocido la lesión, el reclutamiento de los factores comunes a ambas vías encargados del procesamiento del daño estimulan, por un mecanismo desconocido, la activación de E3 ligasas de la familia de CRL. Esto genera la ubiquitinación y degradación, *in trans*, de moléculas de RPB1 transcripcionalmente inactivas y no fosforiladas (IIa). Este mecanismo de control de la degradación resulta fundamental en el control de la expresión génica, dado que los niveles de RPB1 emergen como uno de los responsables de determinar los niveles transcripcionales.

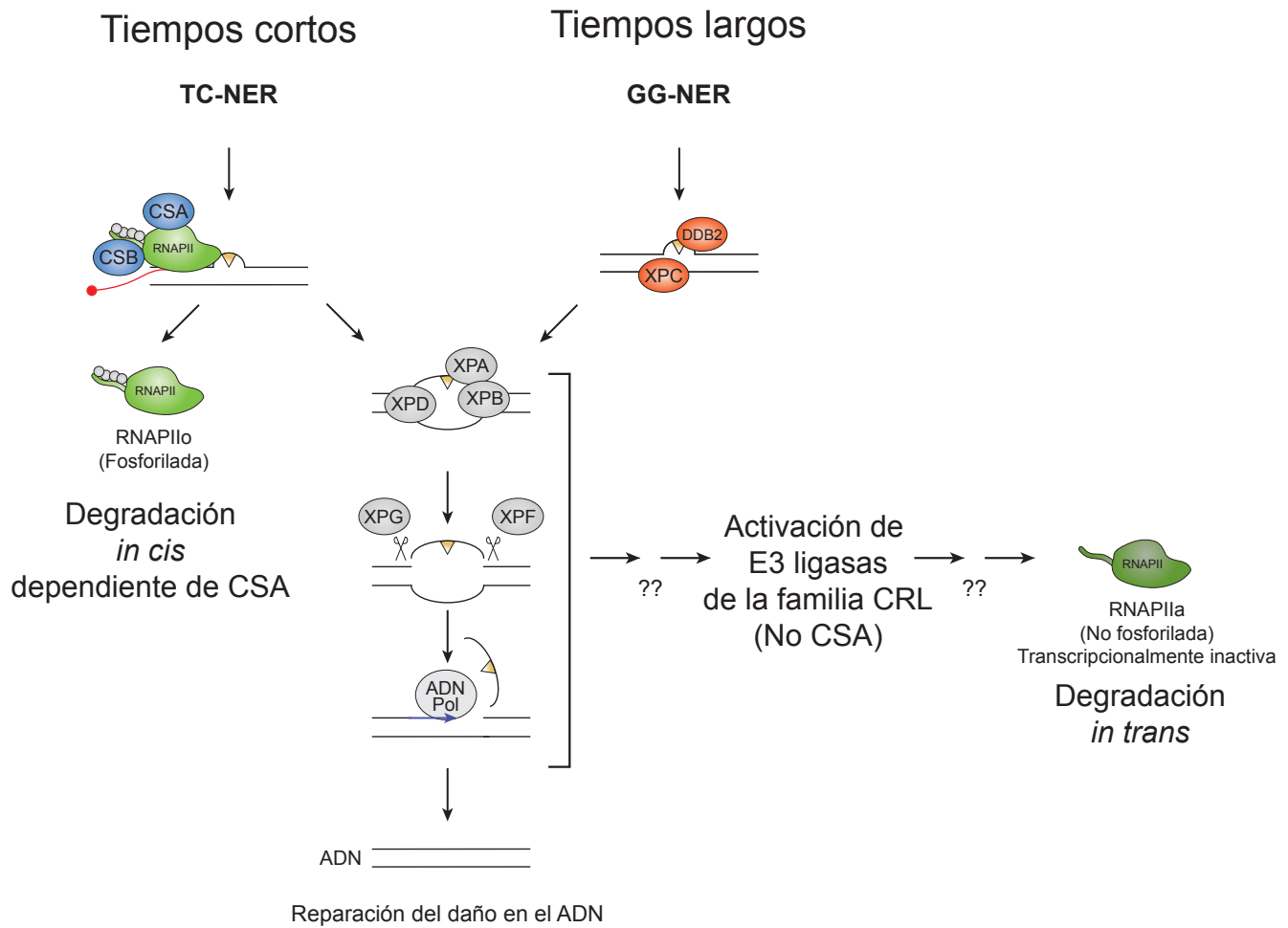


Figura D2: Modelo propuesto sobre el rol del sistema NER en el control secuencial de la degradación de RPB1.

Sección 2: Rol de la quinasa ATR en la respuesta transcripcional al daño al ADN

En la Sección 1 de los Resultados de esta tesis abordamos el rol del sistema NER en la degradación de RPB1. Si bien evaluamos el rol de la quinasa ATR y otras quinasas de la DDR, no encontramos que estuvieran involucradas en la degradación de RPB1 por el sistema NER, al menos durante la fase G1 del ciclo celular (Figura R14). No obstante, ATR sí modula el estado de fosforilación de RPB1 y los patrones de *splicing* alternativo en respuesta al daño al ADN (Muñoz et al., 2017). En este contexto, en la Sección 2 de los Resultados de esta tesis demostramos que, en ausencia de estrés replicativo, la reparación del daño por el sistema NER estimula la activación de ATR, que fosforila diversas subunidades del complejo Mediador, y regula la expresión de genes involucrados en la respuesta al daño. En esta sección de discusión analizaremos estos resultados, con el objetivo de comprender la importancia de ATR en la respuesta celular al daño al ADN más allá de su rol en la fase S del ciclo celular.

ATR fosforila al complejo Mediador

En repuesta al daño al ADN se desencadena una respuesta celular conocida como la *DNA Damage Response* (DDR), que reconoce el daño en el ADN y promueve su reparación. Esta respuesta celular es llevada a cabo por una gran diversidad de enzimas que contempla nucleasas, helicasas, polimerasas, topoisomerasas, recombinasas, ligasas, glicosilasas, demetilasas, quinasas y fosfatasas (Ciccia and Elledge, 2010). Dentro de la gran diversidad de modificaciones post-traduccionales que existen, las fosforilaciones son las más estudiadas, y gran parte de lo que conocemos sobre la DDR viene del estudio de las quinasas ATR, ATM y DNA-PK. Estas tres quinasas fosforilan residuos Serina o Treonina seguido de Glutamina (SQ/TQ) (Awasthi et al., 2016; Matsuoka et al., 2007), mientras que DNA-PK también puede fosforilar otros residuos (Chan et al., 1999; Jette and Lees-Miller, 2015). Durante la fase S del ciclo celular, el arresto de las horquillas de replicación genera la exposición de ssDNA, que es recubierto por la proteína RPA, e induce la activación de ATR. Una vez activa, ATR fosforila una gran diversidad de factores, siendo CHK1 el más estudiado. Los residuos Serina 317 y Serina 345 de CHK1 son los mejores caracterizados, y lógicamente poseen Glutamina luego de cada Serina, por lo que son definidos como sitios SQ/TQ. De la misma manera, ATR se autofosforila en el residuo Treonina 1989, que también es un sitio SQ/TQ. A pesar de que la fosforilación en sitios SQ/TQ por ATR ha sido ampliamente estudiada en respuesta al estrés replicativo, su estudio fuera de la fase S no había sido abordado hasta esta tesis doctoral. A través de dos ensayos de inmunoprecipitación de sitios SQ/TQ fosforilados (p-(SQ/TQ)) seguidos de espectrometría de masas, que denominamos “*SILAC-Proteomics*” y “*Shotgun-Proteomics*”, en esta tesis doctoral identificamos que ATR fosforila diversas subunidades del complejo Mediador durante la fase G1 del ciclo celular. Considerando que las

quinasas ATR, ATM y DNA-PK poseen un alto grado de homología estructural, en particular en el dominio que posee la actividad catalítica, defectos en la actividad de una de estas quinasas puede ser reemplazado por otra. Por lo tanto, utilizamos un total de 3 inhibidores distintos de ATR en los dos ensayos de proteómica, para así intentar garantizar que los sustratos identificados sean efectivamente modificados por ATR.

Los factores identificados por ensayos de espectrometría de masas cuantitativa “*SILAC-Proteomics*” se muestran en la Tabla R1 y, en la Figura R22, se muestran interacciones reportadas entre estos factores. En este experimento utilizamos el inhibidor AZ20. De manera notable, el *cluster* de factores más grande corresponde a subunidades del complejo Mediador. Entre las subunidades identificadas, se destacan subunidades de cada uno de los sub-módulos del *core* del Mediador: Identificamos factores de los sub-módulos *middle* (MED1 y MED4), *tail* (MED15 y MED23), *head* (MED6) y la subunidad *scaffold* (MED14) que establece contactos con el resto de los sub-módulos. Además, identificamos subunidades del módulo MKM (CDK19 y MED13L). Por otra parte, en los ensayos de espectrometría de masas cualitativa “*Shotgun-Proteomics*”, utilizamos dos inhibidores de ATR, VE-822 y AZD6738. Los factores identificados se muestran en la Figura R25. Nuevamente, observamos que el *cluster* de factores identificados de mayor tamaño corresponde al complejo Mediador. En este caso, identificamos factores de los sub-módulos *middle* (MED1 y MED4), *tail* (MED16, MED23 y MED24), *head* (MED17, la subunidad *scaffold* (MED14) y el módulo MKM (CCNC). Considerando que identificamos al menos una subunidad de cada uno de los sub-módulos de ATR en ambos experimentos, y que varias de estas subunidades poseen sitios SQ/TQ, estos resultados sugieren que ATR fosforila estas subunidades y favorece el ensamblado de todo el complejo, incluido el módulo MKM.

Para identificar las subunidades del complejo Mediador efectivamente fosforiladas por ATR solapamos los resultados de ambos ensayos de proteómicas. En la Figura R26 se muestran los factores identificados en ambos ensayos, que consisten en las subunidades del módulo *middle* (MED1 y MED4) y del módulo *tail* (MED23), y la subunidad *scaffold* MED14, así como el factor de transcripción NR2F2 y la sumopectidasa SENP3. Para validar los ensayos de proteómica, realizamos inmunoprecipitaciones de los sitios p-(SQ/TQ) seguido de western blot. En las Figuras R27 y R28, se observa que las subunidades MED1, MED4 y MED23 inmunoprecipitan al utilizar anticuerpos anti p-(SQ/TQ) en respuesta al UV, y esto es prevenido por la inhibición de ATR, sugiriendo que ATR fosforila estas subunidades. Sorprendentemente, la subunidad MED4 no posee sitios SQ/TQ en su secuencia, por lo que es posible que ATR fosforile otras secuencias no canónicas, que también deberían ser reconocidas por el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación, o bien que MED4 se asocie fuertemente al resto del complejo y co-inmunoprecipite consistentemente.

Diversos trabajos han indagado en el rol de ATR y ATM en la fosforilación de sitios SQ/TQ en respuesta al daño al ADN utilizando células en activa proliferación (Kidiyoor et al., 2020; Matsuoka et al., 2007; Olsen et al., 2010). Estos trabajos también identificaron a las subunidades MED1 y MED13L, entre otros factores que identificamos en nuestros ensayos de proteómica, sugiriendo que ATR fosforila al complejo Mediador durante todo el ciclo celular. Dado que ATR fosforila una gran cantidad y diversidad de factores durante la fase S, esto podría impedir o complejizar la detección de todos los factores que son fosforilados, y por lo tanto la fosforilación del Mediador se vuelve aparente en células arrestadas en G1.

En línea con los resultados presentados en esta tesis, ha sido demostrado que MED1 se fosforila en respuesta al daño al ADN inducido por UV. Si bien en este trabajo describieron a CHK2 como responsable por esta fosforilación, estas conclusiones fueron obtenidas a través del uso de wortmanina y cafeína, dos inhibidores pleiotrópicos de quinasas de la DDR (Powis et al., 1994; Selby and Sancar, 1990). En cambio, los resultados presentados en esta tesis doctoral fueron obtenidos por análisis de proteómica no sesgados, a través del uso de 3 inhibidores más específicos de ATR, que poseen un IC50 menor. De esta manera, junto con nuestros resultados, los resultados obtenidos en (Kim and Yun, 2017) también podrían sugerir que ATR fosforila a MED1 en respuesta al daño al ADN.

Si bien varios trabajos han abordado el rol regulatorio de la fosforilación de distintas subunidades del complejo Mediador, la gran cantidad de subunidades que lo conforman, así como la característica modular del complejo, dificultan comprender en detalle los mecanismos subyacentes. En particular, se ha evaluado el rol de las fosforilaciones del complejo Mediador en *S. cerevisiae*, que posee un alto grado de conservación respecto al complejo Mediador de humanos. Un trabajo demostró que la subunidad MED4 es fosforilada por la quinasa KIN28, ortóloga de CDK7 en humanos, lo cual modula el ensamblado del complejo y la asociación de KIN28 con la RNAPII (Guidi et al., 2004). Otro trabajo también demostró que la fosforilación de MED4 y MED14 estimula la asociación del *core* Mediador con el módulo MKM, previniendo la inducción de la expresión génica (Drogat et al., 2012). Además, un trabajo publicado por el grupo del Dr. Patrick Cramer demostró que 17 de las 25 subunidades del complejo Mediador de *S. cerevisiae* son fosforilados en respuesta a estrés y, en particular, la fosforilación de MED15 previene la inducción de los patrones de expresión génica específicos de respuesta a estrés (Miller et al., 2012). Ninguna de las fosforilaciones mencionadas hasta este punto corresponde a sitios SQ/TQ, sin embargo, resultan de gran relevancia en el contexto de esta tesis doctoral. Nuestros resultados podrían interpretarse como que la fosforilación de MED4 o MED14 por ATR podría modular la interacción de

CDK7 con la RNAPII, y así modular la fosforilación de RPB1 en respuesta al UV (Muñoz et al., 2017), aunque esta hipótesis no fue abordada experimentalmente en esta tesis.

La reparación del daño por el sistema NER estimula la activación de ATR

La exposición de ssDNA en las horquillas de replicación arrestadas estimula la activación de ATR. Como hemos discutido en esta tesis, el ssDNA es un intermediario de la reparación por el sistema NER y es concebible que favorezca la activación de ATR. Utilizando células arrestadas en G1, varios trabajos evaluaron el rol del sistema NER en la activación de ATR. Dos trabajos demostraron que la acumulación de intermediarios de reparación del sistema NER estimula la fosforilación de la histona H2AX, en un proceso que depende de la activación de ATR (Hanasoge and Ljungman, 2007; Vrouwe et al., 2011). Más aún, otros dos trabajos demostraron que la acumulación de intermediarios de reparación recluta específicamente a ATR a los sitios del daño, lo cual a su vez estimula la fosforilación de la histona H2AX (Matsumoto et al., 2007; Ray et al., 2016). Finalmente, otro grupo de investigación también reportó, a través de ensayos de western blot utilizando anticuerpos que reconocen sitios p-(SQ/TQ), que los intermediarios de reparación del sistema NER estimulan la activación de ATR (Kemp, 2017). En este trabajo también demostramos que el sistema NER estimula la activación de ATR durante la fase G1 del ciclo celular en respuesta al UV, que fosforila subunidades del complejo Mediador. En las Figuras R22 y R25-R28 mostramos que las subunidades MED1, MED4 y MED23 inmunoprecipitan utilizando anticuerpos que reconocen sitios SQ/TQ fosforilados, y esto es prevenido en presencia de inhibidores de ATR. En la Figura R28 mostramos que en células dKO XPC/DDB2 esta inmunoprecipitación se ve prevenida parcialmente. De esta manera, estos resultados también sugieren que el sistema NER activa a la quinasa ATR, pero no nos permiten descartar otros mecanismos. Dado que en células arrestadas en G1 no hay estrés replicativo, otra fuente posible de ssDNA es el propio proceso de transcripción, que expone ssDNA. Por lo tanto, al momento de entrega de esta tesis nos encontramos realizando experimentos similares a los mostrados en la Figura R28, pero utilizando células dKO XPC/DDB2 pre-incubadas con DRB, para impedir tanto la reparación como la transcripción. Esperamos que estos resultados prevengan por completo la fosforilación de las subunidades del Mediador en respuesta al UV, lo cual sugeriría que cualquier fuente de ssDNA es capaz de activar a ATR, provenga de intermediarios de reparación, del proceso de transcripción *per se* o del estrés replicativo.

Rol de ATR en la regulación transcripcional ante el daño al ADN

En esta tesis doctoral hemos demostrado que la reparación del daño por el sistema NER estimula la activación de ATR que fosforila subunidades del complejo Mediador. Para comprender el rol de ATR en la regulación de la transcripción, realizamos un ensayo de secuenciación de ARN asociado a la cromatina en respuesta al UV en células arrestadas en G1, que aún nos encontramos analizando al momento de entrega de esta tesis. Sin embargo, mostramos algunos análisis preliminares. En la Figura R29 se observa que genes asociados con la respuesta a estrés, como CXCL8 y EGR1, aumentan su expresión ante la irradiación con UV, y la inhibición de ATR exagera esta respuesta. En cambio, la expresión del gen JAG1, que se reprime en respuesta al UV, no es modulado por ATR. Asimismo, en la Figura R30 se muestran los niveles de ARN mensajero maduro de estos mismos genes medido por RT-qPCR, y se observa la misma respuesta. Estos resultados sugieren que ATR regula la expresión de genes que forman parte del programa transcripcional específico de la respuesta al daño. El hecho de que la inhibición de ATR aumente la expresión de estos genes indicaría que ATR previene una sobre-activación de la expresión, que puede resultar deletérea en un contexto de estrés genotóxico. Si bien nuestros resultados fueron obtenidos en células arrestadas en G1, anteriormente comentamos sobre la posibilidad de que ATR fosforile al complejo Mediador, y en consecuencia module la expresión génica, a lo largo de todas las etapas del ciclo celular.

Si bien estos resultados podrían interpretarse siguiendo la hipótesis de que la fosforilación de MED4 y MED14 modula la interacción de la RNAPII con TFIIH, y de esta manera ATR regula la actividad de la RNAPII, es probable que la asociación del MKM al complejo Mediador tenga un rol aún más preponderante. En los dos ensayos de proteómica que realizamos en esta tesis doctoral mostramos que distintas subunidades del MKM son identificadas junto con el resto de las subunidades del *core* Mediador. Esto nos permite hipotetizar que la fosforilación de algunas subunidades del complejo Mediador favorece la asociación del MKM con el resto del complejo. Como ya ha sido discutido en la introducción, la asociación del MKM al complejo Mediador posee un rol inhibitorio de la transcripción, dado que previene la asociación de TFIIH con la RNAPII. De esta manera, nuestros resultados sugieren que ATR disminuye los niveles transcripcionales en respuesta al UV, presumiblemente debido a que la fosforilación del complejo Mediador estimula su asociación con el módulo MKM. En línea con esta hipótesis, varios trabajos sugieren que ATR regula al MKM. Por un lado, ha sido demostrado que la depleción de las subunidades CCNC o CDK8 del MKM disminuyen el estrés replicativo generado por la inhibición de ATR y favorecen el reinicio del ciclo celular (Lloyd et al., 2021; Nakamura et al., 2018). El trabajo de (Lloyd et al., 2021) fue publicado por el laboratorio del Dr. Stephen Jackson, donde también

muestran que la inhibición de la transcripción por el tratamiento con DRB tiene un efecto similar que la depleción de CCNC o CDK8. En este contexto, la depleción de CCNC no genera el reinicio del ciclo celular en células tratadas con inhibidores de ADN polimerasas (afidicolina), por lo que estos resultados sugieren que el MKM tiene un rol específico en contrarrestar el estrés replicativo asociado a la transcripción (Lloyd et al., 2021). De esta manera, en este trabajo especulan con que el MKM podría ser regulado por ATR, previniendo la transcripción y disminuyendo el estrés replicativo asociado. Más aún, sugieren que la subunidad CCNC, que posee sitios SQ/TQ en su extremo carboxilo terminal, podría ser un potencial sustrato de ATR (Lloyd et al., 2021). Notablemente, en la Figura 25 mostramos que la subunidad CCNC es uno de los factores identificados en nuestro ensayo de “Shotgun-Proteomics” y, si bien no pasó los filtros utilizados en el ensayo de “SILAC-Proteomics” para considerar significativa una diferencia en la relación H/L, la subunidad CCNC es fosforilada en respuesta al UV (SILAC1) y esta fosforilación es prevenida en presencia del inhibidor de ATR (SILAC2).

En marcado apoyo a nuestros resultados y los del laboratorio del Dr. Jackson, otros grupos de investigación profundizaron en los mecanismos subyacentes a esta regulación. Por un lado, a través de una comunicación oral del Dr. Marteiijn Luijsterburg en el congreso “*The DNA Damage Response in cell physiology and diseases*” de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO) llevado a cabo en el 2024. Resultados aún no publicados de su grupo sugieren que existe un acoplamiento entre el disparo de orígenes de replicación y la transcripción. Mientras que una RNAPII transcribe a una tasa aproximada de 2 kb/minuto, el replisoma avanza más lento, a una tasa de 1 kpb/minuto. En este contexto, sus resultados sugieren que la activación de un promotor estimula el disparo de un origen de replicación río arriba, disminuyendo la probabilidad de que se produzcan colisiones cabeza-cabeza y cabeza-cola entre el replisoma y la RNAPII. En este contexto, defectos en la transcripción que disminuyen la tasa de elongación favorecen la colisión cabeza-cola entre el replisoma y la RNAPII. Ante estas colisiones, el factor CFAP disocia a la RNAPII de la cromatina, previniendo el arresto prolongado de la horquilla de replicación colisionada. Notablemente, el Dr. Luijsterburg también mostró qué, en este contexto, la subunidad CCNC del MKM del complejo Mediador está involucrada en la disminución de los niveles transcripcionales, y la quinasa ATR posee un rol regulatorio en este proceso. En consecuencia, estos resultados sugieren que ATR favorecen la disminución de los niveles transcripcionales, a través de la regulación del MKM, lo que a su vez previene colisiones entre el replisoma y la RNAPII.

De manera similar, un estudio reciente, aún no sujeto a revisión por pares, realizado en *S. cerevisiae*, sugiere que la depleción de las subunidades CDK8 y MED12 del MKM aumenta los niveles de fosforilación de RAD53, ortólogo de CHK2 en humanos, debido a un aumento en la formación de DSBs en respuesta al daño al ADN (Memisoglu

et al., 2023). Más aún, se muestra que la depleción de CDK8 rescata la hipersensibilidad al UV generada por el KO de MEC1, ortólogo de ATR en humanos (Memisoglu et al., 2023). De esta manera, los resultados revisados hasta aquí sugieren que ATR reduce los niveles transcripcionales a través de la regulación del MKM, disminuyendo así el estrés replicativo asociado a la transcripción.

En conjunto, estos trabajos tienen una gran similitud con los resultados presentados en esta tesis. En las Figuras R29 y R30 mostramos que, ante la irradiación con UV de células arrestadas en la fase G1 del ciclo celular, ATR fosforila al complejo Mediador y previene la sobre-activación de genes de respuesta a estrés. Estos resultados sugieren que ATR permite que estos genes se expresen, pero de manera controlada, dado que transcribir un genoma dañado puede resultar altamente deletéreo. Dado que el sistema NER se encuentra activo durante todo el ciclo celular, es esperable que ATR regule la transcripción durante todo el ciclo celular. De esta manera, la regulación de la expresión génica por ATR en células en fase S permitiría que los genes de respuesta a estrés se transcriban, pero de manera controlada, para disminuir la probabilidad de que haya colisiones con el replisoma. Esta hipótesis cobra aún más sentido si consideramos que los genes de respuesta a estrés suelen ser particularmente cortos (Tufegdžić Vidaković et al., 2020).

Considerando que el proceso de transcripción *per se* es mutagénico, e implica la exposición de ssDNA, (Anderson et al., 2024; Beletskii and Bhagwat, 1996; Brégeon et al., 2003; Hendriks et al., 2008; Jinks-Robertson and Bhagwat, 2014), nuestros resultados sugieren que ATR es un factor que protege al genoma de cualquier evento que involucre la exposición de ssDNA a lo largo de todo el ciclo celular, y no sólo en las horquillas de replicación arrestadas durante la fase S en un contexto de estrés genotóxico.

Rol de ATR en la regulación de la apoptosis

Si bien ha sido demostrado que la inhibición de ATR en células arrestadas en G1 previene la muerte celular (Kemp and Sancar, 2016), los resultados presentados en esta tesis no abonan a la hipótesis de que esto se debe a su rol en la regulación de los niveles transcripcionales. Dado que sólo hemos analizado unos pocos genes de los resultados de la secuenciación, resulta difícil sacar conclusiones globales. Sin embargo, el hecho de que la inhibición de ATR genere una sobre-activación de los genes de respuesta a estrés *a priori* debería implicar un aumento en la expresión de genes involucrados en la inducción de la apoptosis. Además, los resultados publicados por otros, y mostrados en esta tesis, sugieren que, durante la fase S, ATR previene el estrés replicativo asociado a la transcripción al regular el MKM y disminuir los niveles transcripcionales. En consecuencia, ATR también protege al genoma durante la fase G1 del ciclo celular, y su rol pro-apoptótico debe estar asociado a la regulación de otras vías.

Por ejemplo, ha sido reportado que ATR posee roles citoplasmáticos, donde modula de manera local en la membrana de las mitocondrias la inducción de la apoptosis (Benjamin A. Hilton et al., 2015). En este contexto, en los ensayos de proteómica identificamos los factores DAP3 y MRSP12, dos subunidades del ribosoma mitocondrial. Otra posible explicación es que ATR module la muerte celular a través de la regulación de la síntesis de proteínas. Como ha sido publicado, el UV no sólo daña el ADN, sino que también daña el ARN y genera colisiones entre ribosomas (Stoneley et al., 2022). Esta situación genera una respuesta celular conocida como *Ribotoxic Stress Response* (Sinha et al., 2024), que tiene un gran impacto en la inducción de la apoptosis. En este contexto, en los ensayos de proteómica identificamos al factor RPS5, una subunidad del ribosoma 40S, potencialmente fosforilado por ATR. Además, identificamos varios factores putativos, entre los que se destacan SENP3, WDR18, PELP1 y RPL7L1, involucrados en la biogénesis de ribosomas (Gordon et al., 2022), POLR3B, parte de la RNAPIII, que transcribe el ARN ribosomal 5S, y la subunidad EXOSC7 del complejo exosoma, involucrado en la degradación del ARN en distintas condiciones celulares (Gerlach et al., 2022). En este sentido, resultados preliminares no incluidos en esta tesis sugieren que ATR regula los niveles globales de traducción en células arrestadas en G1 irradiadas con UV. De esta manera, ATR podría ejercer su rol en la regulación de la apoptosis en la fase G1 del ciclo celular a través de la regulación de la traducción y la biogénesis de ribosomas. Finalmente, es posible que ATR module el *splicing* de genes pro-apoptóticos (Muñoz et al., 2017, 2009) de manera directa, y no a través de la regulación del inicio de la transcripción y la fosforilación de la RNAPII. En los ensayos de proteómica identificamos que ATR fosforila potencialmente a los factores MAGOH, ACIN1 y SAP18, que forman

parte del *Exon Junction Complex*, un complejo proteico que regula diversas etapas del procesamiento de los pre-ARNm, incluido el *splicing* (Singh et al., 2013).

De esta manera, la diversidad de funciones regulatorias por las que ATR podría modular la muerte celular, tanto en G1 como en otras etapas del ciclo celular, adquiere particular relevancia en términos de salud humana, considerando que los inhibidores de ATR se utilizan en tratamientos contra el cáncer. En este contexto, no resulta sorprendente que los resultados obtenidos hasta ahora en ensayos clínicos con estos inhibidores hayan mostrado una elevada toxicidad y eficacia variable (Joo et al., 2024). En consecuencia, es necesario comprender la diversidad de roles regulatorios de ATR, y así mejorar las terapias contra al cáncer utilizando inhibidores de ATR en combinación con otras drogas que prevengan los efectos no deseados de los diversos roles de ATR en la regulación de la muerte celular.

Conclusiones

Sección 1: Rol del sistema NER en la degradación de RPB1 en respuesta al daño al ADN

- En esta tesis demostramos que, en respuesta al daño al ADN inducido por luz UV, el sistema NER controla de manera secuencial la degradación de la subunidad RPB1 de la RNAPII. A tiempos cortos por TC-NER, mientras que a tiempos largos por GG-NER.
- El proceso de reparación del daño, común a ambas vías de reconocimiento, es responsable de activar una cascada de señalización que induce la degradación de RPB1, en un mecanismo que debe ser necesariamente *in trans* respecto a la lesión.
- La cascada de señalización activada por el procesamiento del daño estimula la activación de la familia de E3 ligasas de la familia CRL, que inducen la ubiquitinación y degradación de RPB1. Además, y por primera vez, demostramos que la degradación de RPB1 puede ocurrir de manera independiente de la transcripción, dado que moléculas no fosforiladas y transcripcionalmente inactivas de RPB1 pueden ser dirigidas para su degradación. Estos resultados a su vez confirman que la degradación de RPB1 ocurre *in trans* respecto a la lesión.
- Demostramos que los niveles de RPB1 modulan la actividad transcripcional, dado que los niveles de RPB1 correlacionan con la cantidad de síntesis de ARN. De esta manera, estos resultados establecen un marco teórico para la heterogeneidad clínica observada en pacientes con deficiencias en factores del sistema NER. Deficiencias en el reconocimiento de las lesiones implican mayores niveles de RPB1, mientras que deficiencias en la reparación implican menores niveles de RPB1.

Sección 2: Rol de la quinasa ATR en la respuesta transcripcional al daño al ADN

- En esta tesis doctoral demostramos que ante el daño en el ADN inducido por luz UV, los intermediarios de reparación del sistema NER, que exponen ssDNA, son capaces de estimular la activación de ATR. Si bien estos resultados fueron obtenidos en células arrestadas en G1 para impedir la activación de ATR por estrés replicativo, el sistema NER se encuentra activo durante todo el ciclo celular, y por lo tanto puede ser responsable de la activación de ATR en todas las fases del ciclo.
- A través de dos ensayos de proteómica no sesgados utilizando tres inhibidores distintos de ATR, demostramos que su activación en la fase G1 estimula la fosforilación de subunidades del complejo Mediador, entre otros factores identificados involucrados en la regulación transcripcional, el procesamiento de los pre-ARNm, la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas.
- En línea con los resultados de los ensayos de proteómica, demostramos que en respuesta al daño al ADN en células arrestadas en G1, ATR modula la expresión génica de manera global. Al momento de entrega de esta tesis podemos confirmar que modula específicamente la expresión de genes de respuesta a estrés, previniendo una sobre-activación que pueda resultar deletérea. De esta manera, la activación de ATR por el sistema NER disminuye los niveles transcripcionales en un genoma dañado, pero permitiendo la inducción de los genes de respuesta a estrés de manera controlada.
- Si bien nuestros resultados fueron obtenidos en células arrestadas en G1, es posible que ATR regule la expresión génica en todas las fases del ciclo celular. Durante la fase S, la disminución de la transcripción mediada por ATR también podría prevenir colisiones entre la RNAPII y la maquinaria replicativa. Si además se considera que la transcripción es un proceso mutagénico *per se*, estos resultados sugieren que ATR protege al genoma de cualquier fuente de ssDNA, y no sólo ante el estrés replicativo.

Materiales y Métodos

El desarrollo experimental de esta tesis fue realizado principalmente en el Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE), ubicado en Ciudad Universitaria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina entre los años 2019 y 2025. En el último trimestre de los años 2021 y 2022, los experimentos fueron realizados en el Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare ETS (IFOM), ubicado en Milán, Italia, en el laboratorio del Dr. Marco Foiani. A menos que se indique lo contrario, se siguieron los mismos protocolos experimentales en ambos institutos.

Mantenimiento de la línea celular HaCaT

Los queratinocitos humanos HaCaT se cultivaron en medio completo en placas estériles de 10 cm (P100) en incubadoras con 5% de CO₂ a 37°C. El medio completo consiste en DMEM alta glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% del antibiótico Primocin. Para su mantenimiento, las células se sub-cultivaron dos a tres veces por semana en diluciones de 1:3 a 1:6, evitando que superen un 60% de confluencia. Para ello, se retiró el medio completo y se lavó con PBS 1X. Luego se agregó EDTA 2 mM (1 ml para P100), asegurando que cubra toda la placa, y se incubó a 37°C durante 15-20 minutos hasta observar que las células adoptaran una morfología circular y brillante (refringente). A continuación, se agregó tripsina 2,5% m/v en EDTA 2mM (500 µl para P100) y se incubó durante 5 minutos a 37°C para desprender las células de la placa, verificando al microscopio el despegado. Luego, las células se disgregaron cuidadosamente, y se inactivó la tripsina diluyendo 1/10 con medio completo. Finalmente, las células se sembraron en nuevas placas según la relación de dilución elegida. Las células fueron congeladas y descongeladas siguiendo protocolos convencionales según <http://www.atcc.org>.

Protocolo de arresto del ciclo celular en G1

Para inducir el arresto del ciclo celular en G1, se siguió el protocolo descrito en (Kemp and Sancar, 2016). Las células HaCaT fueron sembradas a un 90% de confluencia en medio completo en distintos formatos, según los requerimientos de cada experimento (P100, P60, MW6, MW12, MW24). Al día siguiente, las células fueron lavadas dos veces con PBS1X y se reemplazó el medio de cultivo completo, por uno con 0,5% FBS en lugar de 10% FBS. Las células fueron incubadas durante 48 horas bajo estas condiciones. De esta manera, luego de ser crecidas a altas confluencias en medio FBS 0,5 % durante 48 horas, las células exhiben un marcado arresto del ciclo celular y se realizaron los distintos experimentos.

Tratamientos con drogas

Según los requerimientos de cada experimento, las células fueron tratadas con las distintas drogas que se listan más abajo. Las células control fueron tratadas con el vehículo correspondiente. En todos los casos, las drogas fueron agregadas al medio de cultivo condicionado en el cual las células estaban siendo incubadas antes de realizar los experimentos. En los experimentos que implicaron la utilización de drogas y la irradiación con UV, se pre-incubó con la droga correspondiente en medio condicionado, se irradió, y luego se volvió a agregar el medio condicionado conteniendo la droga o el vehículo según corresponda. Las concentraciones utilizadas y el vehículo correspondiente se indican en cada experimento. Illudin S (MedChemExpress #HY-125098); MG132 (Selleckchem #S2619); Espironolactona (Selleckchem #S4054); Afidicolina (MedChemExpress #HY-N6733); 5,6-Diclorobenzimidazol 1- β -D-ribofuranósido (DRB) (SIGMA #D1916); Inhibidor de CDK7 THZ1 (Selleckchem #S7449); Inhibidor de CDK9 BAY1251152 (Selleckchem #S8730); MLN4924 (Selleckchem #S7109); Inhibidor de ATM KU60019 (Selleckchem #S1570); Inhibidor de DNA-PK NU7441 (Selleckchem #S2638); Inhibidor de ATR AZ20 (MedChemExpress #HY-15557); Inhibidor de ATR VE-822 (Selleckchem #S7102); Inhibidor de ATR AZD6738 (Selleckchem #S7693).

Irradiación con luz UV

La irradiación con luz UV fue realizada utilizando tubos fluorescentes de mercurio, que emiten luz monocromática de 254 nm de longitud de onda (UVC). Para la irradiación, se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con PBS1X, se irradió con las dosis deseadas de UVC y se agregó inmediatamente el medio de cultivo retirado. Las células se irradian en seco para impedir la absorción del UV por parte del medio de cultivo o el PBS. Dado que la luz UV se mide en unidades de *Joule*/metro² (J/m²), la distancia entre la fuente de luz UV y las placas debe ser tenida en cuenta a la hora de realizar la irradiación.

En el IFIBYNE, las células fueron irradiadas con un aparato de irradiación personalizado, en el cual la distancia entre la fuente de luz y las células, y el tiempo de irradiación necesario, fue puesto a punto con un radiómetro externo provisto por el laboratorio de la Dra. Vanesa Gottifredi. En el IFOM, se utilizó un CL-1000 Shortwave Crosslinker (UVP) que cuenta con un radiómetro incorporado, que considera el tiempo y la distancia, y garantiza que la dosis de UV seleccionada sea efectivamente la recibida por las células.

Silenciamiento por siARN

El *knockdown* de los factores de interés fue realizado mediante la transfección de células HaCaT con siARNs específicos para cada factor. Para obtener células arrestadas en G1 y transfectadas con los siARN simultáneamente, se adaptó el protocolo de arresto del ciclo celular. Para ello, las células fueron sembradas en medio completo a un 70% de confluencia utilizando placas *MultiWell* de 12 pocillos. Al día siguiente, fueron transfectadas utilizando el reactivo RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific #13778075) según las instrucciones del fabricante. Los complejos de transfección se prepararon agregando, en un primer tubo 2 μ L de RNAiMAX y 100 μ L de Optimem, mientras que en otro tubo se agregó 1,5 μ L de siARN (20 μ M) y 100 μ L de Optimem. Luego los tubos fueron combinados y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante los 20 minutos de incubación, las células fueron lavadas con PBS1X y se agregó medio completo, pero sin antibiótico, dado que interfiere con la incorporación de los siARN a las células. Finalmente, los 200 μ L resultantes de complejos de transfección se agregaron a cada pocillo y se mantuvieron en incubadora 5% de CO₂ a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente las células se encontraban a un 90% de confluencia, por lo que se retiró el medio de transfección, se lavó dos veces con PBS1X y se agregó medio completo con 0,5 % FBS. Las células se incubaron durante 48 horas en incubadora 5% de CO₂ a 37°C. De esta manera, los experimentos fueron realizados con células arrestadas en G1 y transfectadas con siARN 72 horas antes.

Este protocolo se utilizó para todos los siARN utilizados, obtenidos de la empresa Dharmacon, salvo para los siARN contra CSA y CSB, obtenidos de la empresa Sigma. Estos dos siARN mostraron una menor eficiencia en el silenciamiento, por lo que el protocolo fue modificado de manera de obtener células arrestadas en G1, pero transfectadas con siARN 96 horas antes. Para ello, las células fueron sembradas a una confluencia inicial menor, y el medio de cultivo fue reemplazado por medio completo 0,5% FBS 48 horas luego de la transfección, en lugar de 24 horas, como para el resto de los siARN.

Western Blot

Preparación de las muestras

Las muestras de proteínas se obtuvieron agregando Buffer Laemmli 2X (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, β -Me 10%, SDS 4%, Glicerol 20%). Previamente, las células se lavaron con PBS1X, para eliminar células muertas. Para un pocillo de *MultiWell* de 12 pocillos, se agregó 150 μ L de Buffer Laemmli 2X y se ajustaron estos volúmenes según el formato en el que se encontraban las células. Luego la placa se congeló a -20 °C durante 20 minutos para facilitar

el despegado de las células de la placa, y se transfirió el lisado celular a tubos de 1,5 mL. Se incubó a 95 °C durante 5 minutos y se centrifugó brevemente a máxima velocidad.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Una vez obtenidos los extractos proteicos, realizamos electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Para ello, se prepararon los geles utilizando una unidad de armado de minigeles Bio-Rad, utilizando vidrios que generan geles de 1,5 mm de espesor. Los geles consisten en un gel separador y un gel concentrador. El gel concentrador está compuesto por Tris HCl pH 8,8 375 mM, SDS 0,1% m/v y concentración de poliacrilamida variable según el peso molecular de la proteína de interés que se quiere estudiar. El gel separador está compuesto por HCl pH 6,8 125 mM, SDS 0,1% m/v y poliacrilamida 4%. Se preparó primero el gel separador (7 mL por gel), y se depositó con cuidado entre los vidrios. Una vez polimerizado, se añadió el gel concentrador (3 ml por gel), colocando el peine que forma los pocillos. Las muestras fueron sembradas en el gel concentrador y corridas en buffer Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0,1% m/v. Primero se corrieron las muestras durante 15 minutos a 100 V para que ingresen al gel separador, y luego durante 45 minutos a 200 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel separador. Se utilizó un marcador de peso molecular Bio-Rad que permite conocer el peso relativo de las proteínas separadas en el gel.

Este protocolo experimental fue realizado en el IFIBYNE. Para la detección de RPB1 por western blot, se utilizó un gel separador 8%. En el IFOM se realizaron los western blots de manera similar, pero utilizando geles comerciales NuPAGE® precast 4–12% (Invitrogen). La diferencia entre geles caseros y pre-cast solamente genera distintos grados de separación entre la banda Ilo y Ila de RPB1, como se puede observar a lo largo de los western blots de RPB1 presentados en esta tesis.

Transferencia de las proteínas

Luego de la corrida electroforética, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para ello, se utilizó el sistema de transferencia de minigeles Bio-Rad utilizando buffer Tris 25 mM, glicina 250 mM y metanol 20% v/v y se aplicó una corriente de 100 V durante 2 horas. El dispositivo de transferencia utilizado fue mantenido en hielo en todo momento, para evitar un aumento de la corriente que pueda afectar la transferencia. Finalmente, la membrana fue teñida con el colorante Ponceau S, que se une de manera inespecífica a proteínas y permite verificar la presencia de proteínas totales en la membrana. La

membrana fue cortada en regiones de distintos pesos moleculares, para poder revelar a partir de un mismo gel, proteínas de distintos tamaños.

Incubación con anticuerpos y revelado de las proteínas

Una vez obtenidos los fragmentos deseados, se realizó el bloqueo de las membranas durante 1 hora con una solución de leche en polvo descremada 5 % m/v en buffer Tris HCl pH 7,6 50 mM, NaCl 150 mM y Tween 0,1% v/v (TTBS). Este paso se realiza para recubrir las proteínas de la membrana con las proteínas de la leche, y así favorecer que los anticuerpos utilizados solo reconozcan su proteína específica. Luego del bloqueo, se incubó con una preparación de anticuerpo primario específico (diluido en la misma solución de bloqueo, generalmente 1/1000) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó la membrana tres veces con TTBS, para remover restos de anticuerpo primario. Luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una preparación de anticuerpo secundario, que reconoce la especie en la cual fue realizado el anticuerpo primario. Finalmente, se lavó tres veces con TTBS y se revelaron las membranas.

En el IFIBYNE utilizamos anticuerpos secundarios acoplados a una molécula fluorescente (IRDye 800CW Li-Cor), para su detección con el equipo Odyssey (Li-Cor). En el IFOM, utilizamos anticuerpos secundarios conjugados con HRP, para su detección con un sustrato quimioluminiscente ECL y el equipo ChemiDoc (Bio-rad). En ambos casos, la cuantificación de las proteínas identificadas fue realizada utilizando el software ImageStudio (Li-Cor). La lista de anticuerpos utilizados se muestra en la Tabla M1 al final de esta sección.

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), o un equivalente de otros fabricantes, siguiendo las instrucciones del proveedor y empleando en todo momento plásticos y soluciones libres de ARNasas.

Para la purificación de ARN total, se lavaron los pocillos con PBS1X para eliminar células muertas, y se agregó el volumen correspondiente de TRIzol (1 ml para P100, 500 µL para formatos de menor tamaño). El lisado celular se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se agregó cloroformo 100%, en una proporción equivalente al 20% del volumen inicial de TRIzol. Luego de mezclar por inversión, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa. Seguidamente, se añadió isopropanol en un volumen igual al de la fase acuosa y se agregaron 20 µg de glucógeno para favorecer la precipitación del ARN. Tras una incubación de al menos 30 minutos a -20°C, se

centrifugó a 12.000 g durante 8 minutos, y se obtuvo un pellet de ARN. Para eliminar sales, se realizó un lavado con 500 µL de etanol 70% v/v en agua bidestilada, volviéndose a centrifugar a 8000 g durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet hasta que adquirió una apariencia transparente. Finalmente, el ARN se resuspendió en el volumen de agua deseado y se incubó a -80 °C durante 20 minutos. Luego se realizó un *shock* térmico incubando durante 5 minutos a 55°C, para favorecer la resuspensión del ARN.

La concentración de la muestra se determinó utilizando un espectrofotómetro Qubit y el reactivo Qubit RNA *High Sensitivity*, que determina a través de un fluoróforo que se une de manera específica al ARN su concentración. Para ello, se preparó el reactivo Qubit mezclando 199 µL de Buffer Qubit y 1 µL del fluoróforo Qubit. Luego, se añadió 199 µL del reactivo Qubit y 1 µL de ARN a un tubo de 0,5 mL y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la concentración de ARN. Se realizó una calibración con estándares de concentración conocida cada vez que se realizó una medición.

La pureza del ARN se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop, que efectúa un barrido en distintas longitudes de onda para medir la absorbancia de la muestra. El software calcula la concentración a partir de la absorbancia a 260 nm, mientras que la pureza se determina a partir del cociente de absorbancias 260/280 y 260/230. La integridad del ARN se verificó mediante una corrida en gel nativo de agarosa al 1% m/v con lavandina al 1% v/v, a 110 V durante 30 minutos. Una preparación óptima de ARN exhibe tres bandas principales, correspondientes (de mayor a menor tamaño) a los ARNr 28S, ARNr 18S y ARNr 5,8S.

Retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Para evaluar los niveles de ARNm maduro, primero se realizó una reacción de retrotranscripción para generar una copia de ADN (ADNc) a partir del ARN. Para ello, se incubaron 2 µL de ARN con 0,125 µL de *random decamers* (1 µg/µL) y 0,5 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM en un volumen de reacción de 4 µL. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C para favorecer el apareamiento de los *random decamers* con el ARN, y desnaturalizar estructuras secundarias que pueden interferir con el proceso de retrotranscripción. A continuación, se agregó el buffer de retrotranscripción para obtener una concentración 1X, y 0,2 µL de la enzima M-MLV retrotranscriptasa, en un volumen final de reacción de 10 µL. Finalmente, se incubó la mezcla durante 1 hora a 37 °C, y luego 15 minutos a 70 °C para inactivar la enzima. Se utilizó una termocicladora de mesada marca Bio-Rad. El ADNc sintetizado a partir de los ARN se reservó en hielo para su posterior análisis por PCR cuantitativa (qPCR).

Para evaluar los niveles de ARN maduro, se realizó una PCR cuantitativa a partir del ADNc generado en el proceso de retrotranscripción. Para ello se utilizó una *MasterMix* comercial desarrollada por Thermo Fisher Scientific que posee Taq Polimerasa y todos los componentes necesarios para realizar la PCR. Además, posee el fluoróforo *SyBr Green*, que al intercalarse entre las hebras del ADN aumenta su fluorescencia y permite estimar la cantidad de ADN en cada pocillo de reacción. Se utilizaron placas de 96 pocillos en una termocicladora Eppendorf RealPlex 2, que cuenta con un detector de fluorescencia de *SyBr Green*. La qPCR se realizó con 6,25 μL de *MasterMix* 2X, 0,25 μL de *primers* específicos (10 μM), 2,5 μL del ADNc y agua bidestilada hasta completar un volumen de reacción de 12,5 μL por pocillo. El protocolo de amplificación de PCR utilizado consistió en:

- Desnaturalización inicial y activación de la Taq Polimerasa: 5 minutos a 95 °C.
 - 1 - Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C.
 - 2 - *Annealing*: 30 segundos a 60 °C.
 - 3 - Elongación: 30 segundos a 72 °C.
 - 4 - Pasos 2 a 4 por 40 ciclos.
- Elongación final: 2 minutos a 72 °C.

Tras cada fase de elongación, se midió la fluorescencia emitida por el *SyBr Green* para monitorear la amplificación ciclo a ciclo. Para cada par de *primers* utilizado, se realizó una curva estándar a partir de un *pool* de muestras, con el fin de determinar la eficiencia de amplificación, y establecer un umbral de fluorescencia en el cual la fluorescencia medida en función del logaritmo de la concentración relativa ajusta a una recta. Se realizaron diluciones de la curva estándar y las muestras de manera tal que el umbral de detección de las muestras se ubique entre el primer y último punto de la curva, y así garantizar que la amplificación medida se encuentra dentro de la linealidad de la curva estándar. Además, la curva estándar se utiliza para estimar la cantidad inicial de molde en cada muestra, y de esta manera comparar la abundancia relativa entre muestras.

Por último, al final de los 40 ciclos de amplificación, se realizó una curva de desnaturalización del ADN amplificado, en la cual los pocillos son calentados desde 60 °C hasta 100 °C durante 15 minutos, midiendo la fluorescencia cada 0,1 °C. De este modo, dado que la temperatura de desnaturalización del ADN varía en función de la secuencia y longitud de cada amplicón, se puede monitorear la presencia en cada pocillo de un único pico de desnaturalización que corresponde a un único producto de amplificación por par de *primers*. La abundancia de los ARNm mensajeros fue relativizada a los niveles de ARN mensajero de U6, un *housekeeping* ampliamente

utilizado dado que sus niveles se mantienen invariables frente a una gran variedad de tratamientos. La lista de *primers* utilizados se muestra en la Tabla M2 al final de esta sección

Detección de ARN naciente por dot blot

Este experimento se realizó según el protocolo descrito en (Gregersen et al., 2020). Para el marcado metabólico de los ARN nacientes, las células fueron incubadas durante 15 minutos con el análogo de uridina 4sU 1 mM en medio de cultivo condicionado, y luego se purificó ARN total utilizando el reactivo TRIzol según se indica en “Extracción de ARN total”. El pulso de 15 minutos se realizó de manera escalonada, garantizando que cada una de las condiciones experimentales analizadas fueran incubadas exactamente por 15 minutos. Luego de cuantificar el ARN total, se mezclaron 5 µg de ARN con biotina-XX MTSEA (Biotium #BT90066) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Esto permite que el ARN naciente sea biotinilado a través del grupo sulfhidrilo del 4sU, que se une covalentemente a la biotina. Luego, el ARN naciente biotinilado fue purificado nuevamente con Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1) para descartar la biotina en exceso. Si bien es altamente ineficiente para la purificación de ARN, este paso se realiza con fenol básico, dado que el fenol ácido puede romper la unión entre la biotina y el 4sU. Finalmente, el ARN re-purificado se inmovilizó sobre una membrana de Nylon utilizando un aparato de Dot Blot acoplado a una bomba de vacío (Biorad #1706545). Luego de *dotear* las muestras, se realizó el *crosslinking* del ARN a la membrana a través de la irradiación con 2000 J/m² de luz UV. Las membranas fueron luego incubadas con una solución de bloqueo SDS 10%, EDTA 500 mM, PBS1X durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido de incubación con una dilución 1:50000 del fluoróforo Alexa Fluor 790 conjugado a estreptavidina, que se une fuertemente a la biotina. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces con tres diluciones seriadas 1:10 del buffer de lavado (SDS 10%), completando un total de 9 lavados. La señal de Alexa Fluor 790-estreptavidina fue revelada con el equipo de detección Odyssey (Li-Cor). Luego de revelar las membranas, fueron lavadas una vez con agua bidestilada y teñidas durante 10 minutos con una solución de azul de metileno (0,5% azul de metileno, 0,5M acetato de sodio) y lavadas múltiples veces con agua bidestilada durante 24 horas. La tinción con azul de metileno permite revelar el ARN total y sirve como control de carga. La cuantificación de la señal de Alexa Fluor 790-estreptavidina y de azul de metileno detectada en cada pocillo fue realizada utilizando el software ImageStudio (Li-Cor). Los niveles de ARN nacientes fueron reportados como el cociente entre la señal de Alexa Fluor 790-estreptavidina y el azul de metileno para cada pocillo. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla M1 al final de esta sección.

Southern blot

Para evaluar los niveles de reparación del daño en el ADN se realizó un ensayo de southern blot seguido por la incubación con anticuerpos que reconocen el daño. Para ello, se irradiaron las células con luz UV y se cosechó 30 minutos, 1 hora y 4 horas más tarde. Se extrajo el ADN genómico con el kit comercial de QIAGEN QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen #51304), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado por Qubit siguiendo un protocolo similar al de cuantificación de ARN total mostrado en "Extracción de ARN total". Las muestras se sembraron en un gel de agarosa 0,8 % m/v y se corrieron durante 1 h a 100 V en buffer TAE 1X. Dado que se analizaron tanto 6-4PPs como ssDNA, cada muestra de ADN se sembró dos veces: 600 ng de ADN para los 6-4PPs y 200 ng para el ssDNA. Luego de la corrida electroforética, el ADN genómico migra unos pocos milímetros en el gel, y puede ser transferido a una membrana de Nylon. En el caso del gel sembrado para detectar ssDNA, se obtuvieron imágenes utilizando un trans-iluminador UV con el fin de obtener la señal de bromuro de etidio, evitando exponer al UV al gel destinado a los 6-4PPs. Luego, ambos geles se incubaron durante 10 minutos en 0,25 M HCl para su depurinación; a continuación, se lavó con agua y se agitó durante 30 minutos en una solución desnaturalizante (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), seguida de otros 30 minutos en una solución de 0,1 M acetato de amonio y 40 μ M NaOH. Luego de estos pasos, se procedió a realizar la transferencia del ADN genómico, desde los geles a la membrana. Para ello, una membrana de nylon Hybond+ (Amersham Hybond-XL GE Healthcare) se equilibró en buffer SSC10X (1,5 M NaCl, 0,15 M Tris-Na Citrato, pH 5) y se montó la transferencia capilar: se colocó un papel Whatman 3M sumergido en SSC10X sobre un soporte plástico, ubicando encima el gel y luego la membrana equilibrada, retirando cuidadosamente cualquier burbuja. Se cubrió la membrana con parafilm en los laterales para evitar que la transferencia ocurra por los costados de los geles y se añadió más papel Whatman 3M, añadiendo aproximadamente 0,5 kg de peso para favorecer la transferencia capilar durante toda la noche. Al día siguiente, se desmontó el "sándwich" de transferencia capilar, se dejó secar la membrana y se realizó el *crosslinking* del ADN con la membrana incubando a 80 °C durante 2 horas. Seguidamente, la membrana se equilibró en PBS1X con 0,1% Tween (PBST) y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada 5 % m/v en PBS 1X Tween 0,1% (PBST). Luego se lavó la membrana una vez con PBST, y se incubó durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios (anti-6-4PPs o anti-ssDNA) preparados en BSA 5 % m/v en PBST. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con buffer TENT (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 0,1% Tween), y se incubó durante 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados a HRP preparados en la solución de bloqueo. Por último, se lavaron las membranas tres veces con buffer TENT y luego se incubaron las membranas con el sustrato quimioluminiscente ECL para la detección de los anticuerpos secundarios. La señal de quimioluminiscencia se detectó utilizando el equipo ChemiDoc (Bio-rad). Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla M1 al final de esta sección.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para el análisis del ciclo celular, evaluamos la cantidad de ADN teñido con Ioduro de Propidio por citometría de flujo. Para ello, las células fueron levantadas en 1 mL de PBS1X frío utilizando un *scraper* y centrifugadas a 300 g durante 5 minutos. El PBS1X fue aspirado y las células fueron resuspendidas en etanol 70% v/v, *pipeteando* hacia arriba y abajo para evitar la agregación de las células. Luego se incubó durante 2 horas a 4 °C para fijar las células, y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos. El etanol restante se lavó con PBS1X y los pellets celulares se resuspendieron en 1 mL de una solución de Ioduro de Propidio (Ioduro de propidio 120 mM, Triton X-100 0,1%, RNasa A 100 ng/μL en PBS1X) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron *vortexeadas* y los niveles de fluorescencia del Ioduro de Propidio se midieron con un citómetro de flujo FACS Aria II. Para cada muestra se analizaron al menos 10.000 eventos, y la calidad de los datos se evaluó en dos etapas de *gating*: en un primer gráfico de dispersión frontal (FSC) en función de la dispersión lateral (SSC) se definió la población celular. Sobre esta población se estableció un segundo *gate* en el gráfico de área (FSC-A) en función del máximo de dispersión frontal (FSC-H), de modo de excluir agregados celulares y garantizar la detección de células individuales. Finalmente, se registró la señal de fluorescencia en el canal correspondiente al Ioduro de Propidio, se generó un histograma de fluorescencia y utilizando un modelo de ajuste se estableció la distribución de la población en G1, S y G2/M y se asignó cada célula identificada a su fase del ciclo celular en función de la intensidad de fluorescencia.

Generación de líneas celulares estables CRISPR-Cas9 KO

Los clones CRISPR-Cas9 XPE KO de HaCaT fueron obtenidos como se describe en (Muñoz et al., 2017). Los clones CRISPR-Cas9 XPC fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito en (Ran et al., 2013). Los ARNg para Cas9 fueron diseñados utilizando la plataforma diseñada por el Dr. Zhang, disponible a través del sitio www.benchling.com, dirigidos contra el primer exón de XPC. Estos guías fueron clonados en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). Luego, células HaCaT WT fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes y *sorteados* por citometría de flujo, seleccionando aquellas células que mayores niveles de GFP expresaran. Los clones individuales fueron obtenidos mediante dilución límite de los *pools* obtenidos luego del *cell sorting*. Los *pools* doble KO XPC/DDB2 fueron obtenidos de manera similar, pero realizando el KO de XPC que aquí se describe sobre el *background* genético de células XPE KO, en lugar de sobre células WT. Los clones CRISPR-Cas9 KO para XPA fueron obtenidos de manera similar que los clones XPC KO, pero diseñando guías contra el primer exón de XPA. La secuencia de cada ARNg está presentada en la Tabla M2 al final de esta sección.

Inmunoprecipitación de proteínas

Para la inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en residuos SQ/TQ, se utilizó el anticuerpo Phospho-ATM/ATR Substrate Motif [(pS/pT) QG] MultiMab® Rabbit mAb mix #6966 desarrollado por la empresa Cell Signaling. A continuación, se describe el protocolo utilizado para las inmunoprecipitaciones que luego fueron analizadas por espectrometría de masas, y se aclaran diferencias respecto a las que fueron analizadas por western blot. Todos los *buffers* utilizados, así como los pasos realizados, se mantuvieron a 4 °C o en hielo para preservar la integridad de las muestras y minimizar la degradación proteica.

Preparación del lisado celular

Las células fueron crecidas en placas P100 (tres placas por cada condición experimental) y arrestadas en G1. Luego de realizar los tratamientos correspondientes con UV o los inhibidores de ATR, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se cosecharon con *scraper* en presencia de 750 µL de *buffer* de lisis, que contiene Tris-HCl pH 7,6 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Glicerol 2%, Inhibidores de fosfatasa (1 cápsula por cada 10 mL de *buffer*), Inhibidor de proteasas (1 cápsula por cada 10 mL de *buffer*), Benzonasa 50 U/mL. Los extractos celulares fueron recolectados en tubos falcon de 15 mL (o tubos de 1,5 mL para las IP analizadas por WB). Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 4 °C en un rotor para favorecer la lisis celular. Luego de la incubación, los lisados celulares fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a tubos limpios de 2 mL, desechando el pellet conteniendo detritos celulares.

***Pre-clearing* del lisado celular**

Para los análisis por espectrometría de masas, cada muestra fue incubada con 30 µL de Dynabeads durante 30 minutos a 4 °C en rotor, con el objetivo de eliminar proteínas que se unen inespecíficamente a las Dynabeads. Finalizado este paso, las muestras fueron colocadas en un soporte magnético (Magnarack), se recuperó el sobrenadante y se desecharon las Dynabeads. No se realizó el *pre-clearing* para las muestras analizadas por western blot.

Cuantificación de proteínas

La concentración proteica de cada muestra fue cuantificada utilizando el kit Pierce BCA (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una curva estándar utilizando sero-albúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas, y se midió la absorbancia a 562 nm. Una vez cuantificadas las muestras, se

diluyeron en *buffer* de lisis para normalizar las concentraciones proteicas entre las distintas condiciones experimentales.

Inmunoprecipitación

Se reservó una alícuota de cada muestra para analizar el *Input* previo a la inmunoprecipitación. Para ello, se mezcló el 5% de la muestra con un volumen equivalente de buffer Laemmli 2X, y se reservó a -80 °C. Cada muestra fue incubada con el anticuerpo anti-p(SQ/TQ) en una proporción de 1 µg de anticuerpo por cada 300 µg de proteína total. Se incubó en rotor durante toda la noche a 4 °C. Para los análisis por espectrometría de masas, se utilizaron 2,5 mg de extracto proteico. Para los análisis por western blot se utilizaron 500 µg. Al día siguiente, se añadieron 20 µL de Dynabeads prelavadas por cada 1 µg de anticuerpo. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C en rotor. Posteriormente, las muestras se colocaron en el soporte magnético (Magnarack) para separar el sobrenadante del complejo inmunoprecipitado. El sobrenadante, denominado *flowthrough*, fue conservado para evaluar la eficiencia de la inmunoprecipitación mediante western blot (resultados no mostrados). Las Dynabeads con el complejo inmunoprecipitado fueron lavadas tres veces con *buffer* de lisis frío para eliminar proteínas unidas inespecíficamente a las Dynabeads. Finalmente, las Dynabeads se resuspendieron en 50 µL de buffer Laemmli 2X.

Preparación de Dynabeads

Cada vez que se utilizaron Dynabeads, las mismas fueron pre-lavadas con buffer de lisis 3 veces y resuspendidas en *buffer* de lisis en el mismo volumen que el originalmente tomado.

Análisis por espectrometría de masas

Ambos ensayos de proteómica fueron realizados en la Unidad de Espectrometría de Masas (UEM-IFOM) del IFOM. El 5% de los extractos inmunoprecipitados fueron confirmados por western-blot antes de entregar las muestras a la UEM, quienes realizaron la preparación de las muestras y la identificación por espectrometría de masas y asistieron en el análisis de los datos. Ambas proteómicas fueron realizadas por simplificado en años distintos y con inhibidores de ATR distintos. Dado que se trata de metodologías experimentales distintas, los datos no pueden ser *poolados* para realizar análisis estadísticos, pero sí realizamos el solapamiento de los factores identificados en cada uno de los ensayos. De esta manera, consideramos que los factores identificados son factores efectivamente fosforilados por ATR. El procedimiento experimental y el análisis de los datos se realizó según (Kidiyoor et al., 2020).

“SILAC-Proteomics”

Las células HaCaT se cultivaron en medios SILAC conteniendo L-lisina y L-arginina marcadas con isotopos *Heavy* o *Light* durante 5 días, asegurando una adecuada incorporación isotópica. Para el SILAC1, las células crecidas en aminoácidos *Heavy* no fueron irradiadas, y las células crecidas con aminoácidos *Light* fueron irradiadas con 20 J/m² de UV. Para el SILAC2, las células crecidas en aminoácidos *Heavy* fueron incubadas durante 1 hora con el inhibidor de ATR AZ20 1 µM, e irradiadas con 20 J/m² de UVC, mientras que las células crecidas en aminoácidos *Light* tuvieron el mismo tratamiento que para el SILAC1. Todas las células se cosecharon 3 horas luego de la irradiación. Para poder comparar entre SILACs utilizamos el mismo extracto de células crecidas en aminoácidos *Light*. Por lo tanto, no contamos con la condición experimental sin irradiar y con inhibidor de ATR, representando una limitación metodológica. La inmunoprecipitación se realizó como se indica más arriba, con la particularidad de que los extractos proteicos fueron *pooleados* inmediatamente antes de agregar los anticuerpos para la inmunoprecipitación. Las proteínas inmunoprecipitadas se corrieron en un gel NuPAGE® precast 4–12% (Invitrogen) y se tiñeron con Coomassie Colloidal Blue. Cada calle del gel se cortó en diez fragmentos, cada uno de los cuales fue reducido, alquilado y digerido con tripsina, tal como ha sido reportado previamente (Restuccia et al., 2009). Las mezclas de péptidos fueron desaladas y concentradas utilizando una columna desalinizadora C18 preparada en el laboratorio, y luego se inyectaron en un equipo nanoHPLC (EasyLC Proxeon, Denmark). La separación de los péptidos se realizó en una columna de sílice fundida (fused silica capillary column) en fase reversa de 25 cm de largo (75 µm i.d.) empacada con ReproSil AQ C18 de 3 µm (Dr. Maisch GmbH, Germany). Para la separación se utilizó un gradiente de *buffers* A (agua grado HPLC con 0.1% v/v ácido fórmico) y B (Acetonitrilo con 20% v/v de agua y 0.1% v/v ácido fórmico), desde 7% hasta 60% de B durante 30 minutos, con un flujo constante de 250 nl/min. El sistema LC fue conectado a un espectrómetro de masas QExactiveHF (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipado con una fuente de ionización nanoelectrospray (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). Los espectros de masa totales (full scan) fueron adquiridos en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap, con la resolución establecida en 60,000 (@200 m/z) acumulando iones hasta un valor objetivo de 6,000,000. El rango de adquisición de masas para cada muestra fue de m/z 300–1650 Da y los análisis fueron realizados por duplicado. Los 15 iones más intensos con cargas dobles y triples fueron seleccionados automáticamente y fragmentados en la trampa de iones luego de acumularse hasta un "valor objetivo" de 15,000. Los iones seleccionados para MS/MS fueron excluidos dinámicamente durante 20 s. La identificación y cuantificación de péptidos y proteínas se realizó con MaxQuant 1.5.2.8 contra el proteoma humano completo de Uniprot, considerando la identificación de una proteína con al menos dos péptidos (uno único) y una longitud mínima de seis aminoácidos.

Una vez obtenidos los péptidos se realizó el análisis de los datos con el software Perseus 1.5.2.6 (Cox and Mann, 2008) para identificar diferencias H/L significativas según la significancia B descrita en (Cox and Mann, 2008). Para ello, se normalizaron los cocientes H/L de manera que el promedio de la distribución de cocientes sea igual a 0. Sobre la distribución de cocientes normalizada se aplicó una función gaussiana y se estableció un umbral de significancia H/L normalizado igual a $\pm 1,96$ desvíos estándar. De esta manera, los *outliers* de la distribución fueron considerados factores identificados diferencialmente en una condición u otra con un 95% de confianza (Significancia B). Si bien podríamos haber realizado una imputación de los datos para los cuales la intensidad detectada en alguna de las condiciones era 0, estos factores fueron excluidos del análisis y curados manualmente, definidos como “ON-OFF”. Este procedimiento se realizó para cada SILAC por separado. Finalmente, solapamos los resultados de ambos SILAC y nos quedamos exclusivamente con aquellas proteínas que son *outliers* (o factores ON/OFF) enriquecidos específicamente en la muestra crecida con aminoácidos *Light* (Células irradiadas con UV, pero sin inhibidor de ATR). De esta manera, identificamos proteínas fosforiladas en respuesta al UV (SILAC1), que dejan de ser fosforiladas en presencia del inhibidor de ATR (SILAC2).

“Shotgun-Proteomics”

Para el ensayo de *Shotgun-Proteomics* incubamos durante 1 hora con los inhibidores VE-822 5 μ M y AZD6738 2 μ M o DMSO como control, e irradiamos con 20 J/m² de UV. Las muestras fueron cosechadas 3 horas luego de la irradiación e inmunoprecipitadas como se indica más arriba. El procedimiento experimental fue similar al del *SILAC-Proteomics*, pero las muestras fueron inmunoprecipitadas por separado, digeridas por separado e inyectadas secuencialmente en el espectrómetro de masas. Para este análisis las proteínas fueron identificadas usando Mascot (v. 2.3.02), y analizadas utilizando Scaffold (v. 4.3.4) con los mismos criterios que antes. Se analizó la abundancia de cada proteína a partir de su *exclusive unique peptide count*. Al tratarse de un ensayo de *Shotgun-Proteomics* realizado por simplificado, no analizamos cambios en la abundancia de *exclusive unique peptide count*. En cambio, consideramos positivas aquellas proteínas identificadas exclusivamente en respuesta al UV, y ausentes en el resto de las condiciones experimentales (ON-OFF).

Secuenciación de ARN asociado a la cromatina

El ensayo de secuenciación asociado a la cromatina se realizó en colaboración el grupo del Dr. Nicholas Proudfoot, (Universidad de Oxford, Oxford, Reino Unido). Las células fueron tratadas en las distintas condiciones

experimentales, y luego se procedió a la extracción del ARN cromatínico siguiendo el protocolo descrito en (Zukher et al., 2023). Para ello, las células fueron cosechadas con *scraper* en 1 mL de PBS1X, centrifugadas a 500 g durante 5 minutos, y los pellets celulares lisados en buffer de alta salinidad (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl y 10 mM MgCl₂) en agitación durante 15 minutos a 4 °C. El lisado fue centrifugado a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener el pellet de cromatina. Luego, el pellet se resuspendió en 200 µL de buffer de alta salinidad y se incubó con 2 µL de TURBO DNase (Life Technologies) durante 15 minutos a 37 °C, para degradar la cromatina. Posteriormente, se llevó a cabo un tratamiento con proteinasa K en presencia de 0,2% SDS durante 10 minutos a 37 °C para degradar las proteínas. Finalmente, el ARN cromatínico fue extraído utilizando fenol-cloroformo ácido y precipitado con isopropanol al 70%. Para garantizar la eliminación de restos de ADN, el pellet fue sometido a una segunda digestión con TURBO DNase y posteriormente re-purificado utilizando TRIzol.

Un total de 1 µg del ARN cromatínico obtenido fue tratado con el kit de depleción de ARNr RiboCop rRNA Depletion Kit (Lexogen) según las indicaciones del fabricante. Finalmente, se prepararon las *libraries* de ARN utilizando el kit NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit, y se realizó la secuenciación mediante el sistema NovaSeq 6000 en la empresa Novogene UK.

Las secuencias crudas de ARN cromatínico obtenidas mediante la secuenciación fueron sometidas a un control de calidad utilizando el software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), sin detectarse sesgos inesperados. Posteriormente, se utilizó el software TrimGalore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) en modo *paired-end* para eliminar adaptadores de secuenciación y remover lecturas con baja calidad (Phred score < 20) o con una longitud menor a diez nucleótidos. Las lecturas seleccionadas fueron alineadas contra el genoma de referencia humano GRCh38 mediante el software STAR, estableciendo un puntaje mínimo de alineamiento (`-outFilterScoreMin`) de 10 y excluyendo aquellas lecturas que se mapearon en más de una ubicación del genoma (`-outFilterMultimapNmax 1`), para así considerar únicamente lecturas que se alinearon de forma única. Las lecturas mapeadas contenidas en archivos BAM se separaron en cadenas *forward* y *reverse* utilizando SAMtools según sus *bitwise flags* (83, 163 para forward; 99, 147 para reverse) utilizando el software SAMtools. Luego, los archivos BAM fueron convertidos al formato bedGraph con el software *bedtools genomecov* y finalmente el software *bedGraphToBigWig* se utilizó para comprimir los archivos en formato bigwig. Cada archivo bigwig fue normalizado según el tamaño de la biblioteca, considerando el número total de fragmentos *paired-end* alineados en el archivo BAM original. Los archivos bigWig generados fueron visualizados utilizando

el software Integrated Genome Viewer, y las imágenes resultantes fueron exportadas en formato PDF para su posterior análisis. La escala del eje Y mostrada en la Figura R29 representa el número de lecturas por millón de lecturas mapeadas. Finalmente, todas las unidades transcripcionales consideradas en los análisis se basaron en la anotación génica del genoma humano proporcionada por Ensembl, versión 108 (ensamblado hg38).

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 10. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples corregidas por Bonferroni entre pares de condiciones. Se determinó p-valor $< 0,05$ como criterio de significatividad estadística. En las figuras se muestra el promedio y el error estándar obtenidos para cada condición, y en los epígrafes correspondientes si indica el número de réplicas analizadas.

Primarios		
Anti Rpb1 NTD (Clone D8L4Y)	Cell Signaling	14958
Anti Vinculin (Clone hVIN-1)	Sigma	V9131
Anti XPC	Bethyl	A301-122A
Anti DDB2 (Clone D4C4)	Cell Signaling	5416
Anti XPA	Bethyl	A301-780A
Anti XPB (Clone 2C6)	Cell Signaling	8746
Anti XPD (Clone D3Z6I)	Cell Signaling	11963
Anti XPG	Bethyl	A301-484A
Anti XPF (Clone D3G8C)	Cell Signaling	13465
Anti 6-4 Photoproducts (Clone 64M-2)	CosmoBIO	CAC-NM-DND-002
Anti-ssDNA (Clone 16-19)	Sigma	ZMS1042
Anti-CSB	Bethyl	A301-345A
Anti-CSA (Clone EPR9237)	Abcam	137033
Anti- β -Actina	Cell Signaling	4967
Anti-MED1	Abcam	A300-793A
Anti-MED23	BD Biosciences	550429
Anti-MED4 (Clone EPR7816)	Abcam	129170
Anti-HSP90	Cell Signaling	4874
Anti-CHK1 (p-Ser317)	Cell Signaling	2344
Anti-CHK1 (p-Ser345)	Cell Signaling	2341
Anti-CHK1 (Clone 2G1D5)	Cell Signaling	2360
Anti-ATR (p-T1989) (Clone D5K8W)	Cell Signaling	30632
Anti-p(SQ/TQ)	Cell Signaling	6966
Secundarios		
Alexa Fluor® 790 Streptavidin	JacksonImmuno	016-650-084
Anti-Mouse IRDye 800CW	Li-Cor	926-32210
Anti-Rabbit IRDye 800CW	Li-Cor	926-32211
Anti-Mouse HRP	IFOM	Casero
Anti-Rabbit HRP	IFOM	Casero

Tabla M1: Lista de anticuerpos utilizados en esta tesis.

ARNg XPA Fw	CACCGCGGTGCGGGCGAGTATCGAG
ARNg XPA Rv	AAACCTCGATACTCGCCCGCACCGC
ARNg XPC Fw	CACCGATGGCTCGGAAACGCGCGGC
ARNg XPC Rv	AAACGCCGCGCGTTTCCGAGCCATC
snRNA U6 Fw	CTCGCTTCGGCAGCACA
snRNA U6 Rv	AACGCTTCACGAATTTGCGT
snRNA U6 Rv	AACGCTTCACGAATTTGCGT
ARNm JAG1 Fw	CAAAGTGTGCTCAAGGAGTATC
ARNm JAG1 Rv	GGAATCCCACGCCTCCAC
ARNm EGR1 Fw	CAGCACCTTCAACCCTCAGG
ARNm EGR1 Rv	TGGGTTGGTCATGCTCACTAG
ARNm CXCL8 Fw	CTGCGCCAACACAGAAATTA
ARNm CXCL8 Rv	ATTGCATCTGGCAACCCTAC

Tabla M2: Lista de oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Referencias

- Abdella, R., Talyzina, A., Chen, S., Inouye, C.J., Tjian, R., He, Y., 2021. Structure of the human Mediator-bound transcription preinitiation complex. *Science* 372, 52–56. <https://doi.org/10.1126/science.abg3074>
- Adelman, K., Lis, J.T., 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* 13, 720–731. <https://doi.org/10.1038/nrg3293>
- Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D., Ansari, A.Z., 2009. TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell* 34, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.016>
- Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J.-M., Larsen, A.K., Coin, F., 2014. A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem. Biol.* 21, 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.014>
- Anderson, C.J., Talmane, L., Luft, J., Connelly, J., Nicholson, M.D., Verburg, J.C., Pich, O., Campbell, S., Giaisi, M., Wei, P.-C., Sundaram, V., Connor, F., Ginno, P.A., Sasaki, T., Gilbert, D.M., López-Bigas, N., Semple, C.A., Odom, D.T., Aitken, S.J., Taylor, M.S., 2024. Strand-resolved mutagenicity of DNA damage and repair. *Nature* 630, 744–751. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07490-1>
- Andrade-Lima, L.C., Veloso, A., Paulsen, M.T., Menck, C.F.M., Ljungman, M., 2015. DNA repair and recovery of RNA synthesis following exposure to ultraviolet light are delayed in long genes. *Nucleic Acids Res.* 43, 2744–2756. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv148>
- Anindya, R., Aygün, O., Svejstrup, J.Q., 2007. Damage-Induced Ubiquitylation of Human RNA Polymerase II by the Ubiquitin Ligase Nedd4, but Not Cockayne Syndrome Proteins or BRCA1. *Mol. Cell* 28, 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.008>
- Aoi, Y., Iravani, L., Mroczek, I.C., Gold, S., Howard, B.C., Shilatfard, A., 2025. SPT5 regulates RNA polymerase II stability via Cullin 3-ARMC5 recognition. *Sci. Adv.* 11, eadt5885. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adt5885>
- Aoi, Y., Takahashi, Y.-H., Shah, A.P., Iwanaszko, M., Rendleman, E.J., Khan, N.H., Cho, B.-K., Goo, Y.A., Ganesan, S., Kelleher, N.L., Shilatfard, A., 2021. SPT5 stabilization of promoter-proximal RNA polymerase II. *Mol. Cell* 81, 4413–4424.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.006>
- Apelt, K., Lans, H., Schärer, O.D., Luijsterburg, M.S., 2021. Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 7925–7942. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03984-7>
- Awasthi, P., Foiani, M., Kumar, A., 2016. ATM and ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 1285–1285. <https://doi.org/10.1242/jcs.188631>
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2004. Initiating cellular stress responses. *Cell* 118, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.023>
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>

- Baranovskiy, A.G., Babayeva, N.D., Suwa, Y., Gu, J., Pavlov, Y.I., Tahirov, T.H., 2014. Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. *Nucleic Acids Res.* 42, 14013–14021. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1209>
- Bay, L.T.E., Syljuåsen, R.G., Landsverk, H.B., 2022. A novel, rapid and sensitive flow cytometry method reveals degradation of promoter proximal paused RNAPII in the presence and absence of UV. *Nucleic Acids Res.* gkac434. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac434>
- Beletskii, A., Bhagwat, A.S., 1996. Transcription-induced mutations: Increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13919–13924. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13919>
- Bentley, D.L., 2014. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.* 15, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>
- Bernecky, C., Plitzko, J.M., Cramer, P., 2017. Structure of a transcribing RNA polymerase II-DSIF complex reveals a multidentate DNA-RNA clamp. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 809–815. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3465>
- Besaratinia, A., Yoon, J., Schroeder, C., Bradforth, S.E., Cockburn, M., Pfeifer, G.P., 2011. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB J.* 25, 3079–3091. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187336>
- Biswas, H., Zhao, S.-J., Makinwa, Y., Bassett, J.S., Musich, P.R., Liu, J.-Y., Zou, Y., 2022. Prolyl Isomerization-Mediated Conformational Changes Define ATR Subcellular Compartment-Specific Functions. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 826576. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826576>
- Blackford, A.N., Jackson, S.P., 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Blears, D., Lou, J., Fong, N., Mitter, R., Sheridan, R.M., He, D., Dirac-Svejstrup, A.B., Bentley, D., Svejstrup, J.Q., 2024. Redundant pathways for removal of defective RNA polymerase II complexes at a promoter-proximal pause checkpoint. *Mol. Cell* 84, 4790-4807.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.10.012>
- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351–1362. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310>
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Bouvier, D., Ferrand, J., Chevallier, O., Paulsen, M.T., Ljungman, M., Polo, S.E., 2021. Dissecting regulatory pathways for transcription recovery following DNA damage reveals a non-canonical function of the histone chaperone HIRA. *Nat. Commun.* 12, 3835. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24153-1>
- Branzei, D., Foiani, M., 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 297–308. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>

- Brégeon, D., Doddridge, Z.A., You, H.J., Weiss, B., Doetsch, P.W., 2003. Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 12, 959–970. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00360-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00360-5)
- Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C., Warren, S.L., 1996. UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11586–11590. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11586>
- Cacioppo, R., Gillis, A., Shlamovitz, I., Zeller, A., Castiblanco, D., Crisp, A., Haworth, B., Arabiotorre, A., Abyaneh, P., Bao, Y., Sale, J.E., Berry, S., Tufegdžić Vidaković, A., 2024. CRL3ARMC5 ubiquitin ligase and Integrator phosphatase form parallel mechanisms to control early stages of RNA Pol II transcription. *Mol. Cell* 84, 4808-4823.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.11.024>
- Cambindo Botto, A.E., Muñoz, J.C., Muñoz, M.J., 2018. Coupling between nucleotide excision repair and gene expression. *RNA Biol.* 15, 845–848. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1464354>
- Carnie, C.J., Acampora, A.C., Bader, A.S., Erdenebat, C., Zhao, S., Bitensky, E., van den Heuvel, D., Parnas, A., Gupta, V., D'Alessandro, G., Sczaniecka-Clift, M., Weickert, P., Aygenli, F., Götz, M.J., Cordes, J., Esain-Garcia, I., Melidis, L., Wondergem, A.P., Lam, S., Robles, M.S., Balasubramanian, S., Adar, S., Luijsterburg, M.S., Jackson, S.P., Stingle, J., 2024. Transcription-coupled repair of DNA–protein cross-links depends on CSA and CSB. *Nat. Cell Biol.* 26, 797–810. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01391-1>
- Caron, P., Pankotai, T., Wiegant, W.W., Tollenaere, M.A.X., Furst, A., Bonhomme, C., Helfricht, A., de Groot, A., Pastink, A., Vertegaal, A.C.O., Luijsterburg, M.S., Soutoglou, E., van Attikum, H., 2019. WWP2 ubiquitylates RNA polymerase II for DNA-PK-dependent transcription arrest and repair at DNA breaks. *Genes Dev.* 33, 684–704. <https://doi.org/10.1101/gad.321943.118>
- Cevher, M.A., Shi, Y., Li, D., Chait, B.T., Malik, S., Roeder, R.G., 2014. Reconstitution of active human core Mediator complex reveals a critical role of the MED14 subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2914>
- Chan, D.W., Ye, R., Veillette, C.J., Lees-Miller, S.P., 1999. DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry* 38, 1819–1828. <https://doi.org/10.1021/bi982584b>
- Charlet-Berguerand, N., Feuerhahn, S., Kong, S.E., Ziserman, H., Conaway, J.W., Conaway, R., Egly, J.M., 2006. RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J.* 25, 5481–5491. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601403>
- Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, F.X., Woodfin, A.R., Gardini, A., Rickels, R.A., Marshall, S.A., Smith, E.R., Shiekhhattar, R., Shilatfard, A., 2015. PAF1, a Molecular Regulator of Promoter-Proximal Pausing by RNA Polymerase II. *Cell* 162, 1003–1015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.042>
- Chen, F.X., Xie, P., Collings, C.K., Cao, K., Aoi, Y., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Ugarenko, M., Ozark, P.A., Zhang, A., Shiekhhattar, R., Smith, E.R., Zhang, M.Q., Shilatfard, A., 2017. PAF1 regulation of promoter-proximal pause release via enhancer activation. *Science* 357, 1294–1298. <https://doi.org/10.1126/science.aan3269>

- Chen, M., Manley, J.L., 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 741–754. <https://doi.org/10.1038/nrm2777>
- Chen, X., Velmurugu, Y., Zheng, G., Park, B., Shim, Y., Kim, Y., Liu, L., Van Houten, B., He, C., Ansari, A., Min, J.-H., 2015. Kinetic gating mechanism of DNA damage recognition by Rad4/XPC. *Nat. Commun.* 6, 5849. <https://doi.org/10.1038/ncomms6849>
- Chen, X., Yin, X., Li, J., Wu, Z., Qi, Y., Wang, X., Liu, W., Xu, Y., 2021. Structures of the human Mediator and Mediator-bound preinitiation complex. *Science* 372, eabg0635. <https://doi.org/10.1126/science.abg0635>
- Chodosh, L.A., Fire, A., Samuels, M., Sharp, P.A., 1989. 5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *J. Biol. Chem.* 264, 2250–2257.
- Choudhary, R., Muñoz, J., Beckerman, I., Bastianello, G., Bouvier, L., Foiani, M., Muñoz, M., 2024. RNA Polymerase II Degradation Triggered by DNA Repair Occurs In Trans and Independently of how the Lesion is Recognised. <https://doi.org/10.1101/2024.08.30.610509>
- Ciccio, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Cimprich, K.A., Cortez, D., 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627. <https://doi.org/10.1038/nrm2450>
- Coin, F., Bergmann, E., Tremeau-Bravard, A., Egly, J.M., 1999. Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *EMBO J.* 18, 1357–1366. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1357>
- Coin, F., Oksenych, V., Egly, J.-M., 2007. Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell* 26, 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.009>
- Coin, F., Oksenych, V., Mocquet, V., Groh, S., Blattner, C., Egly, J.M., 2008. Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol. Cell* 31, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.024>
- Collins, R.L., Glessner, J.T., Porcu, E., Lepamets, M., Brandon, R., Lauricella, C., Han, L., Morley, T., Niestroj, L.-M., Ulirsch, J., Everett, S., Howrigan, D.P., Boone, P.M., Fu, J., Karczewski, K.J., Kellaris, G., Lowther, C., Lucente, D., Mohajeri, K., Nõukas, M., Nuttle, X., Samocha, K.E., Trinh, M., Ullah, F., Vősa, U., Epi25 Consortium, Estonian Biobank Research Team, Hurles, M.E., Aradhya, S., Davis, E.E., Finucane, H., Gusella, J.F., Janze, A., Katsanis, N., Matyakhina, L., Neale, B.M., Sanders, D., Warren, S., Hodge, J.C., Lal, D., Ruderfer, D.M., Meck, J., Mägi, R., Esko, T., Reymond, A., Kutalik, Z., Hakonarson, H., Sunyaev, S., Brand, H., Talkowski, M.E., 2022. A cross-disorder dosage sensitivity map of the human genome. *Cell* 185, 3041–3055.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.036>
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P.A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., Dell'Agli, M., 2017. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 2017, 7435621. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>

- Compe, E., Egly, J.-M., 2012. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 343–354. <https://doi.org/10.1038/nrm3350>
- Conaway, R.C., Conaway, J.W., 1989. An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7356–7360. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7356>
- Core, L., Adelman, K., 2019. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation. *Genes Dev.* 33, 960–982. <https://doi.org/10.1101/gad.325142.119>
- Couvillion, M., Harlen, K.M., Lachance, K.C., Trotta, K.L., Smith, E., Brion, C., Smalec, B.M., Churchman, L.S., 2022. Transcription elongation is finely tuned by dozens of regulatory factors. *eLife* 11, e78944. <https://doi.org/10.7554/eLife.78944>
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Crick, F., 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Crick, F.H., 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138–163.
- Decker, T.-M., 2021. Mechanisms of Transcription Elongation Factor DSIF (Spt4-Spt5). *J. Mol. Biol.* 433, 166657. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.09.016>
- Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Karnitz, L.M., 2007. The Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev.* 21, 1472–1477. <https://doi.org/10.1101/gad.1547007>
- Dexheimer, T.S., 2013. DNA Repair Pathways and Mechanisms, in: Mathews, L.A., Cabarcas, S.M., Hurt, E.M. (Eds.), *DNA Repair of Cancer Stem Cells*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 19–32. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4590-2_2
- Doksani, Y., Bermejo, R., Fiorani, S., Haber, J.E., Foiani, M., 2009. Replicon Dynamics, Dormant Origin Firing, and Terminal Fork Integrity after Double-Strand Break Formation. *Cell* 137, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.016>
- Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D., Hanawalt, P.C., 1994. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 8502–8506. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8502>
- Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J., Espinosa, J.M., 2010. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 194–201. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1752>
- Downen, J.M., Fan, Z.P., Hnisz, D., Ren, G., Abraham, B.J., Zhang, L.N., Weintraub, A.S., Schujiers, J., Lee, T.I., Zhao, K., Young, R.A., 2014. Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes. *Cell* 159, 374–387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.030>

- Drogat, J., Migeot, V., Mommaerts, E., Mullier, C., Dieu, M., van Bakel, H., Hermand, D., 2012. Cdk11-CyclinL Controls the Assembly of the RNA Polymerase II Mediator Complex. *Cell Rep.* 2, 1068–1076. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.027>
- Dujardin, G., Lafaille, C., Petrillo, E., Buggiano, V., Gómez Acuña, L.I., Fiszbein, A., Godoy Herz, M.A., Nieto Moreno, N., Muñoz, M.J., Alló, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., 2013. Transcriptional elongation and alternative splicing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, RNA polymerase II Transcript Elongation 1829, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.005>
- Eaton, J.D., West, S., 2020. Termination of Transcription by RNA Polymerase II: BOOM! *Trends Genet.* 36, 664–675. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.05.008>
- Ebmeier, C.C., Erickson, B., Allen, B.L., Allen, M.A., Kim, H., Fong, N., Jacobsen, J.R., Liang, K., Shilatifard, A., Dowell, R.D., Old, W.M., Bentley, D.L., Taatjes, D.J., 2017. Human TFIIH Kinase CDK7 Regulates Transcription-Associated Chromatin Modifications. *Cell Rep.* 20, 1173–1186. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.021>
- Eick, D., Geyer, M., 2013. The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. *Chem. Rev.* 113, 8456–8490. <https://doi.org/10.1021/cr400071f>
- Epanchintsev, A., Costanzo, F., Rauschendorf, M.-A., Caputo, M., Ye, T., Donnio, L.-M., Proietti-de-Santis, L., Coin, F., Laugel, V., Egly, J.-M., 2017. Cockayne's Syndrome A and B Proteins Regulate Transcription Arrest after Genotoxic Stress by Promoting ATF3 Degradation. *Mol. Cell* 68, 1054–1066.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.009>
- Farnung, L., Vos, S.M., 2022. Assembly of RNA polymerase II transcription initiation complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 73, 102335. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102335>
- Fischer, E.S., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G.M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., Iwai, S., Gut, H., Sugawara, K., Thomä, N.H., 2011. The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* 147, 1024–1039. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.035>
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., Ford, J.M., 2003. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem.* 278, 46906–46910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307254200>
- Fujinaga, K., Huang, F., Peterlin, B.M., 2023. P-TEFb: The master regulator of transcription elongation. *Mol. Cell* 83, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.12.006>
- Galbraith, M.D., Allen, M.A., Bensard, C.L., Wang, X., Schwinn, M.K., Qin, B., Long, H.W., Daniels, D.L., Hahn, W.C., Dowell, R.D., Espinosa, J.M., 2013. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* 153, 1327–1339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.048>
- Galloway, A., Cowling, V.H., 2019. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.011>
- Geijer, M.E., Zhou, D., Selvam, K., Steurer, B., Mukherjee, C., Evers, B., Cugusi, S., van Toorn, M., van der Woude, M., Janssens, R.C., Kok, Y.P., Gong, W., Raams, A., Lo, C.S.Y., Lebbink, J.H.G., Geverts, B., Plummer, D.A.,

- Bezstarosti, K., Theil, A.F., Mitter, R., Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W., Demmers, J.A.A., Li, S., van Vugt, M.A.T.M., Lans, H., Bernards, R., Svejstrup, J.Q., Ray Chaudhuri, A., Wyrick, J.J., Marteijn, J.A., 2021. Elongation factor ELOF1 drives transcription-coupled repair and prevents genome instability. *Nat. Cell Biol.* 23, 608–619. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00692-z>
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P., Egly, J.M., 1991. Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.* 266, 20940–20945. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54801-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54801-8)
- Gerlach, P., Garland, W., Lingaraju, M., Salerno-Kochan, A., Bonneau, F., Basquin, J., Jensen, T.H., Conti, E., 2022. Structure and regulation of the nuclear exosome targeting complex guides RNA substrates to the exosome. *Mol. Cell* 82, 2505-2518.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.011>
- Glover-Cutter, K., Larochele, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R.P., Bentley, D.L., 2009. TFIIF-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5455–5464. <https://doi.org/10.1128/MCB.00637-09>
- Gonzalo-Hansen, C., Steurer, B., Janssens, R.C., Zhou, D., van Sluis, M., Lans, H., Marteijn, J.A., 2024. Differential processing of RNA polymerase II at DNA damage correlates with transcription-coupled repair syndrome severity. *Nucleic Acids Res.* 52, 9596–9612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae618>
- Gordon, J., Chapus, F.L., Viverette, E.G., Williams, J.G., Deterding, L.J., Krahn, J.M., Borgnia, M.J., Rodriguez, J., Warren, A.J., Stanley, R.E., 2022. Cryo-EM reveals the architecture of the PELP1-WDR18 molecular scaffold. *Nat. Commun.* 13, 6783. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34610-0>
- Greenberg, J.R., 1979. Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res.* 6, 715–732.
- Gregersen, L.H., Mitter, R., Svejstrup, J.Q., 2020. Using TTchem-seq for profiling nascent transcription and measuring transcript elongation. *Nat. Protoc.* 15, 604–627. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0262-3>
- Gregersen, L.H., Svejstrup, J.Q., 2018. The Cellular Response to Transcription-Blocking DNA Damage. *Trends Biochem. Sci.* 43, 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.02.010>
- Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., Kisselev, A.F., Harel-Bellan, A., Nakatani, Y., 2006. CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin–proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.* 20, 1429–1434. <https://doi.org/10.1101/gad.378206>
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., 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. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00316-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00316-7)
- Guidi, B.W., Bjornsdottir, G., Hopkins, D.C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Myers, L.C., 2004. Mutual Targeting of Mediator and the TFIIF Kinase Kin28*. *J. Biol. Chem.* 279, 29114–29120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404426200>

- Hamperl, S., Bocek, M.J., Saldivar, J.C., Swigut, T., Cimprich, K.A., 2017. Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses. *Cell* 170, 774–786.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.043>
- Hanasoge, S., Ljungman, M., 2007. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 28, 2298–2304. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm157>
- Harlen, K.M., Churchman, L.S., 2017. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.10>
- Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S.E., Banks, C.A.S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Svejstrup, J.Q., 2009. Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20705–20710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907052106>
- He, J., Zhu, Q., Wani, G., Wani, A.A., 2016. UV-induced proteolysis of RNA polymerase II is mediated by VCP/p97 segregase and timely orchestration by Cockayne syndrome B protein. *Oncotarget* 8, 11004–11019. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14205>
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., Eick, D., 2013. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech., RNA polymerase II Transcript Elongation* 1829, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.013>
- Heine, G.F., Horwitz, A.A., Parvin, J.D., 2008. Multiple Mechanisms Contribute to Inhibit Transcription in Response to DNA Damage *. *J. Biol. Chem.* 283, 9555–9561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707700200>
- Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., Tora, L., 2013. Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 412–418. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2543>
- Hendriks, G., Calléja, F., Vrieling, H., Mullenders, L.H.F., Jansen, J.G., de Wind, N., 2008. Gene transcription increases DNA damage-induced mutagenesis in mammalian stem cells. *DNA Repair* 7, 1330–1339. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.04.015>
- Hieb, A.R., Halsey, W.A., Betterton, M.D., Perkins, T.T., Kugel, J.F., Goodrich, J.A., 2007. TFIIA Changes the Conformation of the DNA in TBP/TATA Complexes and Increases their Kinetic Stability. *J. Mol. Biol.* 372, 619–632. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.061>
- Hilton, Benjamin A., Li, Z., Musich, P.R., Wang, H., Cartwright, B.M., Serrano, M., Zhou, X.Z., Lu, K.P., Zou, Y., 2015. ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol. Cell* 60, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.008>
- Hilton, Benjamin A., Li, Z., Musich, P.R., Wang, H., Cartwright, B.M., Serrano, M., Zhou, X.Z., Lu, K.P., Zou, Y., 2015. ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol. Cell* 60, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.008>
- Hoeijmakers, J.H.J., 2009. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>

- Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., Skrzypek, E., 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 43, D512-520. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1267>
- Hu, J., Adar, S., Selby, C.P., Lieb, J.D., Sancar, A., 2015. Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution. *Genes Dev.* 29, 948–960. <https://doi.org/10.1101/gad.261271.115>
- Hu, J., Adebali, O., Adar, S., Sancar, A., 2017. Dynamic maps of UV damage formation and repair for the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 6758–6763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706522114>
- Hübner, M.R., Eckersley-Maslin, M.A., Spector, D.L., 2013. Chromatin Organization and Transcriptional Regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.006>
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jaspers, N.G.J., Raams, A., Kelner, M.J., Ng, J.M.Y., Yamashita, Y.M., Takeda, S., McMorris, T.C., Hoeijmakers, J.H.J., 2002. Anti-tumour compounds illudin S and Irofulven induce DNA lesions ignored by global repair and exclusively processed by transcription- and replication-coupled repair pathways. *DNA Repair* 1, 1027–1038. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00166-0)
- Jette, N., Lees-Miller, S.P., 2015. The DNA-dependent protein kinase: a multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 117, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.003>
- Jia, N., Guo, C., Nakazawa, Y., van den Heuvel, D., Luijsterburg, M.S., Ogi, T., 2021. Dealing with transcription-blocking DNA damage: Repair mechanisms, RNA polymerase II processing and human disorders. *DNA Repair* 106, 103192. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103192>
- Jinks-Robertson, S., Bhagwat, A.S., 2014. Transcription-Associated Mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.* 48, 341–359. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092015>
- Jonkers, I., Kwak, H., Lis, J.T., 2014. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *eLife* 3, e02407. <https://doi.org/10.7554/eLife.02407>
- Jonkers, I., Lis, J.T., 2015. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 167–177. <https://doi.org/10.1038/nrm3953>
- Joo, Y.K., Ramirez, C., Kabeche, L., 2024. A TRilogy of ATR's Non-Canonical Roles Throughout the Cell Cycle and Its Relation to Cancer. *Cancers* 16, 3536. <https://doi.org/10.3390/cancers16203536>
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., Taatjes, D.J., Dekker, J., Young, R.A., 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–435. <https://doi.org/10.1038/nature09380>
- Kamada, K., Roeder, R.G., Burley, S.K., 2003. Molecular mechanism of recruitment of TFIIIF- associating RNA polymerase C-terminal domain phosphatase (FCP1) by transcription factor IIF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2296–2299. <https://doi.org/10.1073/pnas.262798199>

- Kaneko, S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., Manley, J.L., 2007. The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev.* 21, 1779–1789. <https://doi.org/10.1101/gad.1565207>
- Kemp, M.G., 2017. DNA damage-induced ATM- and Rad-3-related (ATR) kinase activation in non-replicating cells is regulated by the XPB subunit of transcription factor IIH (TFIIH). *J. Biol. Chem.* 292, 12424–12435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788406>
- Kemp, M.G., Sancar, A., 2016. ATR Kinase Inhibition Protects Non-cycling Cells from the Lethal Effects of DNA Damage and Transcription Stress. *J. Biol. Chem.* 291, 9330–9342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719740>
- Kidiyoor, G.R., Li, Q., Bastianello, G., Bruhn, C., Giovannetti, I., Mohamood, A., Bezoussenko, G.V., Mironov, A., Raab, M., Piel, M., Restuccia, U., Matafora, V., Bachi, A., Barozzi, S., Parazzoli, D., Frittoli, E., Palamidessi, A., Panciera, T., Piccolo, S., Scita, G., Maiuri, P., Havas, K.M., Zhou, Z.-W., Kumar, A., Bartek, J., Wang, Z.-Q., Foiani, M., 2020. ATR is essential for preservation of cell mechanics and nuclear integrity during interstitial migration. *Nat. Commun.* 11, 4828. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18580-9>
- Kim, H.-J., Yun, J., 2017. Checkpoint-dependent phosphorylation of Med1/TRAP220 in response to DNA damage. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 49, 496–502. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx036>
- Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Bernecky, C., Taatjes, D.J., 2009. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes Dev.* 23, 439–451. <https://doi.org/10.1101/gad.1767009>
- Kokic, G., Wagner, F.R., Chernev, A., Urlaub, H., Cramer, P., 2021. Structural basis of human transcription–DNA repair coupling. *Nature* 598, 368–372. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03906-4>
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., Buratowski, S., 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* 14, 2452–2460. <https://doi.org/10.1101/gad.824700>
- Kornberg, R.D., 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.*, SPECIAL ISSUE: MEDIATOR 30, 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.03.011>
- Kornblihtt, A.R., 2006. Chromatin, transcript elongation and alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 5–7. <https://doi.org/10.1038/nsmb0106-5>
- Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., Muñoz, M.J., 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrm3525>
- Kristensen, U., Epanchintsev, A., Rauschendorf, M.-A., Laugel, V., Stevnsner, T., Bohr, V.A., Coin, F., Egly, J.-M., 2013. Regulatory interplay of Cockayne syndrome B ATPase and stress-response gene ATF3 following genotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2261–2270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220071110>
- Kuper, J., Kisker, C., Van Houten, B., 2024. Unlocking transcription-coupled DNA repair with the STK19 key. *Mol. Cell* 84, 4693–4695. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.11.027>

- Kwak, H., Lis, J.T., 2013. Control of transcriptional elongation. *Annu. Rev. Genet.* 47, 483–508. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155440>
- Lalonde, M., Trauner, M., Werner, M., Hamperl, S., 2021. Consequences and Resolution of Transcription–Replication Conflicts. *Life* 11, 637. <https://doi.org/10.3390/life11070637>
- Lao, L., Bourdeau, I., Gagliardi, L., He, X., Shi, W., Hao, B., Tan, M., Hu, Y., Peng, J., Coulombe, B., Torpy, D.J., Scott, H.S., Lacroix, A., Luo, H., Wu, J., 2022. ARMC5 is part of an RPB1-specific ubiquitin ligase implicated in adrenal hyperplasia. *Nucleic Acids Res.* 50, 6343–6367. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac483>
- Lee, J.-H., Paull, T.T., 2005. ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* 308, 551–554. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>
- Lee, T.-H., Park, J.-M., Leem, S.-H., Kang, T.-H., 2014. Coordinated regulation of XPA stability by ATR and HERC2 during nucleotide excision repair. *Oncogene* 33, 19–25. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.539>
- Lewis, B.A., 2024. The role of O-GlcNAcylation in RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* 300. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105705>
- Li, H., Zhang, Z., Wang, B., Zhang, J., Zhao, Y., Jin, Y., 2007. Wwp2-Mediated Ubiquitination of the RNA Polymerase II Large Subunit in Mouse Embryonic Pluripotent Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5296–5305. <https://doi.org/10.1128/MCB.01667-06>
- Li, W., Giles, C., Li, S., 2014. Insights into how Spt5 functions in transcription elongation and repressing transcription coupled DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 42, 7069–7083. <https://doi.org/10.1093/nar/gku333>
- Li, Y., Liu, Yunhua, Xu, H., Jiang, G., Van der Jeught, K., Fang, Y., Zhou, Z., Zhang, L., Frieden, M., Wang, L., Luo, Z., Radovich, M., Schneider, B.P., Deng, Y., Liu, Yunlong, Huang, K., He, B., Wang, J., He, X., Zhang, X., Ji, G., Lu, X., 2018. Heterozygous deletion of chromosome 17p renders prostate cancer vulnerable to inhibition of RNA polymerase II. *Nat. Commun.* 9, 4394. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06811-z>
- Lindahl, T., Barnes, D.E., 2000. Repair of Endogenous DNA Damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 127–134. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>
- Linhartova, K., Falginella, F.L., Matl, M., Sebesta, M., Vácha, R., Stefl, R., 2024. Sequence and structural determinants of RNAPII CTD phase-separation and phosphorylation by CDK7. *Nat. Commun.* 15, 9163. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53305-2>
- Liu, X., Bushnell, D.A., Wang, D., Calero, G., Kornberg, R.D., 2010. Structure of an RNA Polymerase II–TFIIB Complex and the Transcription Initiation Mechanism. *Science* 327, 206–209. <https://doi.org/10.1126/science.1182015>
- Llerena Schiffmacher, D.A., Lee, S.-H., Kliza, K.W., Theil, A.F., Akita, M., Helfricht, A., Bezstarosti, K., Gonzalo-Hansen, C., van Attikum, H., Verlaan-de Vries, M., Vertegaal, A.C.O., Hoeijmakers, J.H.J., Marteijn, J.A., Lans, H., Demmers, J.A.A., Vermeulen, M., Sixma, T.K., Ogi, T., Vermeulen, W., Pines, A., 2024. The small CRL4CSA ubiquitin ligase component DDA1 regulates transcription-coupled repair dynamics. *Nat. Commun.* 15, 6374. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50584-7>

- Lloyd, R.L., Urban, V., Muñoz-Martínez, F., Ayestaran, I., Thomas, J.C., de Renty, C., O'Connor, M.J., Forment, J.V., Galanty, Y., Jackson, S.P., 2021. Loss of Cyclin C or CDK8 provides ATR inhibitor resistance by suppressing transcription-associated replication stress. *Nucleic Acids Res.* 49, 8665–8683. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab628>
- Luijsterburg, M.S., Goedhart, J., Moser, J., Kool, H., Geverts, B., Houtsmuller, A.B., Mullenders, L.H.F., Vermeulen, W., van Driel, R., 2007. Dynamic in vivo interaction of DDB2 E3 ubiquitin ligase with UV-damaged DNA is independent of damage-recognition protein XPC. *J. Cell Sci.* 120, 2706–2716. <https://doi.org/10.1242/jcs.008367>
- Luo, W., Johnson, A.W., Bentley, D.L., 2006. The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev.* 20, 954–965. <https://doi.org/10.1101/gad.1409106>
- Makinwa, Y., Cartwright, B.M., Musich, P.R., Li, Z., Biswas, H., Zou, Y., 2020. PP2A Regulates Phosphorylation-Dependent Isomerization of Cytoplasmic and Mitochondrial-Associated ATR by Pin1 in DNA Damage Responses. *Front. Cell Dev. Biol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00813>
- Malik, S., Baek, H.J., Wu, W., Roeder, R.G., 2005. Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2117–2129. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.6.2117-2129.2005>
- Malik, S., Molina, H., Xue, Z., 2017. PIC activation through functional interplay between Mediator and TFIIF. *J. Mol. Biol.* 429, 48–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.026>
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>
- Martin, R.M., Rino, J., Carvalho, C., Kirchhausen, T., Carmo-Fonseca, M., 2013. Live-cell visualization of pre-mRNA splicing with single-molecule sensitivity. *Cell Rep.* 4, 1144–1155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.013>
- Matsumoto, M., Yaginuma, K., Igarashi, A., Imura, M., Hasegawa, M., Iwabuchi, K., Date, T., Mori, T., Ishizaki, K., Yamashita, K., Inobe, M., Matsunaga, T., 2007. Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J. Cell Sci.* 120, 1104–1112. <https://doi.org/10.1242/jcs.03391>
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., Elledge, S.J., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>
- Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J., 1998. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* 282, 1893–1897. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1893>
- Max, T., Sogaard, M., Svejstrup, J.Q., 2007. Hyperphosphorylation of the C-terminal Repeat Domain of RNA Polymerase II Facilitates Dissociation of Its Complex with Mediator. *J. Biol. Chem.* 282, 14113–14120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701345200>

- Mayne, L.V., Lehmann, A.R., 1982. Failure of RNA Synthesis to Recover after UV Irradiation: An Early Defect in Cells from Individuals with Cockayne's Syndrome and Xeroderma Pigmentosum¹. *Cancer Res.* 42, 1473–1478.
- McKay, B.C., Stubbert, L.J., Fowler, C.C., Smith, J.M., Cardamore, R.A., Spronck, J.C., 2004. Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6582–6586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308181101>
- Memisoglu, G., Bohn, S., Krogan, N., Haber, J., Ruthenburg, A., 2023. The Kinase Module of the Mediator regulates cell cycle re-entry and transcriptional response following DNA damage. <https://doi.org/10.1101/2023.02.26.530133>
- Mevissen, T.E.T., Kümmecke, M., Schmid, E.W., Farnung, L., Walter, J.C., 2024. STK19 positions TFIIH for cell-free transcription-coupled DNA repair. *Cell* 187, 7091–7106.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.10.020>
- Miller, C., Matic, I., Maier, K.C., Schwalb, B., Roether, S., Strässer, K., Tresch, A., Mann, M., Cramer, P., 2012b. Mediator Phosphorylation Prevents Stress Response Transcription During Non-stress Conditions. *J. Biol. Chem.* 287, 44017–44026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430140>
- Min, J.-H., Pavletich, N.P., 2007. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449, 570–575. <https://doi.org/10.1038/nature06155>
- Mitchell, D.L., Haipek, C.A., Clarkson, J.M., 1985. (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat. Res.* 143, 109–112. [https://doi.org/10.1016/s0165-7992\(85\)80018-x](https://doi.org/10.1016/s0165-7992(85)80018-x)
- Moreno, N.N., Olthof, A.M., Svejstrup, J.Q., 2023. Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair and the Transcriptional Response to UV-Induced DNA Damage. *Annu. Rev. Biochem.* 92, 81–113. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052621-091205>
- Moreno, R.Y., Juetten, K.J., Panina, S.B., Butalewicz, J.P., Floyd, B.M., Venkat Ramani, M.K., Marcotte, E.M., Brodbelt, J.S., Zhang, Y.J., 2023. Distinctive interactomes of RNA polymerase II phosphorylation during different stages of transcription. *iScience* 26, 107581. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107581>
- Muñoz, J.C., Beckerman, I., Choudhary, R., Bouvier, L.A., Muñoz, M.J., 2022. DNA Damage-Induced RNAPII Degradation and Its Consequences in Gene Expression. *Genes* 13, 1951. <https://doi.org/10.3390/genes13111951>
- Muñoz, M.J., Mata, M. de la, Kornblihtt, A.R., 2010. The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem. Sci.* 35, 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.010>
- Muñoz, M.J., Nieto Moreno, N., Giono, L.E., Cambindo Botto, A.E., Dujardin, G., Bastianello, G., Lavore, S., Torres-Méndez, A., Menck, C.F.M., Blencowe, B.J., Irimia, M., Foiani, M., Kornblihtt, A.R., 2017. Major Roles for Pyrimidine Dimers, Nucleotide Excision Repair, and ATR in the Alternative Splicing Response to UV Irradiation. *Cell Rep.* 18, 2868–2879. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.066>
- Muñoz, M.J., Pérez Santangelo, M.S., Paronetto, M.P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., Bird, G., Bentley, D., Bertrand, E., Kornblihtt, A.R., 2009. DNA

- damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* 137, 708–720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.010>
- Musich, P.R., Li, Z., Zou, Y., 2017. Xeroderma Pigmentosa Group A (XPA), Nucleotide Excision Repair and Regulation by ATR in Response to Ultraviolet Irradiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 996, 41–54. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_4
- Nakamura, A., Nakata, D., Kakoi, Y., Kunitomo, M., Murai, S., Ebara, S., Hata, A., Hara, T., 2018. CDK8/19 inhibition induces premature G1/S transition and ATR-dependent cell death in prostate cancer cells. *Oncotarget* 9, 13474–13487. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24414>
- Nakazawa, Y., Hara, Y., Oka, Y., Komine, O., van den Heuvel, D., Guo, C., Daigaku, Y., Isono, M., He, Y., Shimada, M., Kato, K., Jia, N., Hashimoto, S., Kotani, Y., Miyoshi, Y., Tanaka, M., Sobue, A., Mitsutake, N., Suganami, T., Masuda, A., Ohno, K., Nakada, S., Mashimo, T., Yamanaka, K., Luijsterburg, M.S., Ogi, T., 2020. Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair. *Cell* 180, 1228–1244.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.010>
- Nakazawa, Y., Oka, Y., Matsunaga, T., Ogi, T., 2025. Transcription-coupled repair – mechanisms of action, regulation, and associated human disorders. *Febs Lett.* 599, 166–167. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.15073>
- Nam, E.A., Zhao, R., Glick, G.G., Bansbach, C.E., Friedman, D.B., Cortez, D., 2011. Thr-1989 Phosphorylation Is a Marker of Active Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) Kinase*. *J. Biol. Chem.* 286, 28707–28714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248914>
- Nieto Moreno, N., Villafañez, F., Giono, L.E., Cuenca, C., Soria, G., Muñoz, M.J., Kornblihtt, A.R., 2020. GSK-3 is an RNA polymerase II phospho-CTD kinase. *Nucleic Acids Res.* 48, 6068–6080. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa322>
- Nocentini, S., Coin, F., Saijo, M., Tanaka, K., Egly, J.-M., 1997. DNA Damage Recognition by XPA Protein Promotes Efficient Recruitment of Transcription Factor II H*. *J. Biol. Chem.* 272, 22991–22994. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.22991>
- Noe Gonzalez, M., Blears, D., Svejstrup, J.Q., 2021. Causes and consequences of RNA polymerase II stalling during transcript elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 3–21. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00308-8>
- Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A.R.F., Kimura, H., Dye, M.J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., Proudfoot, N.J., 2015. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell* 161, 526–540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.027>
- Nouspikel, T., 2009. DNA Repair in Mammalian Cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 994–1009. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8737-y>
- Oka, Y., Nakazawa, Y., Shimada, M., Ogi, T., 2024. Endogenous aldehyde-induced DNA–protein crosslinks are resolved by transcription-coupled repair. *Nat. Cell Biol.* 26, 784–796. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01401-2>

- Okuda, M., Nakazawa, Y., Guo, C., Ogi, T., Nishimura, Y., 2017. Common TFIIH recruitment mechanism in global genome and transcription-coupled repair subpathways. *Nucleic Acids Res.* 45, 13043–13055. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx970>
- Olivieri, M., Cho, T., Álvarez-Quilón, A., Li, K., Schellenberg, M.J., Zimmermann, M., Hustedt, N., Rossi, S.E., Adam, S., Melo, H., Heijink, A.M., Sastre-Moreno, G., Moatti, N., Szilard, R.K., McEwan, A., Ling, A.K., Serrano-Benitez, A., Ubhi, T., Feng, S., Pawling, J., Delgado-Sainz, I., Ferguson, M.W., Dennis, J.W., Brown, G.W., Cortés-Ledesma, F., Williams, R.S., Martin, A., Xu, D., Durocher, D., 2020. A Genetic Map of the Response to DNA Damage in Human Cells. *Cell* 182, 481–496.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.040>
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., Brunak, S., Mann, M., 2010. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* 3, ra3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000475>
- Passmore, L.A., Collier, J., 2022. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 93–106. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>
- Paul, D., Mu, H., Zhao, H., Ouerfelli, O., Jeffrey, P.D., Broyde, S., Min, J.-H., 2019. Structure and mechanism of pyrimidine–pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex. *Nucleic Acids Res.* 47, 6015–6028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz359>
- Paull, T.T., 2015. Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>
- Peterlin, B.M., Price, D.H., 2006. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol. Cell* 23, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.014>
- Pines, A., Schiffmacher, D.L., Lee, S.-H., Kliza, K., Theil, A., Akita, M., Helfricht, A., Bezstarosti, K., Gonzalo-Hansen, C., Attikum, H. van, Vries, M.V., Vertegaal, A., Hoeijmakers, J., Marteijn, J., Lans, H., Demmers, J., Vermeulen, M., Sixma, T., Ogi, T., Vermeulen, W., 2023. DDA1, a novel factor in transcription-coupled repair, modulates CRL4CSA dynamics at DNA damage-stalled RNA polymerase II. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3385435/v1>
- Plaschka, C., Larivière, L., Wenzek, L., Seizl, M., Hemann, M., Tegunov, D., Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H., Baumeister, W., Herzog, F., Villa, E., Cramer, P., 2015. Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature* 518, 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature14229>
- Poss, Z.C., Ebmeier, C.C., Odell, A.T., Tangpeerachaikul, A., Lee, T., Pelish, H.E., Shair, M.D., Dowell, R.D., Old, W.M., Taatjes, D.J., 2016. Identification of Mediator Kinase Substrates in Human Cells using Cortistatin A and Quantitative Phosphoproteomics. *Cell Rep.* 15, 436–450. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.030>
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M.M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W.F., Dodge, J., Grindey, G., 1994. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* 54, 2419–2423.
- Proietti-De-Santis, L., Drané, P., Egly, J.-M., 2006. Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J.* 25, 1915–1923. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601071>

- Proudfoot, N.J., 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25, 1770–1782. <https://doi.org/10.1101/gad.17268411>
- Qiu, S., Huang, J., 2021. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 22, 31–37. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000289>
- Ramadhin, A.R., Lee, S.-H., Zhou, D., Salmazo, A., Gonzalo-Hansen, C., van Sluis, M., Blom, C.M.A., Janssens, R.C., Raams, A., Dekkers, D., Bezstarosti, K., Slade, D., Vermeulen, W., Pines, A., Demmers, J.A.A., Bernecky, C., Sixma, T.K., Martelijn, J.A., 2024. STK19 drives transcription-coupled repair by stimulating repair complex stability, RNA Pol II ubiquitylation, and TFIIH recruitment. *Mol. Cell* 84, 4740-4757.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.10.030>
- Ratner, J.N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S.L., Bregman, D.B., 1998. Ultraviolet Radiation-induced Ubiquitination and Proteasomal Degradation of the Large Subunit of RNA Polymerase II: IMPLICATIONS FOR TRANSCRIPTION-COUPLED DNA REPAIR*. *J. Biol. Chem.* 273, 5184–5189. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5184>
- Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 88–102. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00206-8)
- Ray, A., Blevins, C., Wani, G., Wani, A.A., 2016. ATR- and ATM-Mediated DNA Damage Response Is Dependent on Excision Repair Assembly during G1 but Not in S Phase of Cell Cycle. *PLoS One* 11, e0159344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159344>
- Reichermeier, K.M., Straube, R., Reitsma, J.M., Sweredoski, M.J., Rose, C.M., Moradian, A., den Besten, W., Hinkle, T., Verschueren, E., Petzold, G., Thomä, N.H., Wertz, I.E., Deshaies, R.J., Kirkpatrick, D.S., 2020. PIKES Analysis Reveals Response to Degradation and Key Regulatory Mechanisms of the CRL4 Network. *Mol. Cell* 77, 1092-1106.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.013>
- Rengachari, S., Schilbach, S., Aibara, S., Dienemann, C., Cramer, P., 2021. Structure of the human Mediator-RNA polymerase II pre-initiation complex. *Nature* 594, 129–133. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03555-7>
- Restuccia, U., Boschetti, E., Fasoli, E., Fortis, F., Guerrier, L., Bachi, A., Kravchuk, A.V., Righetti, P.G., 2009. pI-based fractionation of serum proteomes versus anion exchange after enhancement of low-abundance proteins by means of peptide libraries. *J. Proteomics, Special Section: Clinical Proteomics in Oncology* 72, 1061–1070. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.06.014>
- Rhee, H.S., Pugh, B.F., 2012. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* 483, 295–301. <https://doi.org/10.1038/nature10799>
- Richter, W.F., Nayak, S., Iwasa, J., Taatjes, D.J., 2022. The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 732–749. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00498-3>
- Robinson, P.J., Trnka, M.J., Bushnell, D.A., Davis, R.E., Mattei, P.-J., Burlingame, A.L., Kornberg, R.D., 2016. Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell* 166, 1411-1422.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.050>

- Robinson, P.J., Trnka, M.J., Pellarin, R., Greenberg, C.H., Bushnell, D.A., Davis, R., Burlingame, A.L., Sali, A., Kornberg, R.D., 2015. Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *eLife* 4, e08719. <https://doi.org/10.7554/eLife.08719>
- Rockx, D.A., Mason, R., van Hoffen, A., Barton, M.C., Citterio, E., Bregman, D.B., van Zeeland, A.A., Vrieling, H., Mullenders, L.H., 2000. UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10503–10508. <https://doi.org/10.1073/pnas.180169797>
- Sainsbury, S., Bernecky, C., Cramer, P., 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 129–143. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>
- Saldi, T., Fong, N., Bentley, D.L., 2018. Transcription elongation rate affects nascent histone pre-mRNA folding and 3' end processing. *Genes Dev.* 32, 297–308. <https://doi.org/10.1101/gad.310896.117>
- Saldivar, J.C., Cortez, D., Cimprich, K.A., 2017. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 622–636. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.67>
- Sato, S., Tomomori-Sato, C., Tsai, K.-L., Yu, X., Sardi, M., Saraf, A., Washburn, M.P., Florens, L., Asturias, F.J., Conaway, R.C., Conaway, J.W., 2016. Role for the MED21-MED7 Hinge in Assembly of the Mediator-RNA Polymerase II Holoenzyme*. *J. Biol. Chem.* 291, 26886–26898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756098>
- Schier, A.C., Taatjes, D.J., 2020. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev.* 34, 465–488. <https://doi.org/10.1101/gad.335679.119>
- Schilbach, S., Wang, H., Dienemann, C., Cramer, P., 2023. Yeast PIC-Mediator structure with RNA polymerase II C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 120, e2220542120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2220542120>
- Schüller, R., Forné, I., Straub, T., Schreieck, A., Texier, Y., Shah, N., Decker, T.-M., Cramer, P., Imhof, A., Eick, D., 2016. Heptad-Specific Phosphorylation of RNA Polymerase II CTD. *Mol. Cell* 61, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.003>
- Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D.H.W., Raams, A., van der Hoek, A.C., Laffeber, C., Hoeijmakers, J.H.J., Demmers, J.A.A., Fouteri, M., Vermeulen, W., Martijn, J.A., 2012. UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat. Genet.* 44, 598–602. <https://doi.org/10.1038/ng.2230>
- Scrima, A., Konicková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., Thomä, N.H., 2008. Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* 135, 1213–1223. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.045>
- Selby, C.P., Sancar, A., 1990. Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3522–3525. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.9.3522>
- Shenasa, H., Bentley, D.L., 2023. Pre-mRNA splicing and its cotranscriptional connections. *Trends Genet.* 39, 672–685. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.04.008>

- Shiloh, Y., Ziv, Y., 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>
- Singh, K.K., Wachsmuth, L., Kulozik, A.E., Gehring, N.H., 2013. Two mammalian MAGOH genes contribute to exon junction complex composition and nonsense-mediated decay. *RNA Biol.* 10, 1291–1298. <https://doi.org/10.4161/rna.25827>
- Sinha, N.K., McKenney, C., Yeow, Z.Y., Li, J.J., Nam, K.H., Yaron-Barir, T.M., Johnson, J.L., Huntsman, E.M., Cantley, L.C., Ordureau, A., Regot, S., Green, R., 2024. The ribotoxic stress response drives UV-mediated cell death. *Cell* 187, 3652–3670.e40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.018>
- 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., Cullis, C.A., Doucette, A., Garnsey, J.J., Gaulin, J.L., Gershman, R.E., Lublinsky, A.R., McDonald, A., Mizutani, H., Narayanan, U., Olhava, E.J., Peluso, S., Rezaei, M., Sintchak, M.D., Talreja, T., Thomas, M.P., Traore, T., Vyskocil, S., Weatherhead, G.S., Yu, J., Zhang, J., Dick, L.R., Claiborne, C.F., Rolfe, M., Bolen, J.B., Langston, S.P., 2009. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458, 732–736. <https://doi.org/10.1038/nature07884>
- Soutourina, J., 2018. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 262–274. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.115>
- Sproul, C.D., Mitchell, D.L., Rao, S., Ibrahim, J.G., Kaufmann, W.K., Cordeiro-Stone, M., 2014. Cyclobutane Pyrimidine Dimer Density as a Predictive Biomarker of the Biological Effects of Ultraviolet Radiation in Normal Human Fibroblast. *Photochem. Photobiol.* 90, 145–154. <https://doi.org/10.1111/php.12194>
- Srivastava, R., Ahn, S.H., 2015. Modifications of RNA polymerase II CTD: Connections to the histone code and cellular function. *Biotechnol. Adv.* 33, 856–872. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.008>
- Starita, L.M., Horwitz, A.A., Keogh, M.-C., Ishioka, C., Parvin, J.D., Chiba, N., 2005. BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 280, 24498–24505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414020200>
- Steinparzer, I., Sedlyarov, V., Rubin, J.D., Eismayr, K., Galbraith, M.D., Levandowski, C.B., Vcelkova, T., Sneezum, L., Wascher, F., Amman, F., Kleinova, R., Bender, H., Andrysik, Z., Espinosa, J.M., Superti-Furga, G., Dowell, R.D., Taatjes, D.J., Kovarik, P., 2019. Transcriptional Responses to IFN- γ Require Mediator Kinase-Dependent Pause Release and Mechanistically Distinct CDK8 and CDK19 Functions. *Mol. Cell* 76, 485–499.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.034>
- Steurer, B., Janssens, R.C., Geijer, M.E., Aprile-Garcia, F., Geverts, B., Theil, A.F., Hummel, B., van Royen, M.E., Evers, B., Bernards, R., Houtsmuller, A.B., Sawarkar, R., Marteiijn, J., 2022. DNA damage-induced transcription stress triggers the genome-wide degradation of promoter-bound Pol II. *Nat. Commun.* 13, 3624. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31329-w>
- Stoneley, M., Harvey, R.F., Mulroney, T.E., Mordue, R., Jukes-Jones, R., Cain, K., Lilley, K.S., Sawarkar, R., Willis, A.E., 2022. Unresolved stalled ribosome complexes restrict cell-cycle progression after genotoxic stress. *Mol. Cell* 82, 1557–1572.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.01.019>

- Sugasawa, K., Akagi, J., Nishi, R., Iwai, S., Hanaoka, F., 2009. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. *Mol. Cell* 36, 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.035>
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., Hanaoka, F., 2001. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 15, 507–521. <https://doi.org/10.1101/gad.866301>
- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, Keiji, Tanaka, Kiyoji, Hanaoka, F., 2005. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.035>
- Szabo, Q., Bantignies, F., Cavalli, G., 2019. Principles of genome folding into topologically associating domains. *Sci. Adv.* 5, eaaw1668. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1668>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A.L., Fang, T., Doncheva, N.T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2023. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 51, D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Tan, Y., Gao, M., Huang, Y., Zhan, D., Wu, S., An, J., Zhang, X., Hu, J., 2024. STK19 is a transcription-coupled repair factor that participates in UVSSA ubiquitination and TFIIH loading. *Nucleic Acids Res.* 52, 12767–12783. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac787>
- Toledo, L.I., Murga, M., Zur, R., Soria, R., Rodriguez, A., Martinez, S., Oyarzabal, J., Pastor, J., Bischoff, J.R., Fernandez-Capetillo, O., 2011. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 721–727. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2076>
- Topolska-Woś, A.M., Sugitani, N., Cordoba, J.J., Le Meur, K.V., Le Meur, R.A., Kim, H.S., Yeo, J.-E., Rosenberg, D., Hammel, M., Schäfer, O.D., Chazin, W.J., 2020. A key interaction with RPA orients XPA in NER complexes. *Nucleic Acids Res.* 48, 2173–2188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1231>
- Tornaletti, S., Reines, D., Hanawalt, P.C., 1999. Structural Characterization of RNA Polymerase II Complexes Arrested by a Cyclobutane Pyrimidine Dimer in the Transcribed Strand of Template DNA *. *J. Biol. Chem.* 274, 24124–24130. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24124>
- Tresini, M., Warmerdam, D.O., Kolovos, P., Snijder, L., Vrouwe, M.G., Demmers, J.A.A., van IJcken, W.F.J., Grosveld, F.G., Medema, R.H., Hoeijmakers, J.H.J., Mullenders, L.H.F., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., 2015. The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling. *Nature* 523, 53–58. <https://doi.org/10.1038/nature14512>
- Tufegdžić Vidaković, A., Mitter, R., Kelly, G.P., Neumann, M., Harreman, M., Rodríguez-Martínez, M., Herlihy, A., Weems, J.C., Boeing, S., Encheva, V., Gaul, L., Milligan, L., Tollervey, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Snijders, A.P., Stewart, A., Svejstrup, J.Q., 2020a. Regulation of the RNAPII Pool Is Integral to the DNA Damage Response. *Cell* 180, 1245–1261.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.009>

- van den Boom, V., Citterio, E., Hoogstraten, D., Zotter, A., Egly, J.-M., van Cappellen, W.A., Hoeijmakers, J.H.J., Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W., 2004. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J. Cell Biol.* 166, 27–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401056>
- van den Heuvel, D., Rodríguez-Martínez, M., van der Meer, P.J., Nieto Moreno, N., Park, J., Kim, H.-S., van Schie, J.J.M., Wondergem, A.P., D'Souza, A., Yakoub, G., Herlihy, A.E., Kashyap, K., Boissière, T., Walker, J., Mitter, R., Apelt, K., de Lint, K., Kirdök, I., Ljungman, M., Wolthuis, R.M.F., Cramer, P., Schärer, O.D., Kokic, G., Svejstrup, J.Q., Luijsterburg, M.S., 2024. STK19 facilitates the clearance of lesion-stalled RNAPII during transcription-coupled DNA repair. *Cell* 187, 7107–7125.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.10.018>
- van den Heuvel, D., Spruijt, C.G., González-Prieto, R., Kragten, A., Paulsen, M.T., Zhou, D., Wu, H., Apelt, K., van der Weegen, Y., Yang, K., Dijk, M., Daxinger, L., Marteijn, J.A., Vertegaal, A.C.O., Ljungman, M., Vermeulen, M., Luijsterburg, M.S., 2021a. A CSB-PAF1C axis restores processive transcription elongation after DNA damage repair. *Nat. Commun.* 12, 1342. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21520-w>
- van den Heuvel, D., van der Weegen, Y., Boer, D.E.C., Ogi, T., Luijsterburg, M.S., 2021b. Transcription-Coupled DNA Repair: From Mechanism to Human Disorder. *Trends Cell Biol.* 31, 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.007>
- van der Weegen, Y., de Lint, K., van den Heuvel, D., Nakazawa, Y., Mevissen, T.E.T., van Schie, J.J.M., Alonso, M.S.M., Boer, D.E.C., González-Prieto, R., Narayanan, I.V., Klaassen, N.H.M., Wondergem, A.P., Roohollahi, K., Dorsman, J.C., Hara, Y., Vertegaal, A.C.O., de Lange, J., Walter, J.C., Noordermeer, S.M., Ljungman, M., Ogi, T., Wolthuis, R.M.F., Luijsterburg, M.S., 2021. ELOF1 is a transcription-coupled DNA repair factor that directs RNA polymerase II ubiquitylation. *Nat. Cell Biol.* 23, 595–607. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00688-9>
- van der Weegen, Y., Golan-Berman, H., Mevissen, T.E.T., Apelt, K., González-Prieto, R., Goedhart, J., Heilbrun, E.E., Vertegaal, A.C.O., van den Heuvel, D., Walter, J.C., Adar, S., Luijsterburg, M.S., 2020. The cooperative action of CSB, CSA, and UVSSA target TFIIH to DNA damage-stalled RNA polymerase II. *Nat. Commun.* 11, 2104. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15903-8>
- van Sluis, M., Yu, Q., van der Woude, M., Gonzalo-Hansen, C., Dealy, S.C., Janssens, R.C., Somsen, H.B., Ramadhin, A.R., Dekkers, D.H.W., Wienecke, H.L., Demmers, J.J.P.G., Raams, A., Davó-Martínez, C., Llerena Schiffmacher, D.A., van Toorn, M., Häckes, D., Thijssen, K.L., Zhou, D., Lammers, J.G., Pines, A., Vermeulen, W., Pothof, J., Demmers, J.A.A., van den Berg, D.L.C., Lans, H., Marteijn, J.A., 2024. Transcription-coupled DNA–protein crosslink repair by CSB and CRL4CSA-mediated degradation. *Nat. Cell Biol.* 26, 770–783. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01394-y>
- Verma, R., Oania, R., Fang, R., Smith, G.T., Deshaies, R.J., 2011. Cdc48/p97 Mediates UV-Dependent Turnover of RNA Pol II. *Mol. Cell* 41, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.017>
- Vo ngoc, L., Wang, Y.-L., Kassavetis, G.A., Kadonaga, J.T., 2017. The punctilious RNA polymerase II core promoter. *Genes Dev.* 31, 1289–1301. <https://doi.org/10.1101/gad.303149.117>
- Volker, M., Moné, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., 2001. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* 8, 213–224. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00281-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00281-7)

- Vos, S.M., 2021. Understanding transcription across scales: From base pairs to chromosomes. *Mol. Cell* 81, 1601–1616. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.002>
- Vrouwe, M.G., Pines, A., Overmeer, R.M., Hanada, K., Mullenders, L.H.F., 2011. UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *J. Cell Sci.* 124, 435–446. <https://doi.org/10.1242/jcs.075325>
- Weber, A.M., Ryan, A.J., 2015. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* 149, 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>
- Williams, R.M., Zhang, X., 2021. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 161, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.11.005>
- Williamson, L., Saponaro, M., Boeing, S., East, P., Mitter, R., Kantidakis, T., Kelly, G.P., Lobley, A., Walker, J., Spencer-Dene, B., Howell, M., Stewart, A., Svejstrup, J.Q., 2017. UV Irradiation Induces a Non-coding RNA that Functionally Opposes the Protein Encoded by the Same Gene. *Cell* 168, 843–855.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.019>
- Wilson, M.D., Harreman, M., Svejstrup, J.Q., 2013. Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: The last resort. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1829, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.002>
- Winkler, G.S., Araújo, S.J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H., Wood, R.D., Timmers, H.T., Weeda, G., 2000. TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 275, 4258–4266. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4258>
- Wong, K.H., Jin, Y., Struhl, K., 2014. TFIIH phosphorylation of the Pol II CTD stimulates mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Mol. Cell* 54, 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.024>
- Woudstra, E.C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J.Q., 2002. A Rad26–Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* 415, 929–933. <https://doi.org/10.1038/415929a>
- Wu, X., Shell, S.M., Liu, Y., Zou, Y., 2007. ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* 26, 757–764. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209828>
- Xu, J., Lahiri, I., Wang, W., Wier, A., Cianfrocco, M.A., Chong, J., Hare, A.A., Dervan, P.B., DiMaio, F., Leschziner, A.E., Wang, D., 2017. Structural Basis for Eukaryotic Transcription-Coupled DNA Repair Initiation. *Nature* 551, 653–657. <https://doi.org/10.1038/nature24658>
- Yasukawa, T., Kamura, T., Kitajima, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Aso, T., 2008. Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *EMBO J.* 27, 3256–3266. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.249>
- Yu, Q., Xu, Y., Zhuang, H., Wu, Z., Zhang, L., Li, J., Yang, L., Wu, B., Wang, P., Zhang, X., Gan, X., Liang, Y., Zheng, S., Yu, X., Gu, Y., Xu, R., 2019. Aberrant activation of RPB1 is critical for cell overgrowth in acute myeloid leukemia. *Exp. Cell Res.* 384, 111653. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111653>

- Yurchenko, A.A., Rajabi, F., Braz-Petta, T., Fassihi, H., Lehmann, A., Nishigori, C., Wang, J., Padioleau, I., Gunbin, K., Panunzi, L., Morice-Picard, F., Laplante, P., Robert, C., Kannouche, P.L., Menck, C.F.M., Sarasin, A., Nikolaev, S.I., 2023. Genomic mutation landscape of skin cancers from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Nat. Commun.* 14, 2561. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38311-0>
- Yurko, N.M., Manley, J.L., 2018. The RNA polymerase II CTD “orphan” residues: Emerging insights into the functions of Tyr-1, Thr-4, and Ser-7. *Transcription* 9, 30–40. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1338176>
- Zhu, Y., Zhang, X., Gao, M., Huang, Y., Tan, Y., Parnas, A., Wu, S., Zhan, D., Adar, S., Hu, J., 2024. Coordination of transcription-coupled repair and repair-independent release of lesion-stalled RNA polymerase II. *Nat. Commun.* 15, 7089. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51463-x>
- Zou, L., Elledge, S.J., 2003. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300, 1542–1548. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>
- Zukher, I., Dujardin, G., Sousa-Luís, R., Proudfoot, N.J., 2023. Elongation roadblocks mediated by dCas9 across human genes modulate transcription and nascent RNA processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 30, 1536–1548. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01090-9>