



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

---

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Caracterización de las células mESC knockout de JMJD1B y su impacto en la  
maduración de la histona H3 recientemente sintetizada.**

Javiera Ignacia Garcés Barra

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile

2022



**UNIVERSIDAD  
MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias  

---

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

---

**Caracterización de las células mESC knockout de JMJD1B y su impacto en la  
maduración de la histona H3 recientemente sintetizada.**

Javiera Ignacia Garcés Barra

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutora: Dra. María Alejandra Loyola Pedevila.

Co-tutor: Dr. Mauricio Alejandro Sáez Venegas.

Santiago - Chile

2022

SOLO USO ACADÉMICO

*A mi padre,  
por enseñarme a  
levantarme  
las veces que fueran  
necesarias.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Loyola por la oportunidad, su conocimiento y comprensión. A Claudia Espinoza por sus consejos, lecciones, humor y siempre salvar el día.

A los Dres. Mauricio Sáez y Mario Sánchez por su simpatía, ayuda, conocimiento y su constructiva forma de enseñar.

Al Dr. Mauricio Budini por abrirme las puertas de su laboratorio en un momento tan complejo. Al Dr. Álvaro Sequeida por su calidez, empatía, enseñanzas y entrega a la ciencia. A Rodrigo Espinoza por su simpatía y consejos.

A mi padre, que sin importar la situación jamás ha dejado de creer en que saldría adelante. A mi Hermana por estar ahí para mí. Mención honrosa para ambos porque sin ustedes ni siquiera estaría aquí. A mi hermano por entender que nuestro apoyo es tácito. A mi madre por estar ahí a su manera.

A mi familia, pero sólo a aquellos que estuvieron ahí para mí, no se crean todos. A mis amigos, ustedes saben quiénes son y el cariño que les tengo.

A la Dra. María Angélica Wietstruck y al Dr. Francisco Barriga por salvar mi vida con sus conocimientos, amor y cariño característicos. Por enseñarme que a pesar de la adversidad siempre hay que poner nuestra mejor cara y empeño.

A todos aquellos docentes que formaron parte de mi educación y formación, lo hayamos disfrutado mutuamente o no.

De igual forma, me gustaría agradecer a todos aquellos maestros y maestras de vida que han contribuido, y siguen contribuyendo, a forjarme como persona, a guiarme en momentos difíciles y ayudarme a no perder el rumbo.

## **INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

Esta tesis de pregrado tuvo lugar en el laboratorio de Cromatina y Epigenética, el cual forma parte de la Fundación Ciencia & Vida ubicada en Zañartu 1482, Ñuñoa, Santiago de Chile.

Respecto al financiamiento, este fue brindado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), a través de los proyectos: PIA/BASAL ACE210003; Centro Ciencia & Vida, FB210008 y FONDECYT 1200577.

SOLO USO ACADÉMICO

## ABREVIATURAS

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid.

**H1:** Histona 1.

**H2A:** Histona 2A.

**H2B:** Histona 2B.

**H3:** Histona 3.

**H4:** Histona 4.

**(Fase) S:** Síntesis.

**(Fase) G2:** Gap 2.

**Fase M:** Mitosis/Meiosis.

**PTMs:** Post-Translational Modifications.

**H3.1:** Isoforma 1 de la histona H3.

**H3.2:** Isoforma 2 de la histona H3.

**CAF-1:** Chromatin assembly factor-1.

**H3.3:** Isoforma 3 de la histona H3.

**HIRA:** Histone Regulator A.

**CENP-A:** Centromere Protein A.

**Hsc70:** 70 kilodalton heat shock cognate.

**Hsp90/70:** 90/70 kilodalton heat shock protein.

**tNASP:** Testicular Nuclear Autoantigenic Sperm Protein.

**ASF1:** Anti-silencing function 1.

**sNASP:** Somatic Nuclear Autoantigenic Sperm Protein.

**HAT1:** Histone Acetyltransferase 1.

**ADP:** Adenosindifofato.

**SetDB1:** SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1.

**HP1 $\alpha$ :** Heterochromatin protein 1  $\alpha$ .

**H3K9me1:** Histona H3 monometilada en el residuo de lisina 9.

**SUV39:** Suppressor of variegation 39.

**H3K9me3:** Histona H3 trimetilada en el residuo de lisina 9.

**PAR:** Poli-ADP-Ribosilación.

**H4K5K12ac:** Histona H4 acetilada en los residuos de lisina 5 y 12.

**H3K14K18ac:** Histona H3 acetilada en los residuos de lisina 14 y 18.

**H3K4:** Residuo de lisina 4 de la histona H3.

**H3K36:** Residuo de lisina 36 de la histona H3.

**H3K9:** Residuo de lisina 9 de la histona H3.

**H3K14:** Residuo de lisina 14 de la histona H3.

**H3K18:** Residuo de lisina 18 de la histona H3.

**H3K23:** Residuo de lisina 23 de la histona H3.

**H3K9me1/2/3:** Histona H3 mono, dio trimetilada en el residuo de lisina 9.

**H3K27me1/3:** Histona H3 mono o trimetilada en el residuo de lisina 27.

**H3.1K9me1/3:** Histona H3.1 mono o trimetilada en el residuo de lisina 9.

**H3K9ac:** Histona H3 acetilada en el residuo de lisina 9.

**H3K14ac:** Histona H3 acetilada en el residuo de lisina 14.

**H3K4me3:** Histona H3 trimetilada en el residuo de lisina 4.

**JMJD1B:** jumonji domain containing 1B.

**KDM3B:** Lysine Demethylase 3B (Gen).

**JMJD:** jumonji domain.

**JMJD1A:** jumonji domain containing 1A.

**JMJD1C:** jumonji domain containing 1C.

**N:** amino.

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono.

**HDM:** Histona desmetilasa.

**H4R3me1/2:** Histona H4 mono o dimetilada en el residuo de arginina 3.

**H4K20me3:** Histona H4 trimetilada en el residuo de lisina 20.

**SNV:** Single-nucleotide Variant.

**JMJD1:** jumonji domain 1.

**CCND1:** Cyclin D1 gene.

**p53:** Protein of 53 KDa.

**p21:** Protein of 21 KDa.

**HSPC:** Hematopoietic Stem and Progenitor Cell.

**LMA:** Leucemia Mieloide Aguda.

**Células HeLa:** Células Henrietta Lacks.

**Células HEK293T:** Células Human Embryonic Kidney 293 cells with the SV40 T-antigen.

**mESC:** mouse Embryonic Stem Cell.

**KO:** Knockout.

**WT:** Wild Type.

**PPIs:** Protein-Protein Interactions.

**PCA:** Principal component analysis.

**TAP:** Tandem Affinity Purification.

**CoIP:** Co-Immunoprecipitation.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**SILAC:** Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture.

**mL:** Mililitro.

**μL:** Microlitro.

**PVDF:** Polyvinylidene Difluoride.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**FBS:** Fetal Bovine Serum.

**mM:** Mili molar.

**U/mL:** Unidades por mililitro.

**LIF:** Leukemia Inhibitory Factor.

**PBS:** Phosphate Buffered Saline.

**H<sub>2</sub>O:** Agua.

**KCl:** Cloruro de potasio.

**NaCl:** Cloruro de sodio.

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio.

**pH:** Potencial de hidrógeno.

**TTBS:** Tween-Tris-buffered saline.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido (CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>).

**BSA:** Bovine Serum Albumin.

**DTT:** Dithiothreitol.

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate.

**EDTA:** Ethylenediamine Tetraacetic Acid.

**NP40:** Non-Ionic Detergent.

**PMSF:** Phenylmethylsulfonyl Fluoride.

**BC:** Buffer Chromatographic.

**IP:** Inmunoprecipitación.



**HCl:** Ácido clorhídrico.

**APS:** Ammonium Persulfate.

**TEMED:** Tetramethylethylenediamine.

**H<sub>2</sub>O-LC:** Water for Liquid Chromatography.

**CHX:** Cicloheximida.

**HEPES:** N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid.

**KOH:** Hidróxido de Potasio.

**kDa:** Kilo Dalton.

**IgG:** Inmunoglobulina G.

**CCK8:** Cell Counting Kit-8.

**Nm:** Nanometros.

**Rpm:** Revoluciones por minuto.

**VP:** Volumen de Pellet.

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

**FDR:** False Discovery Rate.

**TOPO I:** Topoisomera tipo I.

**RPL5:** Ribosomal protein large 5.

**RPS3a:** Ribosomal protein small 3a.

**mg:** Miligramo.

**CRISPR-Cas9:** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Caspase9.

**EB:** Embryonic bodies.

**NE:** Nuclear extract.

**S100:** Extracto citosólico S100.

**PCA:** Principal component analysis.

**ATP:** Adenosin trifosfato.

**NADP<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato.

**LFQ:** Label Free Quantification.

**H3K9K14:** Residuos de lisina 9 y 14 de la histona H3.

**H3K18K23:** Residuos de lisina 18 y 23 de la histona H3.

**H3K27K36K37:** Residuos de lisina 27, 36 y 37 de la histona H3.

**H3K79:** Residuo de lisina 79 de la histona H3.

**H4K20:** Residuo de lisina 20 de la histona H4.

**H3K79me1:** Lisina 79 monometilada de la histona H3.

**H4K20me2/3:** Lisina 20 di y/o trimetilada de la histona H4.

**WT:** Western blot.

**MEF:** mouse embryonic fibroblasts.

**H3K18ac:** Histona H3 acetilada en el residuo de lisina 18.

**H3K79me2/3:** Lisina 79 di y trimetilada de la histona H3.

**H4K20me1/2/3:** Lisina 20 mono, di y/o trimetilada de la histona H4.

**H3K4me1/2:** Lisina 4 mono, di y/o trimetilada de la histona H3.

**H3K18ac:** Histona H3 acetilada en el residuo de lisina 18.

**H3K79me2/3:** Lisina 79 di y trimetilada de la histona H3.

**H4K20me1/2/3:** Lisina 20 mono, di y/o trimetilada de la histona H4.

**H3K23ac:** Histona H3 acetilada en el residuo de lisina 23.

**TRIM24:** Tripartite motif-containing 24.

**H3K27me3K36pK37p:** Lisina 27 trimetilada, lisina 36 desmetilada y lisina 37 desmetilada de la histona H3.

**H3K27me1K36me1K37p:** Lisina 27 monometilada, lisina 36 monometilada y lisina 37 desmetilada de la histona H3.

**H3K79me1:** Histona H3 monometilada en el residuo de lisina 79.

**H3K36me1:** Histona H3 monometilada en el residuo de lisina 36.

**H3K36me2:** Histona H3 dimetilada en el residuo de lisina 36.

**EZH2:** Enhancer of zeste homolog 2.

**PRC2:** Polycomb repressive complex 2.

**FDA:** Food and Drugs Administration.

**AAV:** Adeno-Associated Virus.

**AAV8:** Adeno-Associated Viral vector of serotype 8.

**HHR:** Hammer Head Ribozyme.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.

INFORMACIÓN DEL LABORATORIO Y/O CENTRO DE INVESTIGACIÓN.

ABREVIATURAS.

<b>I. ÍNDICE.....</b>	<b>i</b>
<b>I.I Índice de Contenidos.....</b>	<b>i</b>
<b>I.II Índice de Tablas.....</b>	<b>iv</b>
<b>I.III Índice de Figuras.....</b>	<b>v</b>
<b>II. RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>III. SUMMARY.....</b>	<b>ix</b>
<b>1-. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema de investigación.....	1
1.2 Marco teórico.....	3
<b>1.2.1 Histona H3 y su cascada de maduración. ....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2 Modificaciones post-traduccionales o PTMs. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3 PTMs en la histona H3 recientemente sintetizada. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.4 Impacto en la cromatina de las PTMs en la histona H3.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.5 JMJD1B.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.6 JMJD1B e inestabilidad genómica en cáncer.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.7 JMJD1B en la diferenciación.....</b>	<b>9</b>
1.3 Justificación de la investigación.....	10
<b>1.3.1 Caracterización mESC KO de JMJD1B.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2 Interactómica de la histona H3.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.3 PTMs de la histona H3.....</b>	<b>13</b>

<b>2-. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Hipótesis.....	15
2.2 Objetivo General.....	15
2.3 Objetivos Específicos.....	15
<b>3-. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Materiales.....	16
<b>3.1.1 Soluciones y Reactivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2 Anticuerpos.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3 Kits comerciales.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.4 Equipos y Softwares.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.5 Otros.....</b>	<b>18</b>
3.2 Metodología.....	18
<b>3.2.1 Líneas celulares.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2 Ensayo de proliferación celular.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.3 Ensayo de diferenciación celular.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.4 Extractos celulares de células mESC.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.5 Cuantificación de proteínas.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.6 Western blot.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.7 Co-Inmunoprecipitación.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.8 Purificación de ribosomas mediante una gradiente de sacarosa 5-45%.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.9 Precipitación de proteínas con MeOH/cloroformo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.10 Análisis de resultados de espectrometría de masas.....</b>	<b>25</b>

<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Caracterización de las células madre embrionarias de ratón (mESC) que tienen eliminado el gen que codifica para la proteína JMJD1B (KO JMJD1B).....	26
<b>4.1.1 Obtención de extractos celulares y confirmación del KO JMJD1B.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.2 Proliferación celular de mESC WT y KO de JMJD1B. ....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.3 Diferenciación celular de mESC WT y KO de JMJD1B.....</b>	<b>29</b>
4.2 Interactómica de la histona H3 citosólica.....	30
<b>4.2.1 Coimmunoprecipitación (CoIP) de la histona H3 citosólica.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2 Espectrometría de masas e interactómica de la histona H3 citosólica.....</b>	<b>31</b>
4.2.2.1 PANTHER y la ontología genética (GO).....	38
4.3 PTMs de la histona H3 sintetizada de novo y asociadas a ribosomas.....	52
<b>4.3.1 Purificación de ribosomas.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.2 Espectrometría de masas y PTMs de la histona H3 recientemente sintetizada asociada a ribosomas.....</b>	<b>54</b>
<b>5- DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>6- CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>7- IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS.....</b>	<b>65</b>
<b>8- REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>9- MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>88</b>
9.1 GO según PANTHER.....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Anticuerpos utilizados.....	<b>21</b>
<b>Tabla 2:</b> Anticuerpos Co-inmunoprecipitación.....	<b>22</b>
<b>Tabla 3:</b> Anticuerpos purificación de ribosomas.....	<b>24</b>
<b>Tabla 4:</b> Metilación de H3K4.....	<b>55</b>
<b>Tabla 5:</b> Metilación y acetilación de H3K9K14.....	<b>55</b>
<b>Tabla 6:</b> Metilación y acetilación de H3K18K23.....	<b>56</b>
<b>Tabla 7:</b> Metilación de H3K27K36K37.....	<b>56</b>
<b>Tabla 8:</b> Metilación de H3K79.....	<b>56</b>
<b>Tabla 9:</b> Metilación de H4K20.....	<b>57</b>
<b>Tabla suplementaria 1:</b> Ontología genética de KO de JMJD1B de función molecular.....	<b>88</b>
<b>Tabla suplementaria 2:</b> Ontología genética de KO de JMJD1B de componente celular.....	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema de la estructura de un nucleosoma.....	<b>1</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas.....	<b>4</b>
<b>Figura 3:</b> Esquema de las modificaciones post-traduccionales que pueden tener lugar en las histonas.....	<b>5</b>
<b>Figura 4:</b> Esquema de la desmetilación de residuos de lisinas mediadas por las proteínas JMJD1.....	<b>8</b>
<b>Figura 5:</b> Diafonía entre modificaciones de histonas.....	<b>11</b>
<b>Figura 6:</b> Esquema del protocolo de extractos celulares y validación por western blot.....	<b>20</b>
<b>Figura 7:</b> Esquema simplificado de la experimentación para conocer la interactómica de la histona H3.....	<b>22</b>
<b>Figura 8:</b> Esquema de protocolo de la purificación de ribosomas.....	<b>24</b>
<b>Figura 9:</b> Western blot de los extractos celulares.....	<b>27</b>
<b>Figura 10:</b> Ensayo de proliferación celular.....	<b>28</b>
<b>Figura 11:</b> Ensayo de diferenciación celular.....	<b>29</b>
<b>Figura 12:</b> Western blot de la CoIP sin elución.....	<b>31</b>
<b>Figura 13:</b> workflow en Perseus.....	<b>32</b>
<b>Figura 14:</b> PCA generado en Perseus con las muestras de los extractos mESC KH2, WT y KO de JMJD1B.....	<b>33</b>
<b>Figura 15:</b> Diagrama de Venn con mESC WT y KO de JMJD1B.....	<b>34</b>
<b>Figura 16:</b> Scatter plot de las proteínas asociadas a Flag-H3 derivadas de extractos citosólicos de células mESC KO y WT.....	<b>35</b>
<b>Figura 17:</b> Heatmap de enriquecimiento de mESC KO de JMJD1B con X-1.....	<b>37</b>
<b>Figura 18:</b> Heatmap de enriquecimiento de mESC WT con X+1.....	<b>37</b>

<b>Figura 19:</b> Gráfico de barras de proceso biológico de GO de genes KO de JMJD1B.....	<b>40</b>
<b>Figura 20:</b> Gráfico de barras de función molecular de GO de genes KO de JMJD1B.....	<b>40</b>
<b>Figura 21:</b> Gráfico de barras de componente celular de GO de genes KO de JMJD1B.....	<b>41</b>
<b>Figura 22:</b> Gráfico de barras de proceso biológico de GO de genes WT.....	<b>43</b>
<b>Figura 23:</b> Gráfico de barras de función molecular de GO en genes WT.....	<b>44</b>
<b>Figura 24:</b> Gráfico de barras de componente celular de GO en genes WT.....	<b>44</b>
<b>Figura 25:</b> Gráfico de barras de proceso biológico de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.....	<b>46</b>
<b>Figura 26:</b> Gráfico de barras de función molecular de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.....	<b>46</b>
<b>Figura 27:</b> Gráfico de barras de componente celular de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.....	<b>47</b>
<b>Figura 28:</b> Gráfico de barras de proceso biológico de GO para genes enriquecidos en WT.....	<b>48</b>
<b>Figura 29:</b> Gráfico de barras de función molecular de GO para genes enriquecidos en WT....	<b>49</b>
<b>Figura 30:</b> Gráfico de barras de componente celular de GO para genes enriquecidos en WT.	<b>49</b>
<b>Figura 31:</b> Gráfico de barras de clase de proteína de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.....	<b>51</b>
<b>Figura 32:</b> Gráfico de barras de clase de proteína de GO para genes enriquecidos en WT.....	<b>51</b>
<b>Figura 33:</b> Gráficas de las absorbancias de las purificaciones de ribosomas.....	<b>52</b>
<b>Figura 34:</b> Western blot de las purificaciones de ribosomas desde las células mESC WT.....	<b>53</b>
<b>Figura 35:</b> Western blot de las purificaciones de ribosomas desde las células mESC KO de JMJD1B.....	<b>53</b>
<b>Figura 36:</b> Corte de gel de las muestras de ribosomas utilizadas para el análisis por espectrometría de masas.....	<b>54</b>
<b>Figura 37:</b> Distribución de las histonas H3 y H4.....	<b>55</b>



<b>Figura 38:</b> Correlación entre mutaciones del gen JMJD1B con una alta incidencia de cáncer e inestabilidad genómica.....	<b>67</b>
<b>Figura 39:</b> Esquema de la traducción con y sin morfolidos.....	<b>68</b>
<b>Figura 40:</b> Esquema representativo de la inactivación génica mediada por la ribozima.....	<b>68</b>
<b>Figura 41:</b> Esquema representativo de la inactivación de la ribozima mediada por oligos de morfolidos.....	<b>68</b>
<b>Figura 42:</b> Esquema representativo del vector contenido en el AAV.....	<b>69</b>

SOLO USO ACADÉMICO

## RESUMEN

La estabilidad del genoma es crucial para su correcto funcionamiento. Esta estabilidad está determinada por una apropiada organización estructural de la cromatina y un ajuste preciso de los niveles de histonas. Durante la fase S del ciclo celular el material genético de la célula debe replicarse para dar origen a una nueva célula hija, para ello se debe contar con un adecuado pool de histonas no sólo para la replicación, sino que también para posibles reparaciones del DNA. Las histonas H3 y H4 una vez que son sintetizadas se someten a una cascada de maduración antes de ser translocadas al núcleo, la que les permite plegarse correctamente y adquirir las PTMs correspondientes (del inglés Post-Translational Modifications). Sin embargo, cuando algún componente de esta cascada falla o existe una interacción aberrante, ya sea la disponibilidad de histonas, alguna de las enzimas modificadoras del DNA e histonas o incluso las modificaciones mismas, esto genera inestabilidad genómica, la que a su vez induce a distintas enfermedades tales como el cáncer.

Por su parte, JMJD1B es una histona desmetilasa que participa no solo en la regulación de la estructura y transcripción de la cromatina, sino que también en el establecimiento de PTMs. Datos recientes del laboratorio indican que JMJD1B ajusta el suministro de histonas recientemente sintetizadas para mantener la integridad del genoma y cuya deficiencia, provocaría defectos en el ensamblaje de la cromatina, la detención del ciclo celular en la fase de transición G2-M, daños en el DNA y acumulación de las histonas H3 y H4 en tempranos pasos de la cascada de maduración. Además, existe una alta tasa de mutaciones del gen JMJD1B en pacientes con cáncer y una correlación positiva de las mutaciones JMJD1B con la inestabilidad genómica. Es por ello que nos preguntamos ¿cómo afecta JMJD1B la cascada de maduración de la histona H3? Para lo que postulamos que JMJD1B regula sobre la la interactómica y las PTMs de la histona H3 recientemente sintetizada en células madre embrionarias de ratón, influyendo además sobre su proliferación y diferenciación.

Para poder dar respuesta a nuestra pregunta es que nosotros trabajamos con tres líneas de células mESC: WT, KO de JMJD1B y KH2. Las cuales nos permitieron comparar tanto la interactómica como las PTMs de H3 en condiciones normales y ausencia de JMJD1B. En donde se observó que las células KO de JMJD1B presentaron una mayor proliferación que aquellas WT, pero no mostraron diferencias a la hora de diferenciarse. Respecto a la interactómica de la histona H3 en ausencia de JMJD1B, esta presentó un enriquecimiento de la histona H4, HSP90, chaperonas y/o reguladoras de procesos celulares. Mientras que las PTMs en esta condición se ven alteradas, pero dada la dispersión de datos

en las distintas muestras no fue posible aseverar nada respecto a sus sustratos H3K9me1/2. Adicionalmente, también se careció de literatura de referencia para estas PTMs en histonas solubles.

De este modo, las células knockout de la desmetilasa JMJD1B no sólo crecen más rápido que sus pares WT, sino que también presentan diferencias en el enriquecimiento de distintas proteínas, tales como NASP y HSP90 quienes forman parte de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4. De la misma manera, su ausencia no deja indiferente a las PTMs de estas histonas citosólicas, pero se debe retomar la experimentación para validar los resultados al evaluar una tercera muestra.

SOLO USO ACADÉMICO

## SUMMARY

The stability of the genome is crucial for its correct functioning, this stability is determined by an appropriate structural organization of the chromatin and a precise adjustment of the levels of histones. During the S phase of the cell cycle, the genetic material of the cell must replicate to give rise to a new daughter cell. To do this, it must have an adequate pool of histones not only for replication, but also for possible DNA repair. Histones H3 and H4, once they are synthesized, undergo a maturation cascade before being translocated to the nucleus, which allows them to fold correctly and acquire the corresponding PTMs. However, when any component of this cascade fails or there is an aberrant interaction, be it the availability of histones, some of the DNA-modifying enzymes and histones, or even the modifications themselves, this generates genomic instability, which in turn induces various diseases such as cancer.

For its part, JMJD1B is a histone demethylase that participates not only in the regulation of chromatin structure and transcription, but also in the establishment of PTMs. Recent data from the laboratory indicate that JMJD1B adjusts the supply of newly synthesized histones to maintain genome integrity and whose deficiency would cause defects in chromatin assembly, cell cycle arrest in the G2-M transition phase, damage to the DNA and accumulation of histones H3 and H4 in early steps of the maturation cascade. Furthermore, there is a high rate of JMJD1B gene mutations in cancer patients and a positive correlation of JMJD1B mutations with genomic instability. That is why we wonder how JMJD1B affect the histone H3 maturation cascade? For which we postulate that JMJD1B regulates the interaction and PTMs of histone H3 recently synthesized in mouse embryonic stem cells, also influencing their proliferation and differentiation.

In order to answer our question, we worked with three mESC lines: WT, JMJD1B KO and KH2 which allowed us to compare both the interatomic and the PTMs of H3 under normal conditions and absence of JMJD1B. We observed that the JMJD1B KO cells presented a greater proliferation than the WT, but they did not show differences in differentiation. Regarding the interaction of histone H3 in the absence of JMJD1B, this presented an enrichment of histone H4, HSP90, chaperones and/or regulators of cellular processes. While the PTMs in this condition are altered, but given the dispersion of data in the different samples, it was not possible to conclude regarding their H3K9me1/2 substrates. Additionally, reference literature for these PTMs in soluble histones was also lacking.

Thus, JMJD1B demethylase knockout cells not only grow faster than their WT counterparts, but also show differences in the enrichment of different proteins, such as NASP and HSP90, which are part of the histone H3 maturation cascade. and H4. In the same way, their absence does not leave the PTMs of these cytosolic histones indifferent, but the experimentation must be resumed to validate the results by evaluating a third sample.

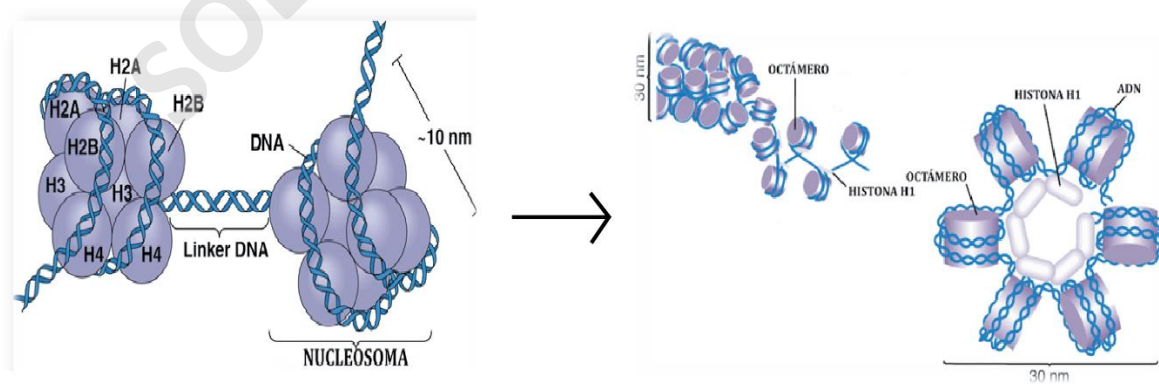
SOLO USO ACADÉMICO

## 1- INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema de investigación.

El genoma es el reservorio de información genética propia de un organismo y/o una especie, el cual está determinado por la combinación de genes heredados de los antepasados que dieron origen al organismo o especie en cuestión. A pesar de que todas las células somáticas de un individuo contienen el mismo material genético, existen alrededor de 200 tipos celulares diferentes que exhiben distintas características tanto morfológicas como fisiológicas, lo que les brinda especificidad en sus respectivas funciones. La diversidad y la especialización de las funciones de nuestro organismo han inducido a las células a diferenciarse a un tipo celular determinado (1), pero ¿cómo un miocito sabe que no debe fagocitar patógenos? O ¿una célula endotelial que no debe producir serotonina?

Esta identidad celular está dada por un patrón de expresión diferencial de los genes que conforman el genoma, el cual está tempranamente condicionado por las distintas señales provenientes del ambiente de la nueva célula. Tanto la expresión como la represión génica dependen de la organización estructural de los dominios de la cromatina, los cuales facilitan o impiden la transcripción (2). La cromatina, es el estado en el que se encuentra el material genético en el núcleo celular. Al respecto, el DNA debe condensarse para dar origen a dicha cromatina, y para ello se asocia a proteínas llamadas histonas. Estas proteínas existen en 5 formas distintas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Dos copias de cada una de las últimas cuatro dan origen a un octámero en el que el DNA da 1,65 vueltas, mientras que la histona H1 evita su colapso y conecta esta estructura llamada nucleosoma al siguiente (**Figura 1**) (3).



**Figura 1: Esquema de la estructura de un nucleosoma.** Se observa el octámero producto de la interacción

entre dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 unidos al DNA. Mientras que, H1 evita el colapso de esta estructura al unirse conjuntamente a la cadena de DNA entrante y saliente del nucleosoma (4).

Estos nucleosomas corresponden a complejos conservados de proteína-DNA que son el monómero, o unidad básica, de la estructura de la cromatina (5), los que además impiden y/o permiten el acceso al DNA a las distintas proteínas y maquinarias responsables de la replicación, transcripción y reparación del mismo (6). Por otro lado, la cromatina está presente en el núcleo en dos estados diferentes: como heterocromatina, la cual se encuentra muy condensada por lo que la maquinaria transcripcional no puede unirse al DNA y aquellos genes presentes en dicha región no se expresarán, o como eucromatina que es mucho más laxa y está menos condensada, permitiendo así la unión de los distintos factores de transcripción que reclutan a toda la maquinaria transcripcional para la expresión del o los genes, según corresponda.

Cabe destacar que se distinguen 3 tipos de histonas según su localización celular: las citosólicas, las nucleares no nucleosomales y las nucleosomales. Tal como su nombre lo indica, las primeras se encuentran en el citoplasma, ya sea atravesando su síntesis o su respectiva cascada de maduración. Aquellas nucleares no nucleosomales son las que han finalizado su maduración y han llegado al núcleo, pero que aún no se han asociado al DNA. Finalmente, aquellas histonas nucleosomales son aquellas que ya han sido depositadas en el genoma. Adicionalmente, en una población de células asincrónicas, se encuentran en un 99% en la cromatina (nucleosomales), 0,4% en el citosol (citosólicas) y en un 0,6% en extracto nuclear (no nucleosomales) (7).

Por otro lado, la síntesis de estas histonas es fundamental para la replicación del DNA, por lo que se debe contar con un *pool* de histonas no solo durante la replicación misma, sino que también fuera de ella dado que se puede generar un cambio inesperado en su demanda, por ejemplo, por daños en el DNA (8). Asimismo, una deficiencia de histonas induce defectos en el crecimiento celular, como sensibilidad a daños del DNA, ralentización de la fase S y arresto en G2/M (9), mientras que un exceso de ellas induce a una inestabilidad del genoma por la pérdida excesiva de cromosomas, mayor sensibilidad a los agentes que dañan el DNA y citotoxicidad. Esto último dado principalmente por interacciones electrostáticas aberrantes entre las histonas (carga positiva) y otras moléculas con carga negativa (10). Es por ello que, como todo en nuestro organismo, se debe alcanzar un equilibrio.

Esta inestabilidad genómica se caracteriza por un aumento en la predisposición a mutaciones en el material genético (11). Afortunadamente, existen puntos de control, y diversos mecanismos de

reparación a nivel del ciclo celular para asegurarse de que cualquier daño o error en el DNA sea corregido antes de ser transmitido a una nueva célula. Sin embargo, estos mecanismos de reparación no son perfectos y hay veces en los que se van acumulando mutaciones, las que oscilan entre la inocuidad y el devastador potencial de originar un cáncer (12). Estos errores pueden tener lugar por una desregulación en los puntos de control del ciclo celular, en las vías de reparación del DNA y/o en las enzimas modificadoras tanto del DNA como de las histonas (12,13) . Sin embargo, su alcance no se detiene ahí, dado que se ha visto que la inestabilidad genómica no sólo es un factor etiológico en el cáncer, sino que también de enfermedades neurodegenerativas, de envejecimiento e inmunodeficiencias, entre otras (14). De la misma manera, se ha observado que incluso el estado del genoma, entre heterocromatina y eucromatina, influye en las tasas de mutación en células somáticas humanas, lo cual está directamente relacionado con las PTMs de las histonas (15).

Dichas PTMs, corresponden a modificaciones covalentes que se agregan a cadenas laterales específicas mediante enzimas dedicadas después de la traducción (6). Algunas de las cuales se han visto que son claves para la estabilidad genómica (14). De manera similar, se ha establecido una relación entre PTMs aberrantes en histonas y la inestabilidad del genoma, en donde las enzimas responsables del depósito y/o eliminación de dichas modificaciones producen alteraciones en la ubicación y/o los niveles estacionarios de las mismas (16). Las cuales van a determinar muchas veces el estado de la cromatina, el cual a su vez afecta de sobremanera a distintos procesos como la replicación, reparación y transcripción, lo que afecta directamente la expresión génica. Un ejemplo de aquello, son las acetilaciones de las histonas en residuos de lisina, las cuales neutralizan la carga positiva de la histona, reduciendo así su unión al DNA (carga negativa) lo que permite una mayor accesibilidad para distintas proteínas que interactúan con el (17,18). En el caso de las metilaciones de lisinas, estas ocurren en patrones más complejos de mono, di y trimetilaciones (19). Ambos tipos de PTMs modulan interacciones de proteínas de unión a la cromatina con el nucleosoma, las cuales reclutan maquinarias funcionales que son capaces de llevar a cabo la replicación del material genético, la transcripción de genes y la respuesta y reparación de daños en el DNA (17).

## **1.2 Marco teórico.**

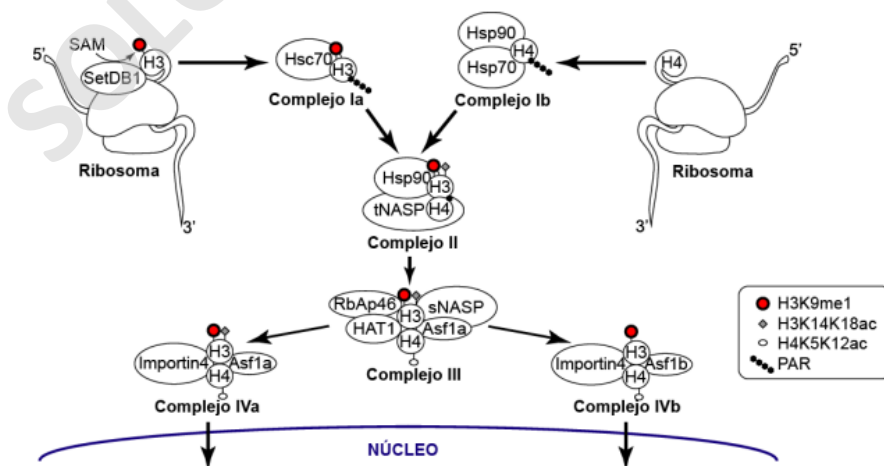
### **1.2.1 Histona H3 y su cascada de maduración.**

En mamíferos existen cuatro isoformas de la histona H3, las cuales se clasifican como replicativas, variantes y centromérica (20). H3.1 y H3.2 son las histonas replicativas o canónicas que se sintetizan en la fase S proporcionando un suministro para el ensamblaje del DNA recientemente sintetizado



en cromatina. Sin embargo, su incorporación a la cromatina se limita a la replicación del DNA durante dicha fase (acoplada a la replicación) y a la acción de la chaperona de histona CAF-1 (21). Por su parte, la histona H3.3 se sintetiza a lo largo de todo el ciclo celular, lo que le permite incorporarse a la cromatina sin necesidad de que se esté o no en la fase S (independiente a la replicación), lo que se da gracias a la acción de la chaperona de histona HIRA (22). Finalmente, la histona centromérica CENP-A se localiza en centrómeros y se ensambla en nucleosomas que darán lugar al cinetocoro (23). No obstante, a pesar de sus diferencias funcionales H3.3 se diferencia sólo en cinco aminoácidos con H3.1, lo que las hace 96% idénticas. Mientras que CENP-A sólo comparte un 46% de su secuencia aminoacídica con H3.1. Adicionalmente, H3.1 y H3.2 se diferencian sólo en un aminoácido, siendo 99% idénticas (21).

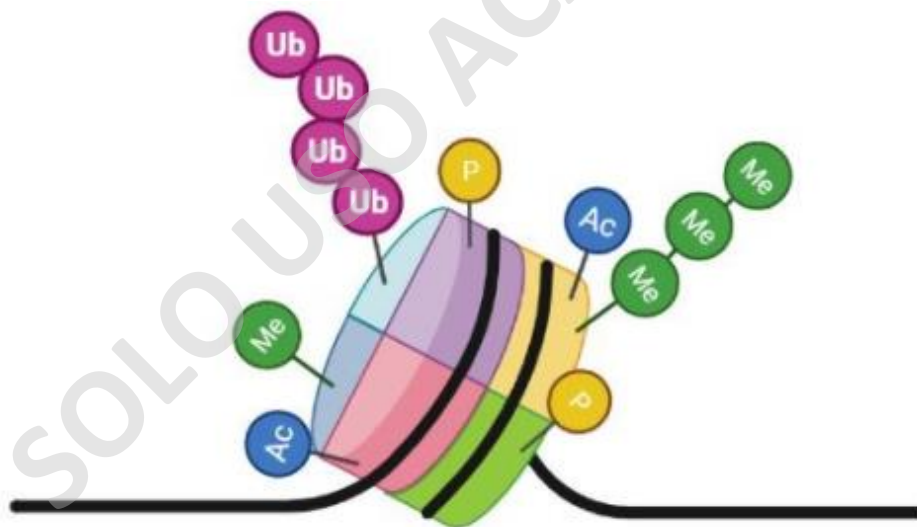
Esta histona H3 se asocia en primera instancia con la histona H4 antes de siquiera llegar al núcleo para la formación del octámero descrito anteriormente. Al respecto, ambas histonas una vez que son sintetizadas deben ser sometidas a una cascada de maduración, antes de ser translocadas al núcleo y ser depositadas en el genoma, la que les asegura tanto un correcto plegamiento como el establecimiento de las respectivas PTMs en los extremos N-terminales (22,23). Dicha cascada está conformada por 6 complejos y comienza con la asociación de H3 con Hsc70, que da lugar al complejo Ia, mientras que H4 se asocia con Hsp90/70 dando origen al complejo Ib. Luego, ambas histonas forman un heterodímero con la asistencia de las chaperonas tNASP y Hsp90 formando el complejo II. Posteriormente, este dímero H3-H4 se asocia con ASF1, sNASP y HAT1 dando origen al complejo III. Finalmente, el dímero H3-H4 interactúa con Importina4 y ASF1 para su translocación al núcleo (complejo IV) (22–24) (**Figura 2**).



**Figura 2: Esquema de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas.** Se observan los complejos formados a lo largo de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4, así como también las primeras PTMs depositadas en dichas histonas (25).

### 1.2.2 Modificaciones post-traduccionales o PTMs.

Por su parte, las PTMs son cruciales tanto para una correcta conformación estructural de la cromatina, como para su funcionamiento, lo que es fundamental para la mantención de la estabilidad del genoma (26). Al respecto, estas pueden ser metilaciones (en residuos de lisina y arginina), acetilaciones (en residuos de lisina), fosforilaciones (en residuos de serina y treonina) y/o ubiquitinaciones (en residuos de lisina) (**Figura 3**) (27,28). Asimismo, se ha visto que las primeras PTMs tienen lugar en histonas no nucleosomales, aquellas que aún no son depositadas en la cromatina, al estar asociadas a sus respectivas chaperonas (7,8,29,30). No obstante, las modificaciones presentes en histonas no nucleosomales no son comparables con aquellas presentes en las histonas nucleosomales (30).



**Figura 3: Esquema de las modificaciones post-traduccionales que pueden tener lugar en las histonas.** Se observan las distintas PTMs (exceptuando la ADP-ribosilación) en sus respectivos colores y cantidades. Tanto la acetilación como la fosforilación constan de un monómero, mientras que la metilación y la ubiquitinación van del monómero hasta un trímero o polímero respectivamente(27).

### 1.2.3 PTMs en la histona H3 recientemente sintetizada.

Estudios previos en el laboratorio han indicado que la histona H3 es monometilada en el residuo de lisina 9 (H3K9me1) aun estando en proceso de traducción en el ribosoma. Lo anterior, es llevado a cabo por un complejo compuesto por la metiltransferasa SetDB1, CAF-1 y HP1 $\alpha$  (29). Esta H3K9me1 es la única marca de metilación detectable en la histona H3 soluble y es la responsable de dar paso a la preparación de una heterocromatina funcional, lo que tiene un impacto directo en la estabilidad genómica, al ser el sustrato de la histona metiltransferasa SUV39 quien la cataliza a H3K9me3. Esta trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 es una marca distintiva de heterocromatina constitutiva, silenciamiento génico y, además se ha visto un enriquecimiento de esta marca en heterocromatina pericéntrica que flanquea los centrómeros (23,29,31).

Otra de las primeras PTMs es la poli-ADP ribosilación, o PAR como aparece en la **Figura 2**, la cual se va perdiendo a medida que se avanza en la cascada de maduración hasta desaparecer al momento de formarse el heterodímero H3-H4 en el complejo II (23). Si seguimos avanzando en esta cascada, llegaremos al complejo III en donde aparecen las acetilaciones en H4K5K12 por la acción de HAT1. Estas acetilaciones en la histona H4 serán críticas a la hora de llegar al siguiente complejo para su translocación al núcleo (22,23). En este complejo IV nos encontramos dos isoformas de ASF1, la a y la b, quienes diferenciarán el complejo IVa del IVb. Sin embargo, se ha observado que no sólo las isoformas de ASF1 son las que separan este complejo, sino que también las PTMs presentes en cada uno de ellos. En el complejo IVa tenemos H3K14K18ac y H3K9me1, mientras que en el complejo IVb la histona H3 se encuentra enriquecida en H3K9me1 (23).

#### **1.2.4 Impacto en la cromatina de las PTMs en la histona H3.**

A pesar de que no son muchas las modificaciones post-traduccionales en histonas citosólicas, si las comparamos con las presentes en histonas nucleosomales, estas son críticas para la preparación de procesos posteriores (7). Lo anterior ya sea mediante la modificación de dicha PTM, la incorporación de otras y/o por lo que la marca en sí misma provoca en la cromatina. Al respecto, y retomando las isoformas de H3, se ha observado que estas presentan distintas PTMs. H3.1 presenta tanto marcas activadoras como represoras, H3.2 está enriquecida en modificaciones asociadas al silenciamiento génico o transcripcional, mientras que H3.3 presenta marcas representativas de un estado de transcripción o expresión activa (32). Lo anterior, a pesar de su alta conservación en términos de secuencia discutidos previamente (96-99%).

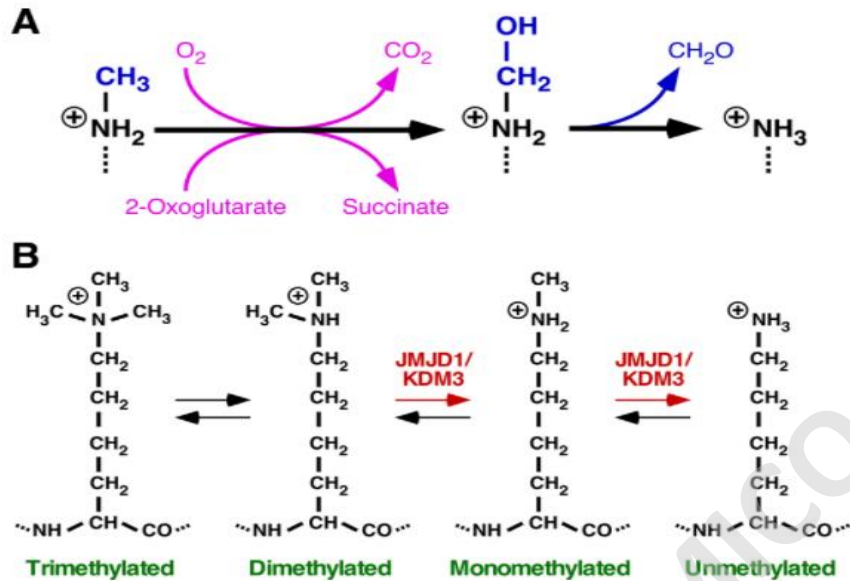
Algunas marcas activadoras son las metilaciones de H3K4 y H3K36, al igual que las acetilaciones de H3K9, H3K14, H3K18 y H3K23. Recíprocamente, algunas marcas represivas son las metilaciones de

H3K9 y H3K27. De la misma manera, se ha observado que regiones silenciadas transcripcionalmente presentan formas hipoacetiladas de dichas marcas (7,32,33). Esto se da debido a que las acetilaciones neutralizan la carga positiva de las histonas haciendo al DNA más accesible para las distintas moléculas, además de reclutar proteínas capaces de leer dicha marca (34).

#### **1.2.5 JMJD1B.**

JMJD1B, también conocida como KDM3B, es una de las tres isoformas de la subfamilia JMJD/KDM3 que existen en nuestro organismo. Comparte el 59,64% de su secuencia aminoacídica con JMJD1A y un 47,88% con JMJD1C (35). La función de estas enzimas depende del estado metabólico de la célula, dado que contienen un dominio Jumonji-C (JmjC) que utiliza oxígeno y  $\alpha$ -cetoglutarato como cofactores para catalizar la eliminación de grupos metilo en los extremos N-terminales de residuos de lisina, lo que genera la liberación de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), succinato y eventualmente formaldehído como subproductos (34,35) (**Figura 4**). Esto las convierte en una de las 18 proteínas con este dominio en las que se ha confirmado una actividad histona desmetilasa (HDM) (34), por lo que tienen la capacidad de remover modificaciones post-traduccionales y con ello, modificar la expresión génica (35).

Estudios previos han identificado a JMJD1B como responsable de la desmetilación de H3K9me 1/2, pero no de H3K9me3. No obstante, recientemente también se le ha atribuido la desmetilación de H4R3me 1/2, ambas presentes en regiones densas en genes (34,36,37). Adicionalmente, se sabe que junto a JMJD1A tienen funciones redundantes y críticas para una temprana embriogénesis, mantenimiento de las células madre embrionarias (ESC), la programación epigenética de la hematopoyesis en ratones, fertilidad, enfermedades cardíacas, síndrome metabólico y obesidad (35,38,39). De hecho, se ha visto que la pérdida conjunta de JMJD1A y JMJD1B es embrionariamente letal (39). JMJD1C no presenta actividad desmetilasa para H3K9 (34). Por su parte, H3K9me2/3 son marcas asociadas al silenciamiento génico, mientras que H3K9me se asocia a genes transcripcionalmente activos (36), lo que le brinda a JMJD1B un rol fundamental en términos de activación y represión génica, dado que a pesar de que H3K9me3 no sea sustrato, de igual manera puede afectarlo indirectamente al aumentar o disminuir su precursor H3K9me (34).



**Figura 4: Esquema de la desmetilación de residuos de lisinas mediadas por las proteínas JMJD1. (A)** Se observa la hidroxilación del grupo amino que conduce a la desmetilación, junto a los respectivos cofactores y subproductos. **(B)** Se muestra el equilibrio dinámico entre los estados de metilación (incluida su ausencia) y en cuales las desmetilasas JMJD1 tienen parte (35).

### 1.2.6 JMJD1B e inestabilidad genómica en cáncer.

El cáncer es una enfermedad que afecta a uno de cada tres personas en Estados Unidos, se caracteriza por una pérdida del control del ciclo celular generando una división descontrolada por parte de la célula, la que es incapaz de responder a las distintas señales que normalmente la regulan (40). Dichas células adquieren y acumulan diversas mutaciones, ganan y pierden segmentos completos de cromosomas, induciendo una inestabilidad genómica que las lleva a comportarse de manera anormal. Es esta inestabilidad genómica la que potencia la heterogeneidad genética, la que a su vez brinda la diversidad genética y fenotípica de los pacientes con cáncer (41,42). Diversos estudios de características genéticas y epigenéticas han indicado que las tasas de mutación en genomas de pacientes con cáncer se relacionan fuertemente con la organización de la cromatina, tanto en distintos tejidos como tipos de mutaciones (15).

De la misma manera, se ha observado que una de las causas subyacentes en el desarrollo del cáncer son cambios epigenéticos que surgen por una desregulación de las enzimas encargadas de la modificación tanto del DNA como de las histonas (35). Al respecto, se ha relacionado una alta densidad mutacional con diversas modificaciones, tanto activadoras como represoras en histonas.

Dentro de las cuales podemos encontrar a H3K9me2/3 y H4K20me3, como marcas represoras y a H3K4me3 como activadora. Adicionalmente, se ha detectado una mayor correlación entre la densidad de variaciones somáticas de un solo nucleótido (SNV) con H3K9me3, las que a su vez están fuertemente asociadas a otros indicadores de heterocromatina en células cancerígenas. De igual forma, en estas células se ha determinado que una variación dominante en las tasas de mutación es la organización de la cromatina, con altas tasas en heterocromatina y más reprimidas en eucromatina (15). Lo anterior podría significar variaciones a nivel de accesibilidad al DNA, tanto a mutagenos (42), como señales (43) y complejos de reparación del mismo (44).

Los reguladores de las modificaciones post-traduccionales de histonas son capaces de afectar de manera directa al transcriptoma, inclusive se ha visto que las proteínas JMJD1 pueden regular positivamente oncogenes como CCND1, JUN y MYC (35,45). El regulador epigenético JMJD1B se ve afectado por el oxígeno y sus especies reactivas, oncometabolitos y metales pesados, todos alterados en células cancerosas (35). Asimismo, una sobreexpresión de esta desmetilasa se ha relacionado con una reducción de la eficiencia clonogénica en una línea celular de mielodisplasia (46,47), lo que podría resultar contradictorio si la eliminación de PTMs heterocromáticas catalizadas por esta enzima es capaz de abrir la cromatina a factores transcripcionales (38). Sin embargo, también se ha visto que se sobreexpresa en el carcinoma hepatocelular (48) y puede estimular el crecimiento de células resistentes a la castración cancerosas en la próstata (49). Mientras que una deficiencia de esta desmetilasa puede inhibir la señalización de p53-p21, lo que permite tanto la proliferación como la supervivencia de células cancerígenas. También se ha visto que provoca una acumulación de H3K9me2 y H4R3me2, lo que perjudica la activación de genes imprescindibles para la diferenciación, crecimiento y desarrollo normal de células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPC). Cabe destacar que la abundancia de dichas PTMs represivas se relacionan de manera inversa con la expresión en HSPC. Esta alteración en la expresión génica se correlaciona con el síndrome mielodisplásico, en el que también se presenta una anemia leve, granulocitosis y leucocitosis (38). Estos mismos autores además sugieren que JMJD1B podría actuar como supresor de tumores.

### **1.2.7 JMJD1B en la diferenciación**

El proceso de diferenciación tiene lugar en células jóvenes, inmaduras y no especializadas, mediante el cual adoptan características que les permitirán madurar y especializarse de manera generalmente irreversible (50). Para llevar a cabo dichos cambios ocurre una modulación en la cromatina, lo que altera el programa transcripcional y con ello la expresión génica que induce a una variación en el

fenotipo del linaje en particular. Esto ocurre gracias al establecimiento y eliminación de diferentes PTMs. Un ejemplo de aquello son los grados de metilación en residuos de lisina específicos que son reconocidos por distintas proteínas efectoras, lo que impacta no sólo la cromatina, sino que también el resultado transcripcional (51).

Al respecto, se ha visto que la deficiencia de la demetilasa JMJD1B induce una hematopoyesis defectuosa, acompañada de leucocitosis y anemia moderada (38). De manera similar, el agotamiento tanto de JMJD1A como de JMJD1B influye en la espermatogénesis donde impide la diferenciación de proespermatozoos a espermatozoos funcionales, lo que implica una pérdida de células germinales masculinas y con ello infertilidad en ratones (52). Además, se ha descrito que ambas isoenzimas son necesarias no sólo en el control de la embriogénesis durante el periodo de pre-implantación en el desarrollo del epiblasto, sino que también estas desmetilasas son fundamentales para el mantenimiento de las células madre embrionarias de ratón, donde regulan el correcto establecimiento de metilaciones en la H3K9 (39).

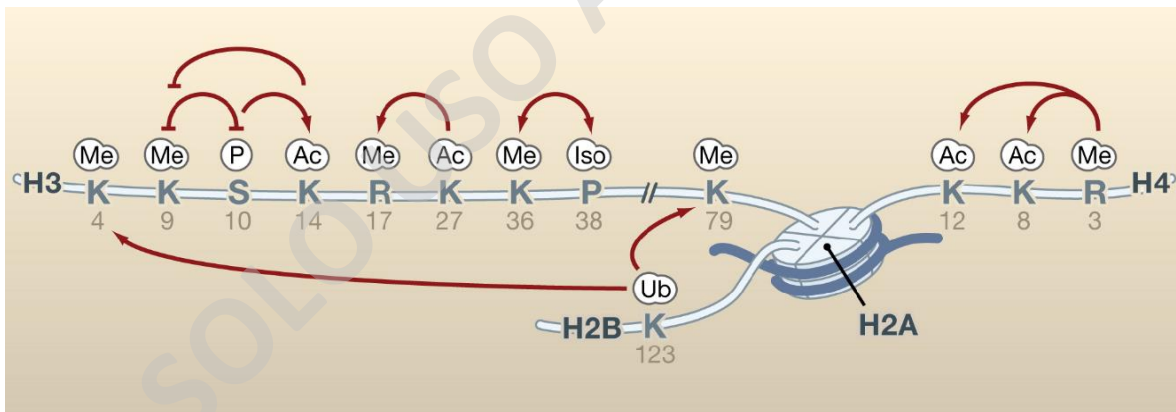
Adicionalmente el agotamiento de JMJD1A, con quien JMJD1B tiene funciones redundantes, induce la diferenciación de células madre, la reducción de la expresión de genes específicos de estas células, además de la inducción de genes marcadores de linaje (53). Incluso se sugiere que estaría involucrada en un fino ajuste de los niveles de expresión a lo largo de la diferenciación, más que como pieza clave en el destino celular y/o la determinación del equilibrio entre pluripotencia y diferenciación (51). Asimismo, otro estudio relacionó esta desmetilasa con un factor de transcripción específico de células musculares lisas y cardíacas, asociándola a la regulación de la diferenciación de estas células (54).

### **1.3 Justificación de la investigación.**

Estudios previos en el laboratorio han demostrado que la reducción de los niveles proteicos de JMJD1B no solo provoca daño en el DNA y afecta el ensamblaje de la cromatina, sino que también genera una acumulación de la chaperona de histonas tNASP, la cual a su vez conduce a la acumulación de las histonas H3 y H4 en las primeras etapas de su cascada de maduración (55). Adicionalmente, JMJD1B pareciera actuar como supresor de tumores en la LMA y a su vez, como promotor de tumores en otros cánceres (35,46,47,56). En esta LMA, tal como en todos los cánceres, ocurre una transformación maligna, seguida de una proliferación descontrolada de la célula madre mielóide, lo que genera un alto número de elementos figurados circulantes (57). Al respecto, algunos cambios epigenéticos serían una causa subyacente del origen del cáncer, los que

usualmente se dan por la desregulación de las enzimas encargadas de generar las distintas modificaciones tanto en el DNA como en las histonas (35). Esta inestabilidad genómica no se limita sólo al cáncer, sino que también representa un punto de convergencia para las etiologías de trastornos del neurodesarrollo, tales como el autismo, en los que se han descubierto mutaciones en genes que codifican para reguladores globales de la expresión génica (58,59).

Por otro lado, se ha visto que la interacción entre metilación y otras PTMs existentes en proteínas histonas y no histonas, afectan las funciones celulares al impactar en la transducción de señales, la estructura de la cromatina, lo que afecta a la expresión génica y la reparación del DNA (60). Las distintas combinaciones de enzimas modificadoras de histonas dictan las PTMs, las que a su vez crean señales específicas que generan alteraciones localizadas en la estructura y función de la cromatina, lo que se conoce como 'código de histonas' (61) (**Figura 5**). De este modo, diversos estudios han sugerido que metilaciones en las histonas podrían ser útiles tanto en el diagnóstico como el pronóstico del cáncer (62). Al respecto, la H3K9me3 no sólo es un marcador de pronóstico negativo para la supervivencia en adenocarcinoma gástrico (63), sino que también se correlaciona con metástasis en ganglios linfáticos en el cáncer colon-rectal (64). Mientras que los niveles de H3K9me2, muestra un aumento durante la progresión de este mismo cáncer (65).



**Figura 5: Diatónica entre modificaciones de histonas.** La influencia positiva de una modificación sobre otra se muestra con una flecha y el efecto negativo con una línea de plato (66).

De la misma manera, datos previos en células HeLa han mostrado que al eliminar JMJD1B los niveles de H3K9me no presentan un aumento marcado, sino que por el contrario, estos disminuyeron (55). Igualmente, otro estudio en células HEK293T mostró que al haber ausencia de esta desmetilasa se producía una acumulación de H3K9me2 (38). Lo anterior, siendo ambos sustratos de JMJD1B. Esto



resulta tan interesante como que su inhibición es beneficiosa para ciertos cánceres, pero su accionar es fundamental en suprimir la génesis de otros (35).

Al respecto, a nosotros nos gustaría saber cuál es el impacto que tiene esta histona desmetilasa no sólo en términos de PTMs, sino que también en la interactómica sobre la histona H3 y como esto afecta a la célula. La línea celular utilizada para dicho propósito fueron las células madre embrionarias de ratón (mESC), dado que existen otros estudios que describen fenotipos tanto de sobreexpresión como de deficiencia de JMJD1B en líneas de células madre, lo que nos da una base no solo de comparación, sino que también de discusión de nuestros resultados.

Adicionalmente, la motivación de poder entender la dinámica molecular, en la que se ve involucrada JMJD1B, que gatilla la inestabilidad genómica y abre las puertas a un cáncer o la supresión del mismo, para poder generar terapias alternativas a la preexistentes que sean no sólo más específicas, sino que también menos invasivas y de mayor acceso para la población. Para ello, nos preguntamos ¿cómo afecta JMJD1B la cascada de maduración de la histona H3?

#### **1.3.1 Caracterización mESC KO de JMJD1B.**

Un primer paso para caracterizar a las células mESC KO de JMJD1B es analizar su crecimiento, división y supervivencia respecto a un control (WT y KH2), para ello los ensayos de proliferación y diferenciación son bastante útiles. Respecto a los métodos que evalúan la proliferación, estos varían en sensibilidad, reproducibilidad y la compatibilidad que puedan tener con tecnologías de alto rendimiento. Existe el método convencional de teñir una alícuota del cultivo celular y contar manualmente por cuadrante en un hemocitómetro utilizando un microscopio. También mediante un software generador de imágenes multimodo que cuantifica las células mediante un algoritmo de recuento. De igual forma, se puede realizar un ensayo que utiliza la actividad metabólica de las células viables para su cuantificación al medir la luminiscencia producida por aquella muestra en cuestión (67). Sin embargo, por temas de tiempo, costo, logística y disponibilidad de recursos en el laboratorio es esta última metodología la utilizada. Por su parte, para la diferenciación de células madre existen diversos protocolos que varían en función del estudio en cuestión y con ello el tipo celular que se desea obtener. No obstante, el norte de esta diferenciación es observar que semejanzas y/o diferencias existen entre las células mESC KO de JMJD1B y aquellas mESC que sí presentan esta desmetilasa. Es por ello que se siguió un protocolo de diferenciación tradicional.

#### **1.3.2 Interactómica de la histona H3.**

Para conocer las interacciones de la histona H3, debemos tener en consideración los métodos existentes que permiten analizar PPIs. Las PPIs o 'Protein-Protein Interactions' corresponden a asociaciones físicas y específicas entre proteínas dada por fuerzas biomoleculares (68). Sin embargo, los métodos existentes para su análisis no conocen de matices, dado que o se analiza todo lo que interactúa con una proteína en cuestión o sólo una interacción de interés en particular. Adicionalmente, estos métodos varían según el enfoque del estudio, es decir, si es *in vivo*, *in vitro* o *in silico*. En este estudio en particular se utilizaron células madre embrionarias de ratón, o más conocidas por sus siglas en inglés como mESC, convirtiéndolo en un estudio *in vitro*. Lo anterior, nos deja con la cristalografía de rayos X, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, cromatografía de afinidad, complementación de fragmentos de proteínas o PCA, purificación por afinidad en tándem o TAP, visualización de fagos, coimmunoprecipitación o CoIP y/o matrices de proteínas (69).

No obstante, como el interés radica en conocer todas las proteínas con las que la histona H3 interactúa, algunas de estas técnicas como PCA y visualización de fagos quedan pequeñas, al limitar su estudio a una PPI por despliegue (70,71). De la misma manera, la cristalografía de rayos X y la espectroscopia RMN quedan fuera al responder a una necesidad más estructural del analito en cuestión (72,73). Por su parte, tanto la cromatografía por afinidad como las matrices de proteínas se descartan dada la complejidad de las metodologías frente a resultados que se pueden obtener mediante métodos más cortos y/o sencillos (74,75). Por otro lado, tenemos a la CoIP y a TAP cuyos resultados son bastante similares, al igual que sus metodologías que difieren en pocos pasos y que además, culminan en una espectrometría de masa (76–78). Sin embargo, dado que las líneas celulares utilizadas contienen el epítipo flag fusionado a la histona H3, la CoIP es más conveniente debido a que permite un actuar más directo, con menos pasos y más rápido que su par TAP.

### **1.3.3 PTMs de la histona H3.**

Para conocer las modificaciones postraduccionales presentes en la histona H3, debemos nuevamente discernir según el enfoque del estudio, dado que de ser *in silico* existen softwares gratuitos en los cuales se podrían predecir estas PTMs (79). No obstante, tal como se describió anteriormente, el enfoque de esta tesis científica es *in vitro*. Por lo que, las opciones oscilan entre etiquetado metabólico que puede ser o no radiactivo, el que estaría acoplado a un western blot y/o espectrometría de masa, nuevamente alguna técnica de purificación acoplada a espectrometría de masa, SILAC e inmunobloting (western blot) (80). Sin embargo, dado que el foco de interés son las

PTMs de la histona H3 recientemente sintetizada y a la evidencia encontrada previamente en el laboratorio, se optó por purificar directamente a los ribosomas mediante gradientes de sacarosa, las que mediante un western blot serían seleccionadas para una espectrometría de masas posterior, para lograr obtener la información deseada.

SOLO USO ACADÉMICO

## **2-. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis.**

JMJD1B regula la interactómica y las PTMs de la histona H3 recientemente sintetizada en células madre embrionarias de ratón, influyendo sobre su proliferación y diferenciación.

### **2.2 Objetivo General.**

Caracterizar la función de JMJD1B en la maduración de la histona H3 recientemente sintetizada y en la proliferación y diferenciación celular.

### **2.3 Objetivos Específicos.**

- i. Analizar la proliferación y diferenciación de las células mESC knockout de JMJD1B.
- ii. Determinar la interactómica de la histona H3 en la condición knockout de JMJD1B.
- iii. Determinar las PTMs de histonas H3 y H4 sintetizadas *de novo* en la condición knockout JMJD1B.

SOLO USO ACADÉMICO

### **3-. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Materiales.**

Frascos de 1000, 500 y 250 mL con tapa rosca; Probeta graduada de 2000, 1000, 100 y 50 mL; Pipetas Serológicas de 25, 10, 5 y 2 mL; Pipetas Pasteur; Placas Petri 150, 100 y 60 mm; Placas de 96, 12 y 6 pocillos; Micropipetas monocanal 0,2-2, 0,5-10, 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu$ L; Micropipeta multicanal 20-200  $\mu$ L; Puntas de micropipeta con y sin filtro de 10, 20, 200 y 1000  $\mu$ L; Microtubos de 0,5, 1,5 y 2 mL; Tubos centrifuga de 15 y 20 mL; Gradillas para microtubos y tubos centrifuga; Cristales para geles; Base para cristales; Cepillos para geles; Soporte para geles; Cámara de corrida y transferencia; Membrana PVDF; Papel de Transferencia; Aparato de transferencia; Jeringa hipodérmica estéril 5, 10 y 20 mL; Tubos de ensayo; Tubos de ultracentrifuga; Papel Alusa; Film plástico; Homogeneizador Dounce tipo B; Canaleta; Papel parafilm; Tubos de ensayo; Placa de transferencia; Papel de transferencia.

#### **3.1.1 Soluciones y Reactivos.**

DMEM (SH30081, GE Healthcare Life Science); FBS (16000044, GE Healthcare Life Science); Medio DMEM completo (15%FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/mL penicilina, 1x aminoácidos no esenciales, 0,1mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1000  $\mu$ /ml LIF, 1 $\mu$ M inhibidor de MEK1/1, 3  $\mu$ g GSK3 inhibidor); Tripsina (SH30042, GE Healthcare Life Science); 0,025% Tripsina (0.025% en PBS 1x); Gelatina 2% (en H<sub>2</sub>O) (G1393-100 mL, Merck); KCl (104936, Merck); NaCl (106404, Merck); MgCl<sub>2</sub> (105833, Merck); PBS 10x pH 7,4 (70011044, Thermo Scientific); TTBS 10X (1% Tween, NaCl 1,5 M, Tris base 200 mM (pH 7,4) y agua destilada); Acrilamida (A8887, Sigma Aldrich); Bis-acrilamida (15516024, Invitrogen); DMSO (85190, Thermo Scientific); Reactivo de Bradford (1856209, Thermo Scientific); Ampollas de BSA estándar (23209, Thermo Fisher Scientific); BSA liofilizada (A7906-100G, Sigma Aldrich); Azul de bromofenol (AZ-0395, Winkler);  $\beta$  -mercaptoetanol (444203, Calbiochem); Sample Buffer (DTT 0,5 M, 10% SDS, 50% glicerol, 10%  $\beta$  -mercaptoethanol y azul de bromofenol); Running Buffer 10X (250 mM Tris base, 2 M Glicina y 1% SDS); Buffer de Transferencia 1x (25 mM Tris base, 0,2 M Glicina, 0,1% SDS, 20% Metanol); Ponceau S (114275, Merck) ;Rojo Ponceau 0,1% (5% Ácido Acético, 0,1% Ponceau S); Metanol (106009, Merck); Beads de agarosa anti-Flag (A2220, Sigma Aldrich); DTT (43815, Sigma-Aldrich); EDTA (15576-028, Invitrogen); Etanol (100983, Merck); Glicerol (BM-0800, Winkler); NP40 (BM-1225, Winkler); PMSF (36978, Thermo Scientific); SDS (sc-264510c, Santa Cruz); Tris base (108382, Merck); Tween 20 (1610781, BIO-RAD); BC350 (Tris 20 mM (pH 7,4), KCl 350 mM, EDTA 0,2 mM,  $\beta$  -

mercaptoethanol 10,08 mM , PMSF 0,2 mM y 10% glicerol); BC100 (20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 100 mM Cloruro de Potasio, 10% Glicerol, 0,2 mM EDTA, 10,08 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,2 mM PMSF); BC350/0,05% NP40; Buffer de lisis IP (Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, EDTA 0,4 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,4 mM y 20% glicerol); Solución de péptidos Flag de la elución; Azida de sodio (S2002-100G, Sigma Aldrich); Solución de bloqueo (1% BSA, TTBS 1X y Azida de sodio); Lower Buffer (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) y 0,4% SDS); Upper Buffer (0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) y 0,4% SDS); APS (7727-54-0, Merck); TEMED (110732, Merck); 30% Acrilamida (30% Acrilamida y 0,8% Bis-acrilamida); Buffer A (Tris 10 mM (pH 7,9), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM y PMSF 0,2 mM); Buffer B 10X (Tris 0,3 M (pH 7,9), KCl 1,4 M y MgCl<sub>2</sub> 0,03 M); Buffer C (Tris 20 mM (pH 7,9), Glicerol 25% (v/v), NaCl 0,42 M, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,5 mM y DTT 0,5 mM); Cloroformo (48520-U, Sigma Aldrich); H<sub>2</sub>O-LC; Buffer de lisis para Purificación de Ribosomas (Tris 100 mM (pH 7,4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1% Tritón x-100, DTT 1 mM, PMSF 100  $\mu$ M, CHX 100  $\mu$ g/mL, Leupeptina 4  $\mu$ M y Aprotinina 0,3  $\mu$ M); Tritón X-100 (9002-93-1, Sigma Aldrich); Sacarosa (S0389-1KG, Sigma Aldrich); HEPES (54457, Sigma Aldrich); Acetato de magnesio (M5661, Sigma Aldrich); Acetato de potasio (104820, Merck); KOH (221473, Sigma Aldrich); Leupeptina (L2884, Sigma Aldrich); Aprotinina (A1153, Sigma Aldrich); Soluciones de sacarosa para purificación de ribosomas (Tritón X-100 0,5% v/v, HEPES-KOH 50 mM (pH 7,5), Acetato de magnesio 1 mM, Acetato de potasio 80 mM, agua bidestilada y sacarosa según corresponda); Glicerol (4750-OP, Calbiochem); Glicina (D8418, Sigma Aldrich); PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10- to 180 kDa (26617, Thermo Scientific); MEK1/2 inhibitor (PD0325901) y GSK3 inhibitor (CHIR99021).

### 3.1.2 Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados se encuentran en la **Tabla 1**. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti rabbit IgG (611-1102, Rockland); anti mouse IgG (610-1302, Rockland) y anti rat IgG (612-9102, Rockland). Las diluciones se realizaron en TTBS 1X.

### 3.1.3 Kits comerciales.

Sustrato de quimioluminiscencia para western blot Pierce® ECL (32106, Thermo Fisher Scientific); Sustrato de duración ampliada SuperSignal™ West Dura (34075, Thermo Fisher Scientific); Cell Counting Kit-8 (96992, Sigma Aldrich).

### 3.1.4 Equipos y Softwares.

Los equipos utilizados fueron ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad); Baño termostático; Lector multi-modal Synergy H1; Incubador de CO<sub>2</sub> con camisa de agua serie 8000 WJ modelo 3429 (Thermo Scientific); pH-metro; NanoDrop 2000; centrífuga Heraeus Fresco™ 17 Microcentrifuge W 75002420 (Thermo Scientific); Campana de flujo laminar LN-120 de Nüve; Generador de voltaje; Agitador vórtex; Agitador vórtex multispín; Bomba de extracción; Oscilador rotador; Rotador de tubos; Dry bath (Sahara 320, Rocker Scientific); Balanza; Microscopio Olympus (ckx41, Arquimed); Ultracentrífuga; Espectrómetro de masas. Asimismo, los softwares utilizados Adobe Photoshop Adobe 13.0 x32; Illustrator versión 25.4.1; Perseus versión 1.6.15.0.

### **3.1.5 Otros.**

Guantes de látex y nitrilo talla XS; Cinta masking tape; Plumones punta fina colores negro, rojo y azul; Atomizador; Temporizador; Potes de vidrio y plástico; Toallas de papel Kleenex y Scott; Rotor SW 41 Ti ultracentrífuga.

## **3.2 Metodología**

### **3.2.1 Líneas celulares**

Las células trabajadas fueron células madre embrionarias de ratón (mESC) de tres tipos: las wild type (WT), contenedoras de la fusión H3.1 con el epítipo Flag, las knockout de JMJD1B (KO) que también contienen la fusión H3.1-Flag y las (KH2), las que no contienen la fusión ni el knockout. Estas células crecieron con el medio de cultivo DMEM suplementado con 15% de FBS, 1,1% L-glutamina, 1,1% penicilina/estreptomicina, 1,1% de aminoácidos no esenciales, 0,1 mM β-mercaptoetanol, 100 μL LIF y 2 inhibidores (1 μM MEK1/2 y 3 μM GSK3) en gelatina 2% dejada overnight, se tripsinizaron con 0,025% de tripsina y cuya incubación fue a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2 Ensayo de proliferación celular.**

Se cultivaron 4 placas de 96 pocillos en duplicado con las tres líneas celulares mESC en 200 μL de medio. Veinticuatro horas después, se desechó el medio de cultivo de una de las placas y se añadió en su lugar 90 μL de medio de cultivo acompañado de 10 μL del reactivo CCK8. Se homogenizó teniendo cuidado con la formación de burbujas y se llevó a la incubadora por 2 horas. Adicionalmente, se añadió tanto medio como reactivo a dos pocillos sin células a modo de blanco. Luego de dicho tiempo, se midió la absorbancia a 450 nm con el lector multi-modal Synergy H1. Este proceso se repitió 48, 72 y 96 horas después de sembrar de las células.

### **3.2.3 Ensayo de diferenciación celular.**

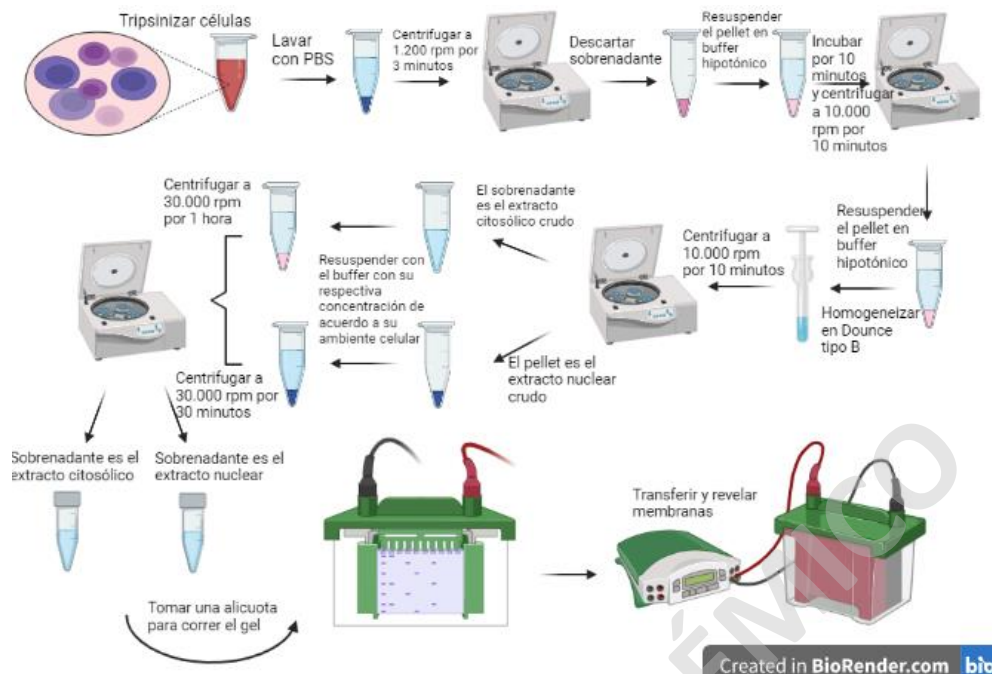
Se sembraron las células mESC WT, KH2 y KO de JMJD1B en el medio de cultivo sin LIF y se dejaron en la incubadora por 2 días. Pasado ese tiempo, se retira con cuidado el medio y se le añade medio fresco sin LIF. Se continuaron creciendo las células y cambiando el medio cada semana. Cada día, desde su siembra las placas se fotografiaron al microscopio con un aumento 20X, durante un periodo de 7 días.

### **3.2.4 Extractos celulares de células mESC.**

La metodología utilizada se basó en la descrita por Dignam y colaboradores (81). Bajo campana, células con una confluencia del 70% promedio, se lavaron con 1/3 del volumen del medio con PBS 1X, se añadió 1/4 del volumen del medio de tripsina y dejó por dos minutos en la incubadora. Luego de confirmar que las células se despegaron al microscopio, se inactivó la tripsina con el mismo volumen agregado con medio. Se resuspendieron teniendo el cuidado de arrastrar todo en el medio y se llevó a un tubo de centrifuga. Una vez fuera de cultivo, se centrifugaron las células a 1.200 rpm por 3 minutos. Luego de desechar el medio, las células se resuspendieron en 5 mL de PBS 1X y se volvió a centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos. Se repitió 2 veces el lavado.

Desde este momento se comenzó a trabajar en hielo. Se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1X y se centrifugó a 1.500 rpm por 3 minutos a 4°C. Con una jeringa se descartó el sobrenadante y se anotó el volumen del pellet (VP). Se añadió 5 veces el VP de buffer A en mL, se resuspendió el pellet y se incubó por 10 minutos a 4°C. Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se deshechó el sobrenadante y se añadió 2 veces el VP de buffer A. Se resuspendió nuevamente y se lisaron con un homogeneizador Dounce tipo B, en donde con un vástago se sube y baja 10 veces cuidando que no se formen burbujas. Se devolvió al tubo para una nueva centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el extracto citosólico crudo (sobrenadante) a otro tubo y se le añadió buffer B 1X. Se mezcló y centrifugó a 30.000 rpm por 1 hora a 4°C. Por su parte, el extracto nuclear crudo (pellet) se resuspendió en 2 veces el VP en mL de buffer C y se agitó a 4°C por 30 minutos para luego centrifugar a 30.000 rpm por media hora a 4°C. Una vez finalizadas ambas centrifugaciones, se rescataron ambos sobrenadantes a tubos rotulados y se guardaron a -80° C.





**Figura 6: Esquema del protocolo de extractos celulares y validación por western blot.** Se muestra de forma simplificada los pasos seguidos para obtener extractos celulares y su posterior validación realizada vía western blot (3.2.5).

### 3.2.5 Cuantificación de proteínas.

Para conocer la concentración de los extractos celulares preparados, se descongelaron paulatinamente en hielo. Mientras, se tomó una placa de 96 pocillos y se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo de Bradford para cada medición. Luego se agregaron concentraciones crecientes de BSA entre 4-0,125  $\mu$ g/mL, dejando un pocillo sin BSA a modo de blanco, y llevando a un volumen final de reacción de 200  $\mu$ L. En paralelo, se añadieron distintas diluciones de cada muestra. El ensayo se leyó en el lector multi-modal Synergy H1, midiendo la absorbancia a 595 nm. Los resultados se analizaron en una planilla Excel.

### 3.2.6 Western blot.

Las muestras se descongelaron en hielo y se mezclaron con Sample buffer. Luego, se calentaron a 100°C por 5 minutos para posteriormente cargarse junto a marcadores de proteínas comerciales, en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8 ó 12,5%. El gel se corrió por 1 hora a 150 volts. Luego, el gel se transfirió a una membrana PVDF con buffer de transferencia por 90 minutos a 300 volts a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, la membrana de PVDF se tiñó con rojo Ponceau 0,1% por 5 minutos en agitación y se fotografió. Posteriormente la membrana se bloqueó en la solución

TTBS/BSA 1% por 45 minutos. Luego se agregaron los anticuerpos primarios (**Tabla 1**) y se incubaron con agitación a 4°C toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS 1X en agitación por 5 minutos. Se añadió el anticuerpo secundario correspondiente y se dejó en agitación por 45 minutos. Se lavó 3 veces con TTBS 1X en agitación por 5 minutos. Luego, se reveló utilizando los reactivos del kit de quimioluminiscencia en una relación 1:1, y se visualizó en el equipo ChemiDoc Touch Imaging System (Biorad).

**Tabla 1: Anticuerpos utilizados.** Se muestran los anticuerpos primarios con los nombres de las proteínas a las cuales reconocen junto con sus respectivas diluciones. Asimismo, el anticuerpo secundario utilizado con su dilución correspondiente.

Anticuerpo 1 <sup>o</sup>	Dilución	Código	Anticuerpo 2 <sup>o</sup>	Dilución
$\beta$ -Actina	1:20000	Alícuota cedida por Pamela Farfán, Fundación ciencia & vida	Rabbit	1:5000.
Histona H3	1:5000/1:20000	ab1791, Abcam	Rabbit	1:5000.
Histona H4	1:5000/1:10000	ab10158, Abcam	Rabbit	1:5000.
TOPO I	1:1000.	sc32736, Santa Cruz	Mouse	1:5000.
NASP	1:500/1:1000	ab181169, Abcam	Rabbit	1:5000.
HSC70	1:5000.	ab19136, Abcam	Rat	1:5000.
HSP90	1:2000.	ab13492, Abcam	Mouse	1:5000.
HIRA	1:1000.	ab20655, Abcam	Rabbit	1:5000.
ASF1	1:1000.	Donado por la Dra Genevieve Almouzni	Rabbit	1:5000.
JMJD1B	1:500/1:000	2621S, Cell Signaling	Rabbit	1:5000.
FLAG	1:000.	F1804, Sigma	Mouse	1:5000.
RPL5	1:40000	ab86863, Abcam	Rabbit	1:5000.
RPS3a	1:50000	ab171742, Abcam	Rabbit	1:5000.
H3K9me1	1:2000.	ab9045, Abcam	Rabbit	1:5000.

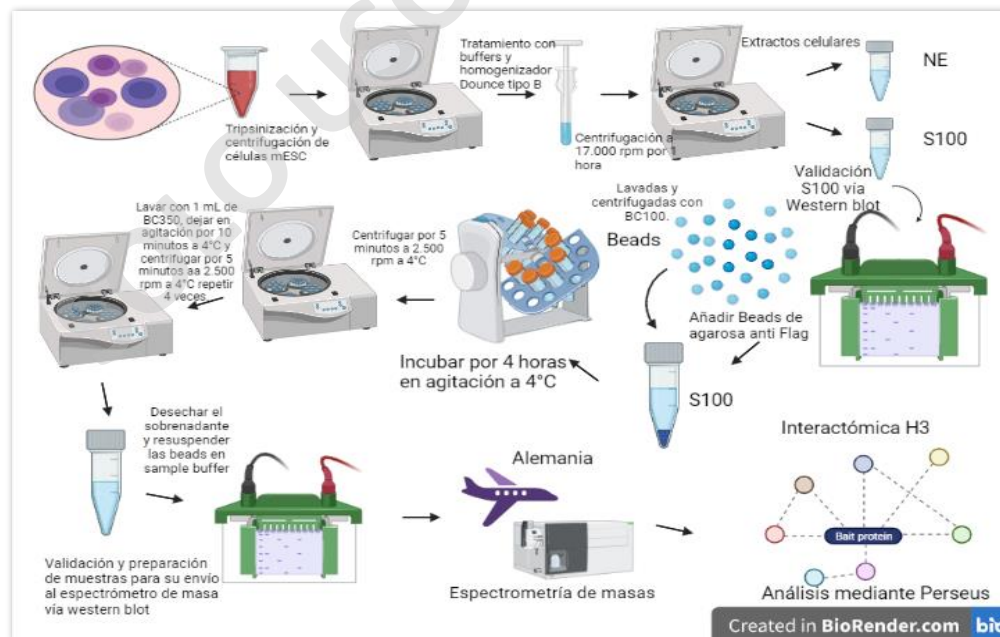
### 3.2.7 Co-Imunoprecipitación.

Se tomaron 100  $\mu$ L de beads de agarosa conjugadas con anticuerpos anti Flag y lavaron con buffer BC350 centrifugando a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Paralelamente, se tomó 1 mg de extracto citosólico de las líneas celulares mESC KH2, WT y KO de JMJD1B y se incubaron con las beads por 4 horas en agitación a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se rescató para el western blot de validación. Las beads se lavaron con buffer BC350/0,05%NP40 en agitación por 10 minutos a 4°C. Se centrifugó a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Este lavado se repitió 2 veces. Finalmente, se realizó un cuarto lavado con buffer BC100 en agitación por 10 minutos a 4°C y se centrifugó a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eluyó las beads

con 0.2 mg/mL del péptido Flag en BC100 en agitación por 15 minutos a 4°C y se centrifugó a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante como elución 1 y se volvió a repetir la incubación y centrifugación con una nueva solución de péptido Flag para obtener la elución 2. El ensayo de co-inmunoprecipitación se analizó por western blot con los anticuerpos descritos en la **Tabla 2**. Para secuenciación de proteínas, se realizó el mismo protocolo. Las muestras eluidas se corrieron en un gel al 12,5 % PAGE, el cual se corrió 0.5 cm, se cortó el gel y envió al espectrómetro de masas en el laboratorio del Dr Axel Imhof en Alemania (Ludwig-Maximilians-University of Munich, LMU). La información obtenida del espectrómetro de masas fue procesada y analizada mediante la aplicación Perseus versión 1.6.15.0.

**Tabla 2: Anticuerpos Co-inmunoprecipitación.** Se muestran los anticuerpos primarios con los nombres de las proteínas a las cuales reconocen junto con sus respectivas diluciones. Asimismo, el anticuerpo secundario utilizado para cada una con su dilución correspondiente.

Anticuerpo 1rio	Dilución	Anticuerpo 2rio	Dilución
Histona H3	1:20000	Rabbit	1:5000.
NASP	1:1000.	Rabbit	1:5000.
FLAG	1:000.	Mouse	1:5000.
HSP90	1:2000.	Mouse	1:5000.
H4	1:1000.	Rabbit	1:5000.
HSC70	1:5000.	Rat	1:5000.

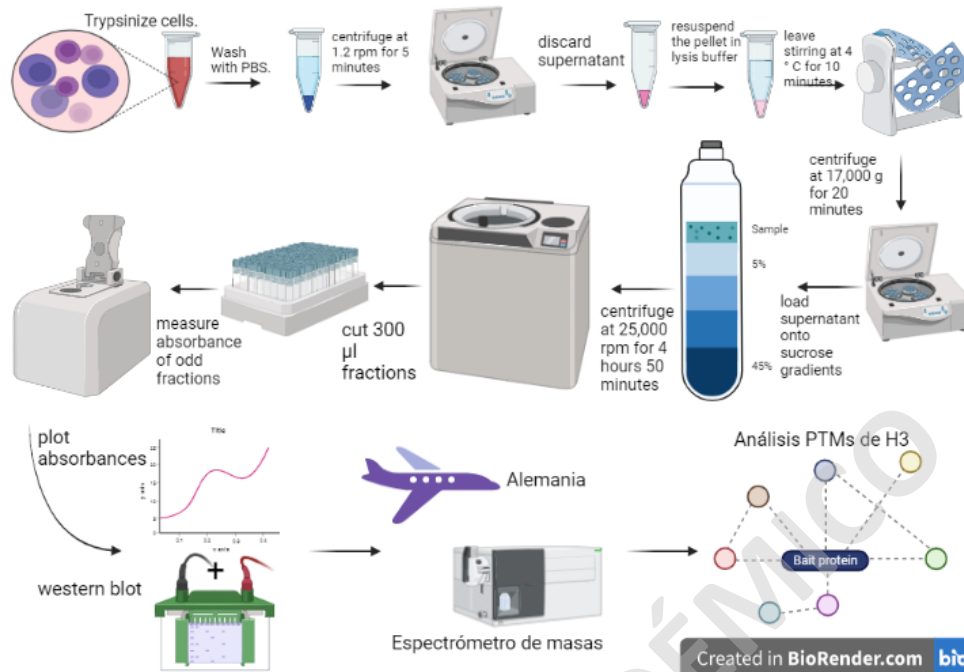


**Figura 7: Esquema simplificado de la experimentación para conocer la interactómica de la histona H3.** Se muestra una interconexión entre los extractos celulares (3.2.4), junto a su validación por western blot, con la Co-inmunoprecipitación con beads de agarosa (3.2.7), su validación por western blot, su envío al espectrómetro de masas y su posterior análisis mediante Perseus.

### **3.2.8 Purificación de ribosomas mediante una gradiente de sacarosa 5-45%.**

Los gradientes de sacarosa se prepararon un día antes de su uso, mediante la adición de las soluciones de sacarosa de distinta concentración (45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 y 5%) en los distintos órdenes a un tubo de ensayo 13x100 mm de 10 mL. Se comenzó con la solución de mayor concentración, 45% sacarosa, hasta llegar a la de 5%. Adicionalmente, se preparó el buffer de lisis en la que se cargará la muestra en las columnas, el que se compone de 100 mM Tris (pH 7,4), 50 mM KCl, 25 mM cloruro de magnesio, 100 µg/mL CHX, 1 mM DTT, 100 µM PMSF, 4 µM Leupeptina, 0,3 µM Aprotinina y 1% Tritón X-100.

Se tripsinizaron 3 placas p150 y se centrifugaron a 1.200 rpm por 5 minutos. El pellet celular se lavó con 10 mL de PBS 1X y resuspendió en 5 veces el volumen del pellet celular en buffer de lisis de ribosomas, se dejó en agitación a 4°C por 10 minutos para luego centrifugar a 17.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cargaron los uL resultantes en la gradiente de sacarosa preparada el día anterior. La gradiente se corrió en el rotor SW 41 Ti a 45.000 rpm durante 4 horas con 50 minutos de tiempo 4°C. Una vez terminada la ultracentrifugación, la gradiente se cortó en 300 µL. Las fracciones se analizaron por Absorbancia a 254 nm y western blot con los anticuerpos descritos en la **Tabla 3** y se guardaron a -80°C.



**Figura 8: Esquema de protocolo de la purificación de ribosomas.** Se muestra de manera simplificada los pasos a seguir para la obtención de las muestras para analizar las PTMs de la histona H3.

**Tabla 3: Anticuerpos purificación de ribosomas.** Se muestran los anticuerpos primarios con los nombres de las proteínas a las cuales reconocen junto con sus respectivas diluciones. Asimismo, el anticuerpo secundario utilizado para cada una con su dilución correspondiente.

Anticuerpo 1rio	Dilución	Anticuerpo 2rio	Dilución
FLAG	1:000.	Mouse	1:5000.
Histona H4	1:5000.	Rabbit	1:5000.
RPL5	1:40000	Rabbit	1:5000.
Histona H3	1:5000.	Rabbit	1:5000.
RPS3a	1:50000	Rabbit	1:5000.

### 3.2.9 Precipitación de proteínas con MeOH/cloroformo

Se agregó 3 partes de MeOH 100% respecto de la muestra y vortexeó. Se añadió una parte de cloroformo 100% y vortexeó nuevamente. Se añadió tres partes de H<sub>2</sub>O respecto a la muestra y vortexeó por 10 segundos. Luego, se centrifugó a 17.000 rpm por 5 minutos a 4°C y se eliminó la fase superior formada. Se añadió 3 partes de MeOH 100% respecto a la muestra inicial, vortexeó por 10 segundos. Se centrifugó a 17.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente, los tubos se dejaron secar al aire. La muestra se resuspendió en 20 µl de buffer de carga 2X y se dejaron correr en un gel

12,5% SDS/PAGE. Luego, con la ayuda de un bisturí se cortó la zona deseada y se envió al laboratorio del Dr Axel Imhof en Alemania (Ludwig-Maximilians-University of Munich, LMU) para su análisis.

### 3.2.10 Análisis de resultados de espectrometría de masas

Para realizar el análisis de la espectrometría de masas de la interactómica de la histona H3 se utilizó el programa Perseus, en el cual se catalogaron los resultados en 4 grandes categorías: *main* contenedor en este caso de las cuantificaciones libre de marca, *numerical* contenedora de los valores numéricos, *categorical* que contiene información de sí o no representados con un signo +, *text* que engloba todo aquel dato que no es un número, como los nombres de genes y/o proteínas. Una vez clasificados, estos datos fueron filtrados para evitar contaminantes como la queratina y las IgG anti FLAG y sometidos a diversos filtros y agrupamientos para obtener el universo de proteínas que interactúa con la histona H3 (**Figura 13**).

Por su parte, en PANTHER utilizando los genes tanto del enriquecimiento como de la interactómica de la histona H3 el tipo de análisis que se realizó fue un test de sobrerrepresentación para proceso biológico, función molecular, componente celular y clase de proteína (este último sólo para el enriquecimiento). Donde como lista de referencia se utilizaron todas las bases de datos de *Mus musculus*, el tipo de test exacto de Fisher y como corrección el cálculo de la tasa de falso descubrimiento (FDR). Los que posteriormente se visualizaron en gráficos de barras.

En cambio, los datos de la espectrometría de masas de las PTMs fueron enviados en una planilla Excel por el laboratorio del Dr Axel Imhof en Alemania. Donde se describió el porcentaje de las histonas que contenían una modificación en particular, para las cuales se calculó la desviación estándar para conocer la dispersión de los datos. Además, se tabuló y graficó esta información para así facilitar su visualización.

#### 4-. RESULTADOS.

##### 4.1 Caracterización de las células madre embrionarias de ratón (mESC) que tienen eliminado el gen que codifica para la proteína JMJD1B (KO JMJD1B).

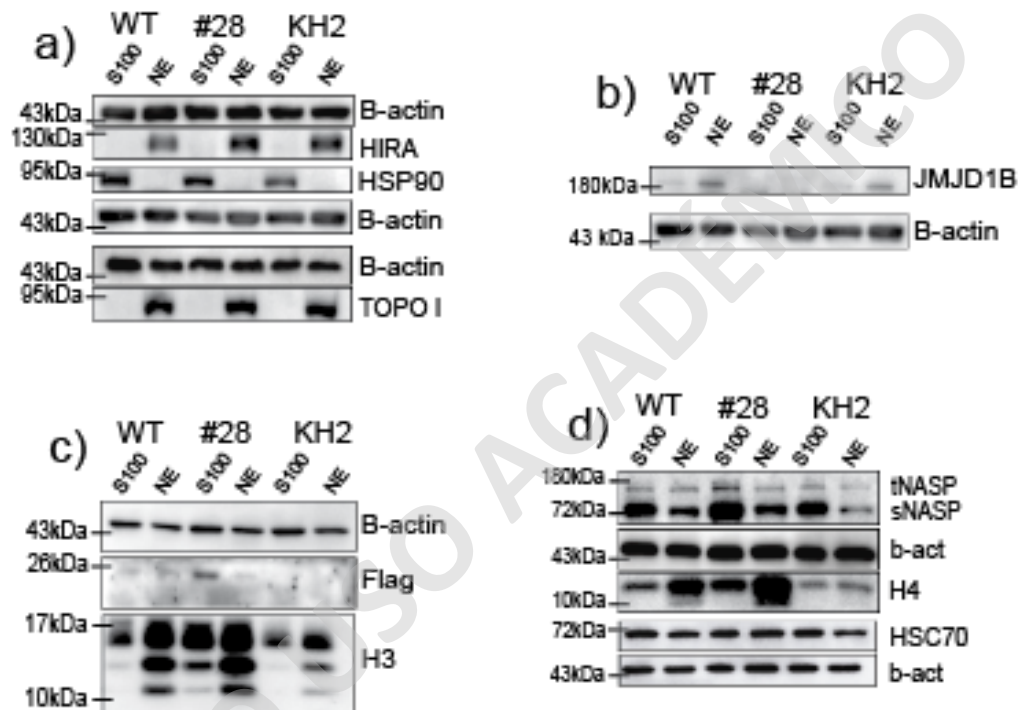
Con el objetivo de entender cómo JMJD1B afecta la cascada de maduración de la histona H3, en el laboratorio se realizó la eliminación del gen de JMJD1B (“knockout” KO JMJD1B) en células en cultivo mediante la técnica de CRISPR-Cas9. Para esto se utilizaron las células madre embrionarias de ratón (mESC) que expresan la histona H3 fusionada con el péptido FLAG (mESC WT, wild-type) donadas por el laboratorio del Dr. Danny Reinberg (NYU, Estados Unidos) (2). Luego, mediante western blot se validó la eliminación de la proteína en los distintos clones de mESC KO de JMJD1B obtenidos (información no mostrada), siendo el clon número 28 (#28) quien mostró una ausencia total de dicha proteína. Por lo que, fue el elegido para continuar la experimentación.

##### 4.1.1 Obtención de extractos celulares y confirmación del KO JMJD1B.

Para la obtención de las muestras para el estudio de la interactómica de la histona H3, primero se prepararon los extractos celulares correspondientes, utilizando las células KH2, las cuales son las mESC originales, sin H3 fusionada a FLAG, las células mESC WT y las células mESC KO JMJD1B #28 (ambas con la fusión H3.1-FLAG). En la **Figura 9** se muestra un western blot de los extractos celulares realizados a dichas células, en donde se evalúan distintas proteínas para determinar su calidad, pureza y en el caso de mESC KO de JMJD1B, validar la ausencia de esta proteína.

Primero se evaluó la calidad de los extractos citosólicos (S100) y nucleares (NE) analizando distintas proteínas que son exclusivas de núcleo, de citosol y otras de interés presentes en ambos extractos. En la **Figura 9a**, se observan las proteínas nucleares HIRA y TOPO I sólo presentes en extractos nucleares, mientras que HSP90 por el contrario sólo se encuentra en extractos citosólicos, confirmando la calidad de los extractos. Como control de carga se usó la proteína  $\beta$ -actina que se encuentra tanto en extractos citosólicos como nucleares. En la **Figura 9b** se valida el knockout de JMJD1B en las mESC KO, debido a que no se observa la banda correspondiente a JMJD1B solamente en el extracto derivado de las células KO JMJD1B. Además, se observa que JMJD1B es principalmente una proteína nuclear. Consistente con trabajos anteriores (55), la **Figura 9c** da cuenta de un fuerte enriquecimiento de la histona H3 en mESC KO de JMJD1B en ambos extractos, siendo mucho más evidente el enriquecimiento en el citosol. De igual forma pasa con la proteína FLAG-H3 en el extracto citosólico. Además, se confirma la presencia de Flag-H3 sólo en las células mESC WT y KO de JMJD1B

y no en las células KH2. La **Figura 9d** muestra una mayor presencia de la chaperona t y sNASP en los extractos citosólicos correspondientes a las células mESC KO de JMJD1B, consistente con nuestros estudios anteriores (55). Igualmente, se ve un marcado aumento de la histona H4 en los extractos de mESC KO de JMJD1B, tanto en extracto citosólico como nuclear. Adicionalmente, HSC70 no presentó alteraciones en ningún extracto respecto a las líneas celulares en cuestión. En función de todo lo anterior, la **Figura 9** permite no sólo validar el knockout de JMJD1B, sino que también la calidad y pureza de los extractos de las tres mESC evaluadas.

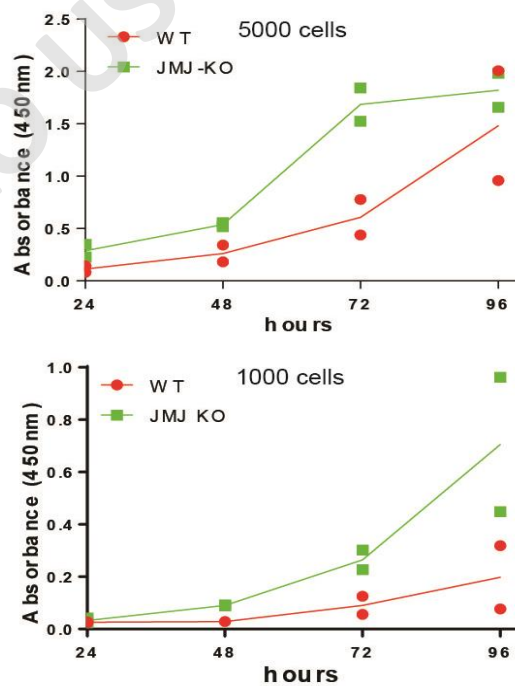


**Figura 9: Western blot de los extractos celulares.** Se muestran las proteínas de interés en 5  $\mu$ g de extractos celulares de mESC WT, KO de JMJD1B y KH2. El #28 hace referencia al número del clon mESC KO de JMJD1B utilizado. S100 se refiere al extracto citosólico, mientras que NE al extracto nuclear. (a) Se muestran HIRA y HSP90 compartiendo control de carga  $\beta$ -actina, al igual que TOPO I con su respectivo control de carga en un gel de 8% de acrilamida. (b) Se muestra JMJD1B con su control de carga en un gel de 8% de acrilamida. (c) Compartiendo el control de carga en un gel de 12.5% de acrilamida, se muestra Flag y la histona H3. En H3 se observan 3 bandas, la más pesada corresponde a H3, bajo ella se encuentra un producto proteolítico y bajo la histona H4. (d) Se muestran t (banda superior) y s (banda inferior) NASP y la histona H4 compartiendo control de carga y más abajo a HSC70 con su propio control de carga, todos en un gel de 12.5% de acrilamida.

#### 4.1.2 Proliferación celular de mESC WT y KO de JMJD1B.



El segundo paso para caracterizar el knockout de JMJD1B fue evaluar cómo crecen las células respecto a sus pares. Para ello, se utilizó el kit cck8 (Sigma Aldrich) el cual permite realizar ensayos utilizando una sal monosódica (WST-8 o 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que las células, mediante la acción de deshidrogenasas reducen a formazán, un tinte amarillo soluble en agua. La cantidad producida de este tinte es directamente proporcional al número de células viables. Así, este kit facilita ensayos colorimétricos capaces de determinar el número de células viables con poca citotoxicidad (82). Gracias a la absorbancia dada por el formazán producido por las células viables se obtuvo la **Figura 10**, donde se puede observar gráficamente el crecimiento de las diferentes líneas celulares en los distintos días medidos. El tratamiento con cck8 mostró un mayor crecimiento de mESC KO de JMJD1B respecto a sus pares WT, dado que se puede ver como la línea verde representando el knockout siempre se encuentra por sobre la línea naranja de las wild type. Por otro lado, el número de células con que comienza la medición (5.000 o 1.000) muestra diferencias a largo plazo en el patrón de crecimiento, siendo 1.000 células un número prudente dado que da cuenta de un crecimiento exponencial del cultivo. Mientras que, al comenzar con 5.000 células se alcanza un estado de saturación al llegar al cuarto día en células KO de JMJD1B, mientras que las WT aún se encuentran dividiendo exponencialmente. Por lo tanto, podemos concluir que las células JMJD1B KO mESC crecen más rápido que las WT.

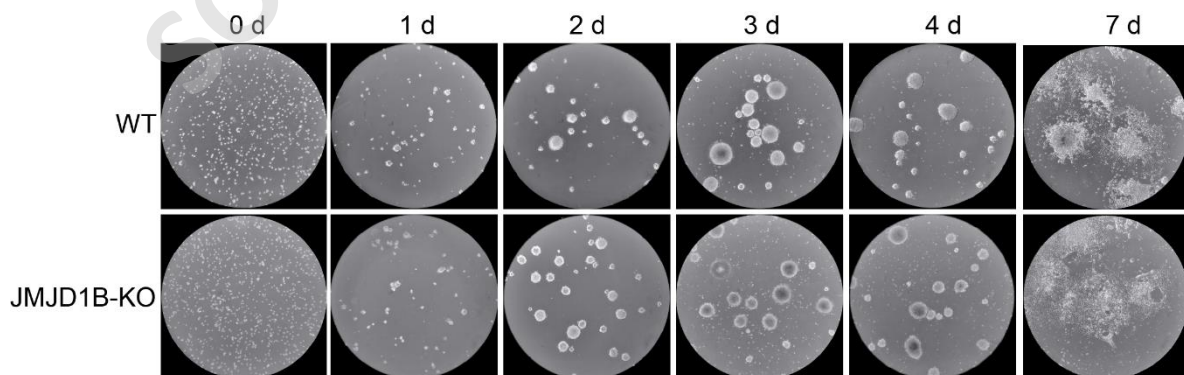


**Figura 10: Ensayo de proliferación celular.** Se observa la tasa de crecimiento de las células según la absorbancia dada por la actividad metabólica de las células viables (eje Y) versus los días en horas en los que fue medida (eje X). En naranja tenemos las células mESC wild type (WT) y en verde las mESC knockout de JMJD1B. El número de células sobre cada gráfico corresponde al que se utilizó al comienzo de la siembra.

#### 4.1.3 Diferenciación celular de mESC WT y KO de JMJD1B.

La interleucina LIF se utiliza normalmente tanto para apoyar el cultivo como para el mantenimiento de células madre pluripotentes de ratón, mediante la supresión de la diferenciación espontánea (83). Por lo tanto, el medio de cultivo utilizado debe carecer de LIF, dado que este factor inhibe su diferenciación (84). En su ausencia, las células son capaces de formar agregados celulares tridimensionales conocidos como cuerpos embrionarios (EB), los que son el primer paso para su diferenciación (85). Estos EBs desarrollan 6-8 días más tarde, cavidades que se llenarán de líquido y pasarán a llamarse EBs quísticos, los que aún en cultivo y expuestos a determinados estímulos pueden diferenciarse hacia un linaje específico (85–88).

Al respecto, las 2 líneas celulares mESC sembradas en placas p100 fueron cultivadas con un medio sin el factor LIF y sembradas en placas de bacterias sin gelatina de manera de favorecer la agregación de las células para comenzar el proceso de diferenciación. Se fotografió este proceso con un aumento 20X por una semana desde el día en que se sembraron (día 0) (**Figura 11**), lo que permitió observar la formación desde cero de los cuerpos embrionarios. Desde el día 1 se puede observar el agrupamiento tridimensional de las células, el cual ya al día 2 presenta una clara formación de cuerpos embrionarios. Con el pasar de los días van aumentando su tamaño y llenándose de líquido. En general, no se ven diferencias ni en la formación de EBs ni en la sobrevivencia de los mismos entre líneas celulares WT y KO de JMJD1B.



**Figura 11: Ensayo de diferenciación celular.** Se observan las células mESC WT y KO de JMJD1B desde el momento en que se sembraron (día 0) hasta el 7mo día cultivadas en un medio de cultivo sin LIF y sin adhesión celular. Se ve que desde el día 2 existe la presencia de cuerpos embrionarios (EBs).

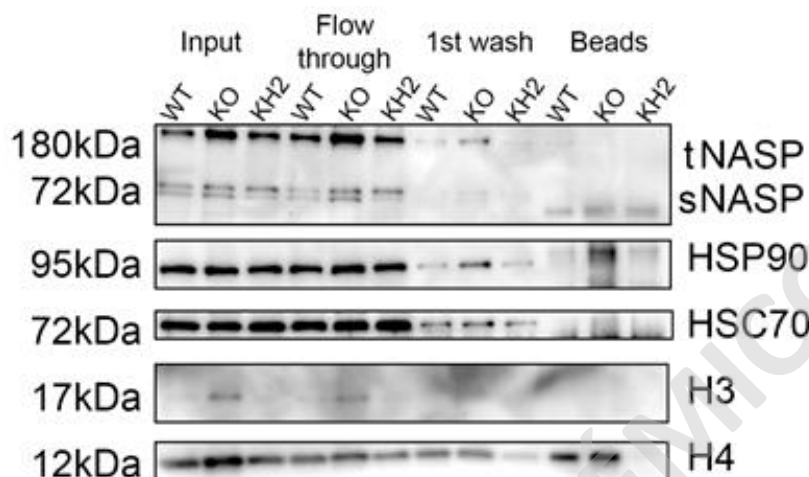
En síntesis, si se consideran las **Figuras 9, 10 y 11** se puede concluir que la deficiencia de JMJD1B tiene un impacto no sólo en los niveles proteicos de las histonas H3 y H4 y en s y tNASP, sino que también altera la proliferación celular de células indiferenciadas, pero no así la formación de cuerpos embrionarios al momento de diferenciar las células.

## **4.2 Interactómica de la histona H3 citosólica.**

### **4.2.1 Coimmunoprecipitación (CoIP) de la histona H3 citosólica.**

Los extractos citosólicos descritos y validados en el punto **4.1.1 (Figura 9)**, fueron utilizados para la realización de una CoIP con anticuerpos contra el péptido Flag, que igualmente fue validada vía western blot (**Figura 12**). En él se analizaron las histonas H3 y H4, y algunas proteínas que participan de su cascada de maduración. El Input corresponde a los extractos citosólicos, por lo que se ven todas las proteínas evaluadas. Como se espera, la chaperona tNASP y las histonas H3 y H4 tienen una mayor presencia en el extracto citosólico y *flow-through* de mESC KO de JMJD1B, comparado con los otros extractos. En el flow through se espera ver todo aquello que no se unió a las beads. Sin embargo, también observamos la presencia de las histonas H3 y H4, lo que podría deberse a dos cosas: (1) indica que no se ha unido todo el blanco de interés a las beads y/o (2) que las histonas observadas pertenecen a aquellos complejos formados por histonas H3 que no presentan la fusión con el epítipo FLAG. Hay que recordar que solo una fracción de H3 está fusionada con FLAG, por lo que no inmunoprecipitan. Por otro lado, del primer lavado se esperan observar las mismas proteínas del flow through, pero más diluidas. Se presenta algo de NASP en mESC WT y definitivamente en mESC KO de JMJD1B, lo mismo ocurre con HSP90 y HSC70 en los tres casos. La histona H3 no se observa, pero H4 tiene más presencia al menos en mESC WT y KO. No obstante, cabe destacar que mESC KH2 al carecer de la fusión de FLAG con H3 no debiese mostrar ninguna señal de proteínas más allá de posibles uniones inespecíficas. Respecto a las beads, se esperarían observar todas las proteínas que interactúan con la histona H3 fusionada con Flag. Se observa la histona H4, solamente en los extractos derivados de mESC WT y KO de JMJD1B, con mayor intensidad en este último. En el caso de NASP, se observa una tenue banda correspondiente a tNASP en WT y KO, pero no en KH2. Por su parte, HSP90 y HSC70 se observan tenues bandas solamente en KO. Con respecto a H3, su ausencia en las beads es de esperar, dado que H3 soluble no interactúa consigo misma en el extracto

citoplasmático, sino que se encuentra como dímero H3-H4 (22). Por lo tanto, la presencia de la histona H4 en las muestras WT y KO de JMJD1B y su ausencia en KH2, confirman la validez de la inmunoprecipitación de Flag-H3.

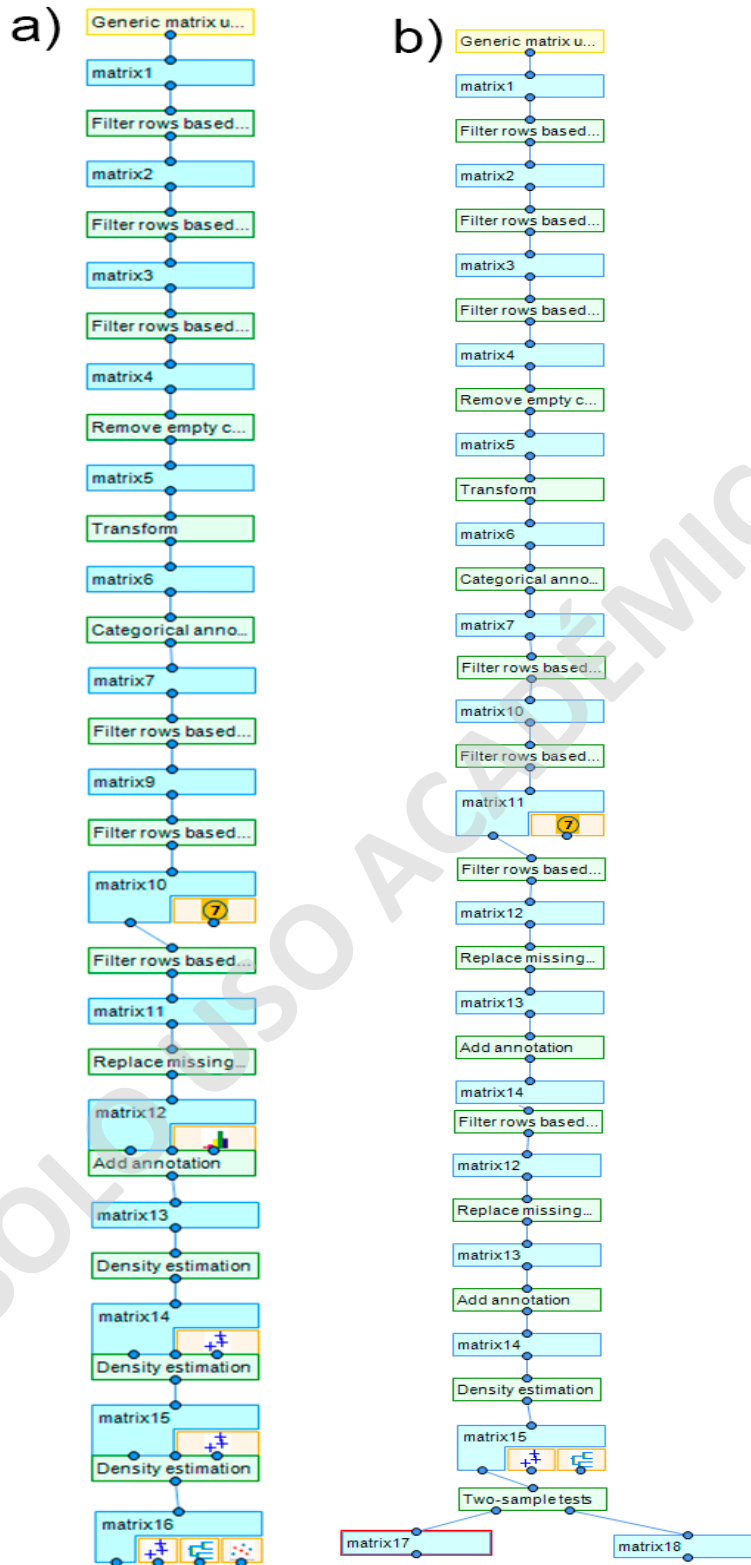


**Figura 12: Western blot de la CoIP sin elución.** Se muestran las proteínas de interés en 5  $\mu$ l de input, flow through, 1er lavado y beads en un gel de 12,5% de acrilamida. El Input corresponde a extractos citoplasmáticos de mESC WT, KO de JMJD1B y KH2, el flow through al sobrenadante de la incubación por 4 horas de los extractos con las Flag-beads, el 1st lavado (wash) y las beads de agarosa son las muestras finales de la CoIP.

#### 4.2.2 Espectrometría de masas e interactómica de la histona H3 citoplasmática.

Las muestras obtenidas en la CoIP se enviaron a secuenciación al laboratorio del Dr Axel Imhof en Alemania (Ludwig-Maximilians-University of Munich, LMU). La información obtenida del espectrómetro de masas se analizó en el programa Perseus tal como se describe en el diagrama de flujo de la **Figura 13**. Al respecto, se obtuvo un análisis del componente principal (**Figura 14**), histogramas de las muestras (**Figura 15**), un diagrama de Venn (**Tabla 4**) y un scatter plot (**Figura 16**), a partir del cual se realizaron heatmaps de enriquecimiento para mESC WT y mESC KO de JMJD1B (**Figuras 17 y 18**).

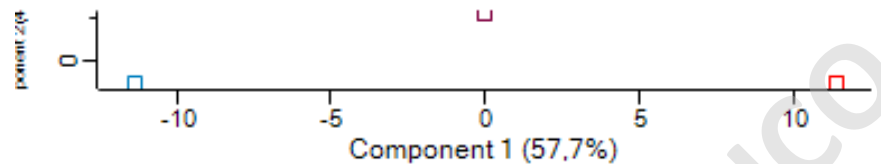
La **Figura 13** muestra los flujos de trabajo seguidos en el programa Perseus que permitieron la obtención de las **Figuras 14-18** y la **Tabla 4**. La parte **a** y **b** de dicha figura se diferencian en que en una **(a)** se usaron las tres líneas celulares para obtener un análisis del componente principal (PCA por sus siglas en inglés). Mientras que en la otra **(b)** sólo se usó la información de las células contenedoras de la fusión H3-FLAG (mESCWT y KO), para la obtención del diagrama de Venn, el scatter plot y los heatmaps, respectivamente.



**Figura 13: Diagrama de flujo del análisis en Perseus.** Se muestran los flujos de trabajo en Perseus. **(a)** Con las 3 líneas celulares, obteniendo el análisis del componente principal, los histogramas y el diagrama de Venn. **(b)**

Con las células mESC WT y KO de JMJD1B, el scatter plot y los heatmaps. En los cuadros naranjos se ven los análisis realizados en cada workflow.

El análisis del componente principal (PCA) realizado confirmó que las muestras son diferentes entre sí, agrupándose cada una independientemente de la otra. Lo que sugiere una variabilidad entre los proteomas analizados (**Figura 14**).

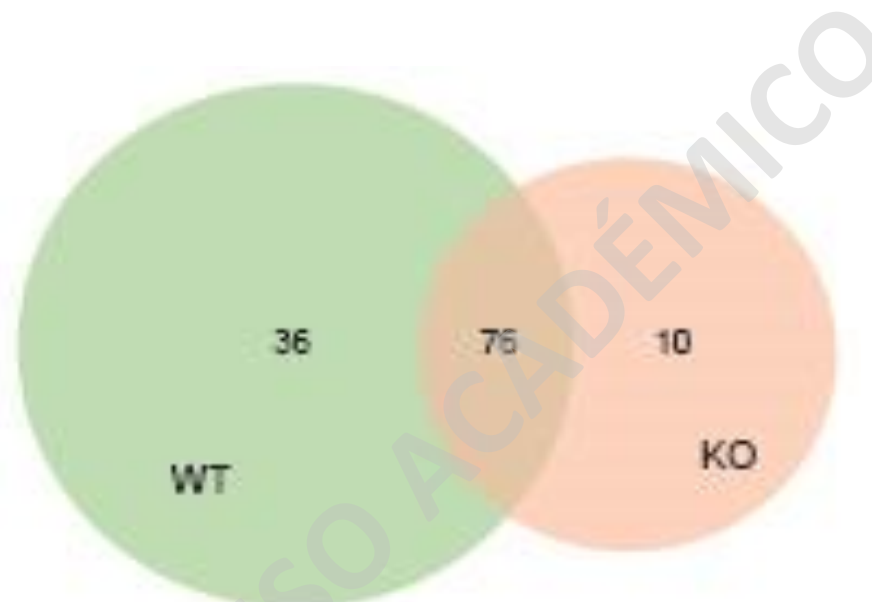


**Figura 14:** PCA generado en Perseus con las muestras de los extractos mESC KH2, WT y KO de JMJD1B. El cuadrado azul corresponde a KH2, el morado a WT y el rojo a KO de JMJD1B. Se ve una clara segmentación de las líneas celulares en cuestión.

En la **Figura 15** se muestran las interacciones entre los universos de proteínas que componen las distintas líneas celulares. Donde las células WT contienen 112 elementos y las KO de JMJD1B 86. Al respecto, entre ambas líneas celulares se comparte la interacción con 76 proteínas (**Figura 16**). Por otro lado, tanto WT como KO presentan interacciones exclusivas respecto la una de la otra, siendo 36 y 10 proteínas respectivamente. Las proteínas exclusivas de mESC WT son una subunidad de complejos acetiltransferasa (Naa15); una subunidad de la RNA polimerasa II (Polr2a) (89); 12 proteínas asociadas a traducción (Rps25, Rps2, Rps27l, Rps16, Rps23, Rps13, Rps4x, Rpl23a, Rps26, Rps3, Rpl24 y Rps19); dos proteínas de unión a ácido nucleico monocatenario (Pcbp2 y Pcbp3) (90); dos enzimas del ciclo de la urea (Upp2 y Arg1) (91,92); una proteína que participa en la biogénesis de la subunidad 60S del ribosoma (Las1l) (93); dos enolasas de la glicólisis (Eno1 y Eno2); factores de la iniciación de la traducción (Eif4b, Eif4g1, Eif3g y Eif3c) (94,95); una proteína de unión a actina (Flna) (96); tres subunidades del proteosoma (Pasma6, Pasma3 y Pasma5) (97); Valina--tRNA ligasa (Vars) (98); subunidad del factor de empalme 3B (Sf3b1) (99); la isocitrato deshidrogenasa (Idh1); una subunidad del complemento (C1qb) (100); dos proteasas (Psmc5 y Psmc6) ; actinas (Acta1, Actc1, Actg2 y Acta2); ATPasa del retículo endoplásmico de transición (Vcp) (101) y un coactivador y represor de la transcripción regulado por receptores hormonales (Pelp1) (102).

Por su parte, aquellas exclusivas de mESC KO son una proteína ribosomal (Rpl10a); una chaperona nuclear requerida para la maduración y exportación nuclear de subunidades de ribosomas

anteriores a 60S (Mdn1) (103); una enzima de la vía de las pirimidinas (Cad) (104); subunidad de un complejo que reorganiza nucleosomas (Supt16 y Supt16h) (105); una subunidad del proteosoma (Psm3); dos inhibidoras de proteasas (Mug1 y Mug2) (106); un iniciador de la traducción (Eif3e) (107); una proteína que participa en la traducción (Rpl8); un componente de una chaperona que participa en el plegamiento de proteínas (Cct2) (108) y la cadena beta de fibrinógeno (Fgb) (109). El hecho de que esta línea celular tenga interacción con menos proteínas da cuenta de que al no haber JMJD1B se pierde la interacción con dichas proteínas, por lo que su función se ve alterada.

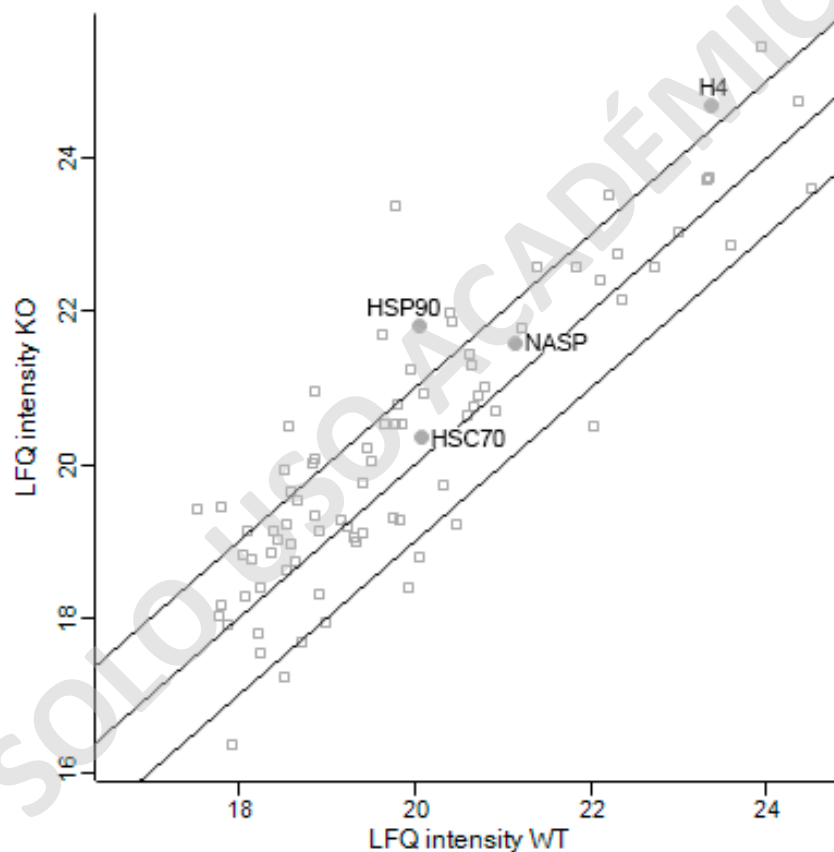


**Figura 15: Diagrama de Venn con mESC WT y KO de JMJD1B.** Se muestra el número de proteínas presente en los universos de mESC WT y KO de JMJD1B. Las células WT se encuentran en el círculo verde y las KO de JMJD1B en el naranja.

Al respecto, las proteínas exclusivas de las células WT fueron principalmente asociadas a la traducción, donde 24 de 36 de ellas tienen lugar de una u otra manera en dicho proceso. Por su parte, el KO de JMJD1B presentó chaperonas y proteínas que participan en la traducción, pero no al nivel de sus pares WT. Las cuales además triplicaron la cantidad de subunidades del proteosoma de aquellas carentes de JMJD1B.

De igual forma, el diagrama de dispersión múltiple de la **Figura 16** permite visualizar el grado de correlación existente entre los extractos de mESC WT y KO de JMJD1B. Siendo los ejes X e Y las intensidades LFC, las que se obtienen al promediar la intensidad de todos los péptidos de una proteína y luego dividiéndolo por el número total de dicha proteína, los que además se normalizan

para excluir valores atípicos (110,111). Adicionalmente, para conocer las proteínas que presentaban enriquecimiento en cada línea celular con respecto a la otra, se trazaron distintas líneas que corresponden a X como simetral que inicia en (0,0) y  $X+/-1$ . Estos últimos cortes corresponden a los intervalos de confianza que se tomaron de manera arbitraria para conocer las proteínas en que se enriquecían las distintas líneas celulares. Destacadas en forma de círculo se encuentran la histona H4, y las chaperonas NASP, HSC70 y HSP90. Las proteínas HSP90 y H4 se encontraron enriquecidas en el KO de JMJD1B, con respecto al WT, consistente con nuestros resultados de western blot (**Figura 9**) y análisis en células HeLa (55). Por otra parte, NASP y HSC70 se encontraron ligeramente enriquecidas en el KO de JMJD1B, con respecto al WT.



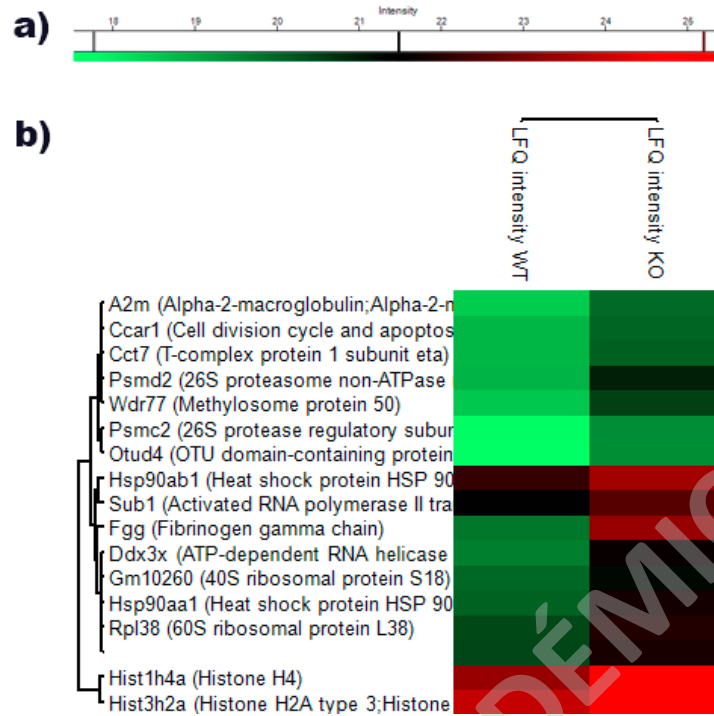
**Figura 16: Scatter plot de las proteínas asociadas a Flag-H3 derivadas de extractos citosólicos de células mESC KO y WT.** En el eje X se muestra la intensidad libre de marca (LfQ) del WT y en el eje Y la intensidad LfQ del KO de JMJD1B, que corresponden al promedio de intensidades de los péptidos de una proteína dividido por el universo de dicha proteína, normalizado (110,111). Las líneas presentes dadas arbitrariamente por  $X-1$ ,  $X=0$  y  $X+1$  permiten distinguir entre proteínas típicas y atípicas. Adicionalmente, las proteínas HSP90, H4, HSC70 y NASP destacadas forman parte de la cascada de maduración de la histona H3.



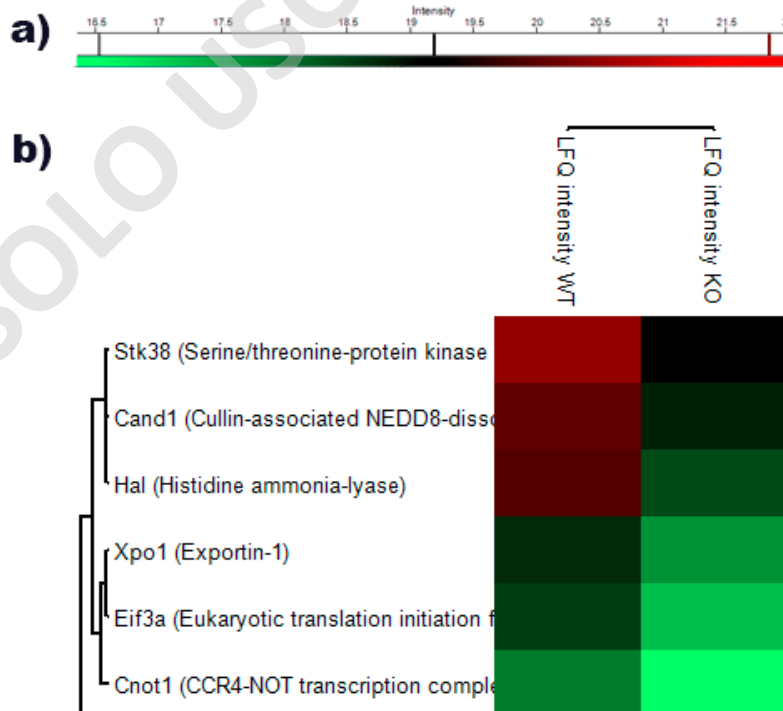
Los mapas de calor observados en las **Figuras 17-18**, muestran la distribución diferencial de las proteínas identificadas mediante el análisis libre de marca de las células mESC WT y KO de JMJD1B (**Figura 16**). Se comienza en color verde con una intensidad de LFQ más baja, pasando por el color negro con una LFQ promedio hasta llegar al color rojo con una mayor intensidad de LFQ.

Al respecto, la **Figura 17** da cuenta del enriquecimiento de las células mESC KO de JMJD1B respecto a las WT con el corte X-1. Donde se encontró una deubiquitinasa capaz de regular negativamente la señalización inflamatoria y de reconocimiento de patógenos en la inmunidad innata (Otud4) (112); una proteína ribosomal (Gm10260 o Rps18) (113); C3 quien cumple un papel central en la activación del sistema del complemento (C3) (114); Coactivador transcripcional de ARN polimerasa II (Sub1) (115); una helicasa dependiente de RNA (Ddx3x) (116); una subunidad del proteosoma (Psmc2) (117); componente de una chaperona que participa en el plegamiento de proteínas (Cct7) (118); cadena gamma de fibrinógeno que forma parte de la fibrina (Fgg), clave para la coagulación (119); un inhibidor de proteinasas (A2m) (120); proteína que regula división celular y apoptosis (Ccar1) (121); una subunidad de degradación del proteosoma (Psm2) (122); un componente no catalítico del complejo metilosomal de arginina (Wdr77) (123); la histona H2A (Hist3h2a); la histona H4 (Hist1h4a) y la proteína de shock térmico HSP90 (HSP90aa1 y HSP90ab1). Estas últimas dos forman parte de la cascada de maduración de la histona H3.

Por su parte, en la **Figura 18**, se observa el enriquecimiento de las las células mESC WT respecto a las KO de JMJD1B con el corte X+1. Donde se encontró la subunidad 1 del complejo de transcripción CCR4-NOT (Cnot1) (124); una subunidad de un factor de iniciación de la traducción (Eif3a) (125); una enzima que participa en la degradación de aminoácidos (Hal) (126); exportina 1 (Xpo1) (127); proteína asociada a culina (Cand1) (128) y la serina/treonina-proteína quinasa 38 (Stk38) (129).



**Figura 17: Heatmap de enriquecimiento de mESC KO de JMJD1B con X-1. (a)** La mayor cantidad de péptidos se indica en color rojo, mientras que las más bajas en color verde. Ambas, respecto al valor medio en negro. **(b)** Mapa de calor representando el enriquecimiento de las 16 proteínas presentado por las células mESC KO de JMJD1B respecto a su par mESC WT, luego de un análisis de proteómica libre de marca.



**Figura 18: Heatmap de enriquecimiento de mESC WT con X+1. (a)** La mayor cantidad de péptidos se indica en color rojo, mientras que las más bajas en color verde. Ambas, respecto al valor medio en negro. **(b)** Mapa de calor representando el enriquecimiento de las 6 proteínas presentado por las células mESC WT respecto a su par mESC KO de JMJD1B, luego de un análisis de proteómica libre de marca.

Cabe destacar que entre las proteínas enriquecidas de las células mESC KO de JMJD1B se encontraron dos relacionadas con la respuesta inmune, dos asociadas a transcripción, dos chaperonas y dos histonas. Mientras que las WT presentaron una de transcripción, una de traducción, una enzima que degrada aminoácidos y dos asociadas a señalización. En síntesis, aquellas proteínas enriquecidas en el KO de JMJD1B correspondieron en su mayoría a chaperonas y/o reguladoras de algún proceso particular y en WT se asocian a dos de los tres grandes procesos del dogma central de la biología molecular.

#### **4.2.2.1 PANTHER y la ontología genética (GO).**

Un análisis de ontología genética (GO) es una representación formal del conocimiento en que los conceptos se describen por su significado y las relaciones existentes entre los mismos, los que se relacionan de manera jerárquica desde términos más generales hacia más específicos (padres e hijos). Existen 3 grandes categorías de clasificación: proceso biológico, función molecular y componente celular (130), las que entregan información y permiten diferenciar los distintos términos.

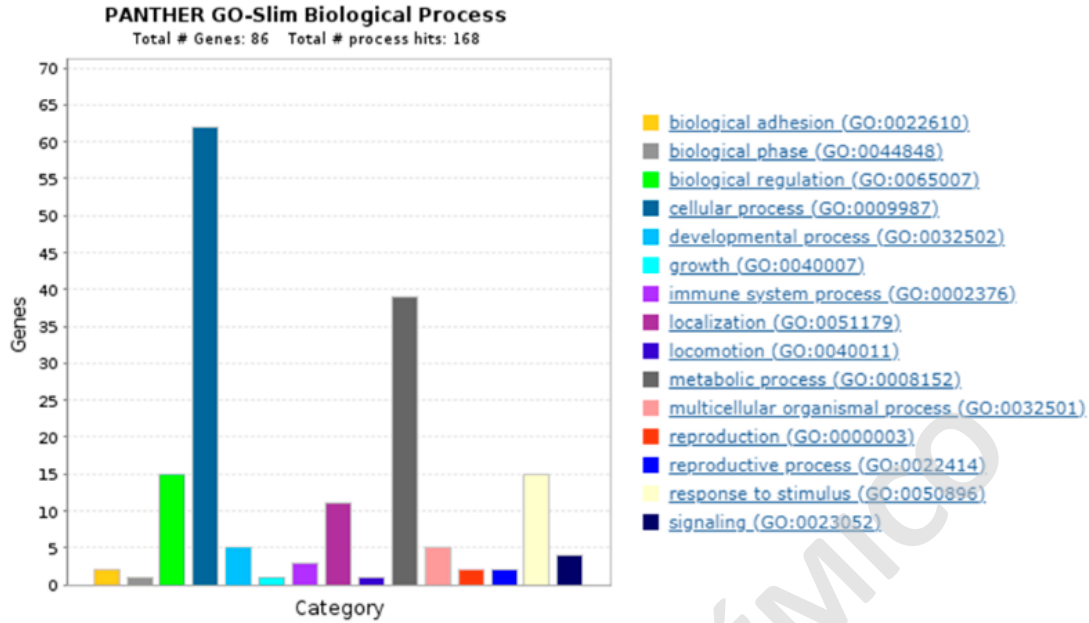
Al respecto, con el listado de genes presentes en cada línea celular se realizó un análisis de ontología genética, mediante el sistema de clasificación PANTHER quien permite un análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas (131). Donde se analizó la interactómica de ambas líneas celulares, es decir, todas las proteínas con las que interactuó la histona H3 sin importar si eran o no exclusivas de la línea celular en cuestión (86 y 112 para KO de JMJD1B y WT, respectivamente) (**Figuras 19-26**).

La **Figura 19** muestra la ontología de proceso biológico de las células KO de JMJD1B, donde se encontraron 2 genes de adhesión biológica (Fgb y Pkp1), uno de fase biológica (Cdk1), 15 de regulación biológica (Npm1, Sfn, Stk38, Jup, Ccar1, Hsp90aa1, Pcbp1, Prdx1, Fgb, Otud4, Supt16, Cnot1, Hsp90ab1, Cdk1 y C4b), 62 de proceso celular (Eif3b, Npm1, Sfn, Stk38, Jup, Hsp90b1, Mcm5, Cct7, Ccar1, Cct2, Hsp90aa1, Psmc3, Mdn1, Cct3, Xpo1, Pcbp1, Pkm, Cand1, Cat, Rpl8, Eif3a, Prdx1, Cse1l, Cat, Kpnb1, Tgm1, Fgb, Msh6, Tmod3, Ddx3x, Pkp1, Psmc1, Otud4, Rplp0, Vim, Psmc2, Cct8,

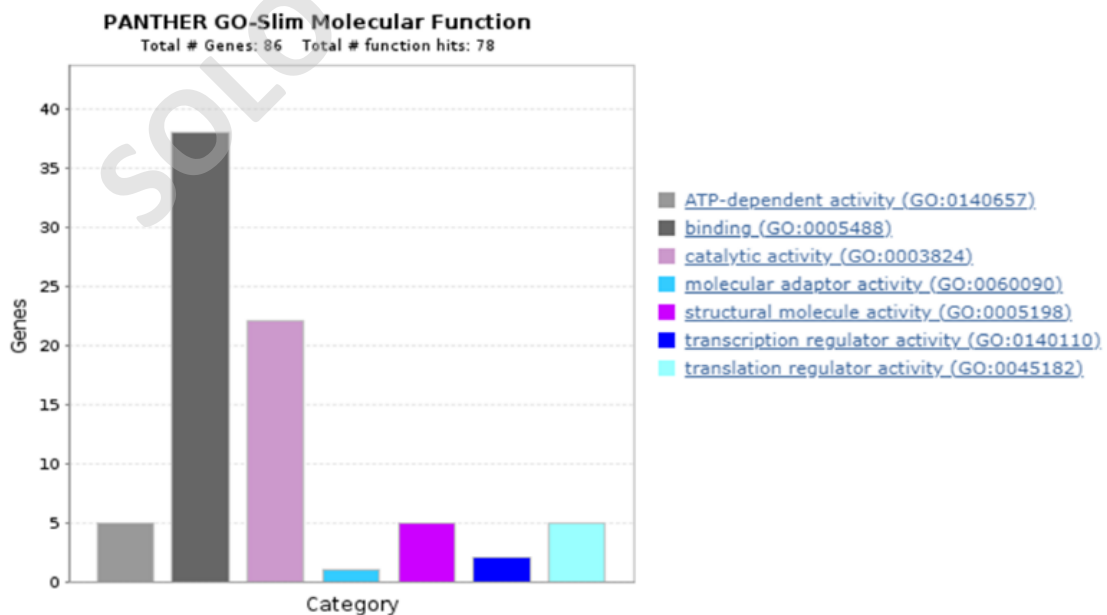
Tcp1, Cad, Tyms, Supt16, Cltc, Eef1a1, Cnot1, Eef2, Eif4a1, Eif3e, Nasp, Psm2, Aldoa, Ube2n, Cct6a, Wdr77, Hspa8, Eif3l, Hsp90ab1, Actg1, Cct4, Cdk1, Tcp1, Ipo5 y Cad), 5 de proceso de desarrollo (Fgb, Tmod3, Ddx3x, Wdr77 y Actg1), uno de crecimiento (Fgb), 3 de proceso de sistema inmune (Prdx1, Otud4 y C4b), 11 de localización (Npm1, Alb, Sfn, Xpo1, Cse1l, Kpnb1, Cltc, Nasp, Hspa8, Ipo5 y Actg), uno de locomoción (Actg1), 39 de proceso metabólico (Eif3b, Npm1, Stk38, Jup, Mcm5, Ccar1, Psm2, Mdn1, Pcbp1, Pkm, Cand1, Cat, Rpl18, Eif3a, Prdx1, Tgm1, Fgb, Msh6, Psmc1, Otud4, Rplp0, Psmc2, Cad, Plg, Tyms, Supt16, Eef1a1, Cnot1, Eef2, Eif4a1, Eif3e, Psm2, Aldoa, Ube2n, Eif3l, Cdk1, C4b y Cad), 5 de proceso de organismo multicelular (Fgb, Tmod3, Ddx3x, Wdr77 y Actg1), 2 de reproducción (Ddx3x y Wdr77), 2 de proceso reproductivo (Ddx3x y Wdr77), 15 de respuesta a estímulos (Sfn, Stk38, Mcm5, Hsp90aa1, Pkm, Prdx1, Cat, Fgb, Msh6, Otud4, Ube2n, Hspa8, Hsp90ab1, Cdk1 y C4b) y 4 de señalización (Sfn, Stk38, Otud4 y Cdk1).

En cambio, la **Figura 20** muestra la ontología de función molecular de las células KO de JMJD1B, donde se encontraron 5 genes de actividad dependiente de ATP (Mcm5, Ddx3x, Psmc1, Psmc2 y Hspa8), 38 de unión (Eif3b, Npm1, Sfn, Jup, Hsp90ab1, Mcm5, Cct7, Cct2, Hsp90aa1, Cct3, Xpo1, Pcbp1, Rpl8, Eif3a, Cse1l, Cat, Kpnb1, Msh6, Ddx3x, Pkp1, Rplp0, Cct8, Plg, Supt16, Cltc, Eef1a1, Cnot1, Eef2, Eif4a1, Nasp, Cct6a, Hspa8, Hsp90ab1, Actg1, Cct4, Cdk1, Ipo5 y Tcp1), 21 de actividad catalítica (Stk38, Mcm5, Hal, Pkm, Cat, Prdx1, Tgm1, Ddx3x, Psmc1, Otud4, Psmc2, Tcp1, Plg, Tyms, Eef1a1, Eef2, Aldoa, Ube2n, Hspa8, Cdk1 y Cad), uno de actividad del adaptador molecular (Cnot1), 5 de actividad de molécula estructural (Rpl8, Fgb, Rps11, Rplp0 y Vim), 2 de actividad reguladora de la transcripción (Jup y Ccar1) y 5 de actividad reguladora de la traducción (Eif3b, Eif3a, Eef1a1, Eef2 y Eif4a1).

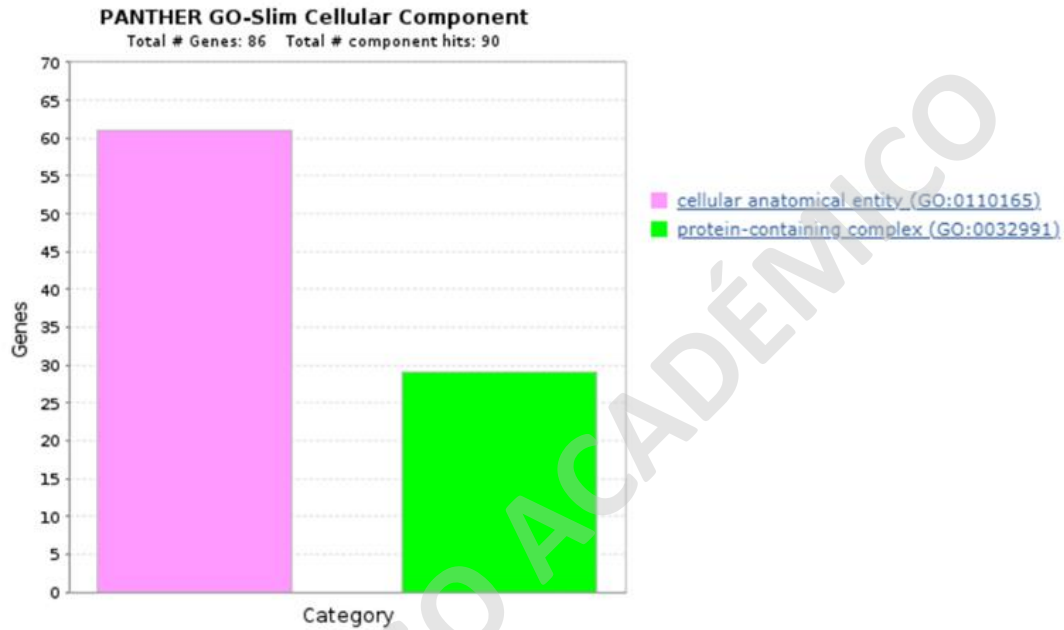
De manera similar, la **Figura 21** muestra la ontología de componente celular de las KO de JMJD1B, donde se encontraron 61 genes en entidad anatómica celular (Eif3b, Npm1, Alb, Sfn, Jup, Mcm5, Cct7, Ccar1, Cct2, Hsp90aa1, Psm2, Cct3, Xpo1, Pcbp1, Pkm, Cand1, Cat, Rpl8, Mug1, Eif3a, Prdx1, Cse1l, Kpnb1, Fgb, Msh6, Tmod3, Ddx3x, Pkp1, Psmc1, Rps11, Rplp0, Vim, Psmc2, Cct8, Tcp1, Cad, Plg, Tyms, Supt16, Cltc, Cnot1, Eef2, Eif4a1, Eif3e, Nasp, Psm2, Aldoa, Ube2n, Cct6a, Wdr77, Hspa8, Eif3l, Fgg, Hsp90ab1, Actg1, Cct4, Cdk1, Tcp1, Ipo5 y C4b) y 29 a un complejo contenedor de proteínas (Eif3b, Npm1, Jup, Mcm5, Cct7, Cct2, Psm2, Mdn1, Cct3, Rpl8, Eif3a, Msh6, Psmc1, Rps11, Rplp0, Psmc2, Cct8, Supt16, Cltc, Cnot1, Eef2, Eif3e, Psm2, Cct6a, Wdr77, Eif3l, Actg1, Cct4 y Tcp1).



**Figura 19: Gráfico de barras de proceso biológico de GO de genes KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología proceso biológico (eje X). De izquierda a derecha, en amarillo se encuentra la categoría adhesión biológica, en gris fase biológica, en verde regulación biológica, en azul petróleo proceso celular, en calipso proceso de desarrollo, en celeste crecimiento, en amatista procesos del sistema inmune, en morado localización, en azul locomoción, en marengo proceso metabólico, en coral proceso de organismo multicelular, en naranja reproducción, en azul eléctrico proceso reproductivo, en crema respuesta a estímulos y en azul oscuro señalización (132).



**Figura 20: Gráfico de barras de función molecular de GO de genes KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología función molecular (eje X). De izquierda a derecha, en gris se encuentra la categoría de actividad dependiente de ATP, en marengo unión, en lavanda actividad catalítica, en calipso actividad de adaptador molecular, en morado actividad de molécula estructural, el azul actividad reguladora de la transcripción y en celeste actividad reguladora de la traducción (132).



**Figura 21: Gráfico de barras de componente celular de GO de genes KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología componente celular (eje X). De izquierda a derecha, en rosado se encuentra la categoría entidad anatómica celular y en verde complejo contenedor de proteínas (132).

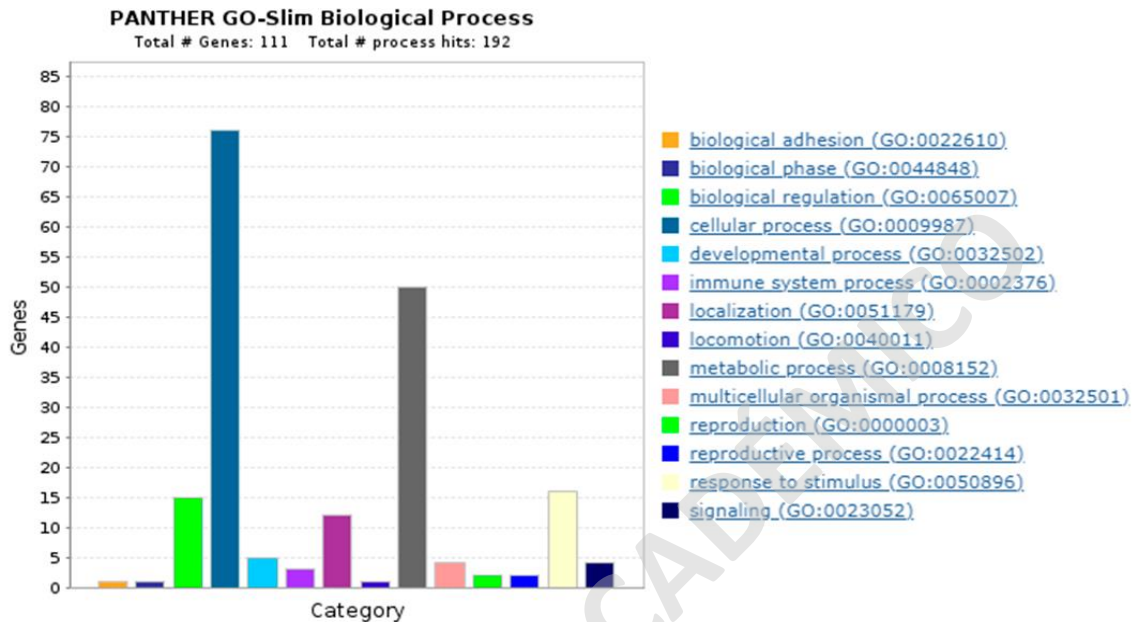
Por su parte, la **Figura 22** muestra la ontología de proceso biológico de las células WT, donde se encontró un gen de adhesión biológica (Pkp1), uno de fase biológica (Cdk1), 15 de regulación biológica (Npm1, Sfn, Stk38, Jup, Ccar1, Hsp90aa1, Pcbp1, Prdx1, Otud4, Pcbp2, Cnot1, Psmc6, Hsp90ab1, Cdk1 y C4b), 76 de proceso celular (Eif3b, Npm1, Pelp1, Sfn, Las1l, Stk38, Eif3c, Jup, Hsp90b1, Mcm5, Cct7, Ccar1, Rps19, Rpl23a, Hsp90aa1, Cct3, Rps16, Xpo1, Rps4x, Pcbp1, Pkm, Cand1, Cat, Eif3a, Sf3b1, Prdx1, Cse1l, Kpnb1, Tgm1, Msh6, Acta1, Tmod3, Ddx3x, Rps27l, Pkp1, Psmc1, Otud4, Rplp0, Vim, Psmc2, Cct8, Arg1, Tcp1, Pcbp2, Rps23, Vars, Tyms, Cltc, Eef1a1, Cnot1, Eef2, Rpl24, Eif41a, Nasp, Upp2, Psmd2, Naa15, Aldoa, Ube2n, Cct6a, Wdr77, Hspa8, Eif3l, Psmc6, Psmc5, Hsp90ab1, Actg1, Cct4, Cdk1, Vcp, Rps2, Tcp1, Ipo5 y Eno1), 5 de proceso de desarrollo (Acta1, Tmod3, Ddx3x, Wdr77 y Actg1), 3 de proceso de sistema inmune (Prdx1, Otud4 y C4b), 12

de localización (Npm1, Alb, Sfn, Xpo1, Cse1l, Kpnb1, Cltc, Nasp, Hspa8, Actg1, Ipo5 y Vcp), uno de locomoción (Actg1), 50 de proceso metabólico (Eif3b, Npm1, Pelp1, Las1l, Skt38, Eif3c, Jup, Mcm5, Ccar1, Rps16, Rps4x, Pcbp1, Pkm, Cand1, Cat, Eif3a, Sf3b1, Prdx1, Tgm1, Msh6, Psmc1, Otud4, Rplp0, Psmc2, Arg1, Pcbp2, Rps23, Vars, Tyms, Eef1a1, Cnot1, Eef2, Rpl24, Eif4a1, Upp2, Psmc2, Naa15, Aldoa, Ube2n, Eif3l, Psmc6, Psmc5, Cdk1, Vcp, Rps2 y Eno1), 4 de proceso de organismo multicelular (Tmod3, Ddx3x, Wdr77 y Actg1), 2 de reproducción (ddx3x y Wdr77), 2 de proceso reproductivo (ddx3x y Wdr77), 16 de respuesta a estímulos (Sfn, Stk38, Mcm5, Hsp90aa1, Pkm, Prdx1, Cat, Msh6, Otud4, Ube2n, Hspa8, Psmc6, Hsp90ab1, Cdk1, Vcp y C4b) y 4 de señalización (Sfn, Stk38, Otud4 y Cdk1).

De igual forma, la **Figura 23** muestra la ontología de función molecular de las células WT, donde se encontraron 8 genes con actividad dependiente de ATP (Mcm5, Ddx3x, Psmc1, Psmc2, Hspa8, Psmc6, Psmc5 y Vcp), 48 de unión (Eif3b, Npm1, Sfn, Eif3c, Jup, Hsp90b1, Mcm5, Cct7, Rps19, Hsp90aa1, Cct3, Rps16, Xpo1, Rps4x, Pcbp1, Eif3a, Sf3b1, Cse1l, Cat, Kpnb1, Msh6, Ddx3x, Rps27l, Pkp1, Rplp0, Cct8, Arg1, Pcbp2, Plg, Eif4g1, Cltc, Eef1a1, Cnot1, Eef2, Rpl24, Eif4a1, Nasp, Rps13, Cct6a, Hspa8, Rps26, Hsp90ab1, Cct4, Cdk1, Vcp, Ipo5 y Tcp1), 31 de actividad catalítica (Stk38, Mcm5, Polr2a, Hal, Pkm, Cat, Prdx1, Cat, Tgm1, Ddx3x, Psmc1, Otud4, Psmc2, Arg1, Tcp1, Plg, Vars, Tyms, Eef1a1, Eef2, Upp2, Naa15, Aldoa, Ube2n, Hspa8, Psmc6, Psmc6, Cdk1, Vcp y Eno1), uno de actividad del adaptador molecular (Cnot1), 15 de actividad de molécula estructural (Rps19, Rpl23a, Rps16, Rps4x, Rps27l, Rps11, Rplp0, Vim, Rps23, Rps3, Rpl24, Rps13, Rps26, Rps2 y Rps25), 2 de regulación de la transcripción (Jup y Ccar1) y 7 de regulación de la traducción (Eif3b, Eif3c, Eif3a, Eif4g1, Eef1a1, Eef2 y Eif4a1).

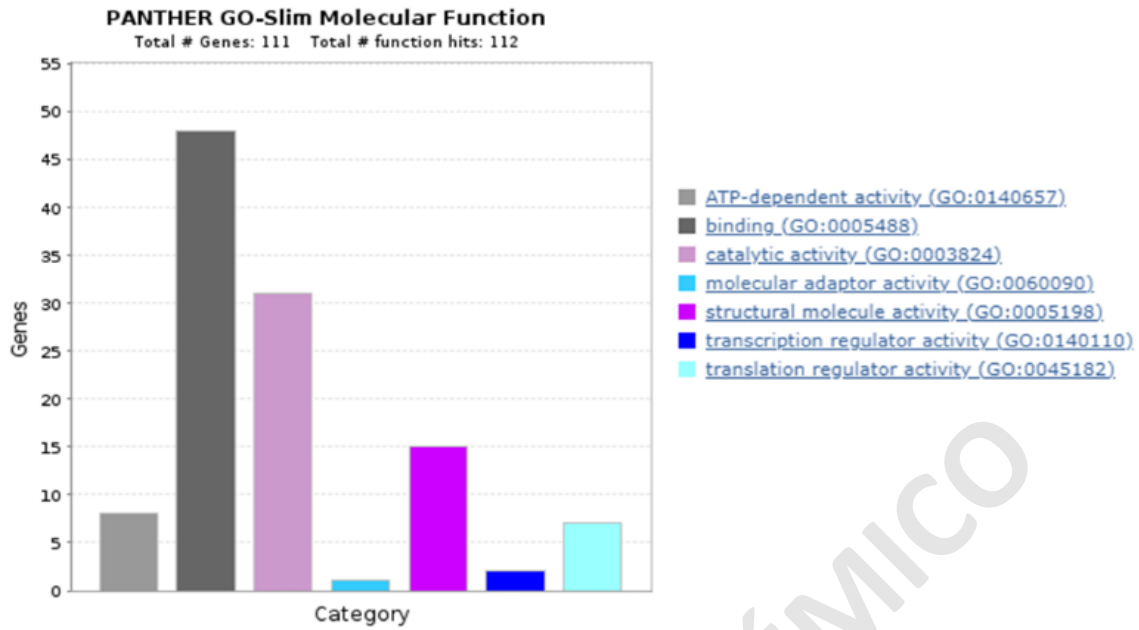
Asimismo, la **Figura 24** muestra la ontología de componente celular de las células WT, donde se encontraron 84 genes de entidad anatómica celular (Eif3b, Npm1, Pelp1, Alb, Sfn, Psma6, Eif3c, Jup, Mcm5, Cct7, Ccar1, Rps19, Polr2a, Rpl23a, Hsp90aa1, Cct3, Rps16, Xpo1, Rps4x, Pcbp1, Pkm, Cand1, Cat, Eif3a, Sf3b1, Prdx1, Cse1l, Kpnb1, Msh6, Acta1, Tmod3, Ddx3x, Rps27l, Pkp1, Psmc1, Rps11, Rplp0, Vim, Psmc2, Cct8, Arg1, Tcp1, Pcbp2, Plg, Eif4g1, Rps23, Vars, Tyms, Cltc, Cnot1, Eef2, Rps3, Rpl24, Eif4a1, Nasp, Upp2, Psmc2, Naa15, Aldoa, Rps13, Psma5, Ube2n, Cct6a, Wdr77, Hspa8, Psma3, Eif3l, Psmc6, Rps26, Fgg, Psmc5, Hsp90ab1, Actg1, Cct4, Cdk1, Vcp, Rps2, Tcp1, C4b, Eno1, Ipo5 y Rps25) y 48 a un complejo contenedor de proteínas (Eif3b, Npm1, Psma6, Las1l, Eif3c, Jup, Mcm5, Cct7, Rps19, Polr2a, Rpl23a, Cct3, Rps16, Rps4x, Eif3a, Sf3b1, Msh6, Rps27l, Psmc1, Rps11,

Rplp0, Psmc2, Cct8, Eif4g1, Rps23, Cltc, Cnot1, Eef2, Rps3, Rpl24, Psmd2, Naa15, Rps13, Psma5, Cct6a, Wdr77, Psma3, Eif3l, Psmc6, Rps26, Psmc5, Actg1, Cct4, Vcp, Rps2, Tcp1, Eno1 y Rps25).

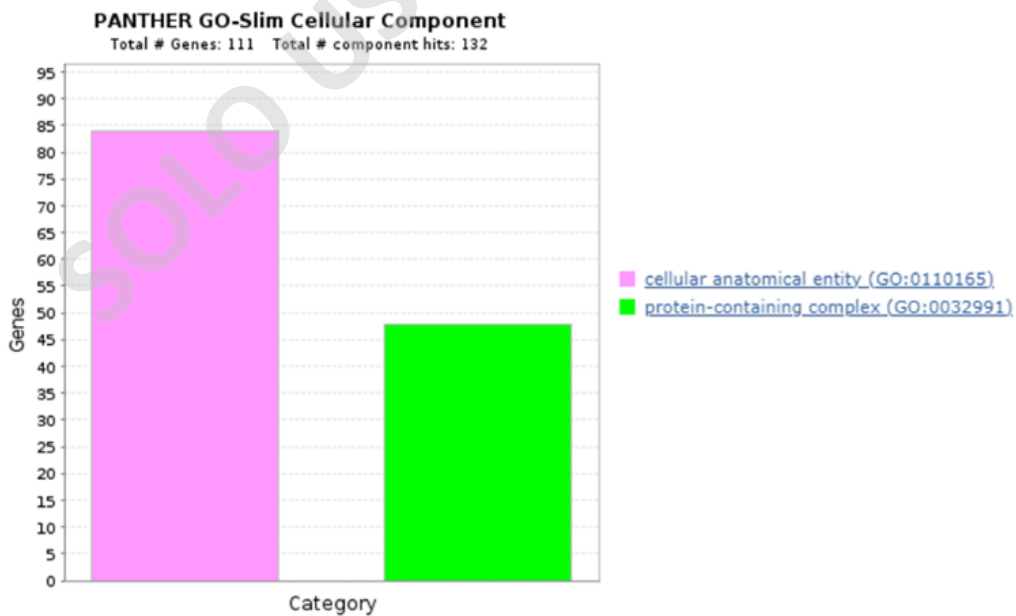


**Figura 22: Gráfico de barras de proceso biológico de GO en genes WT.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en naranja se encuentra la categoría adhesión biológica, en azul fase biológica, en verde regulación biológica, en azul petróleo proceso celular, en celeste proceso de desarrollo, en amatista procesos del sistema inmune, en morado localización, en azul locomoción, en marengo proceso metabólico, en coral proceso de organismo multicelular, en sandía reproducción, en azul eléctrico proceso reproductivo, en crema respuesta a estímulos y en azul oscuro señalización (132).





**Figura 23: Gráfico de barras de función molecular de GO en genes WT.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en gris se encuentra la categoría actividad dependiente de ATP, en marengo unión, en lavanda actividad catalítica, en calipso actividad del adaptador molecular, en morado actividad de molécula estructural, en azul regulador de la actividad de la transcripción y en celeste regulador de la actividad de la traducción (132).

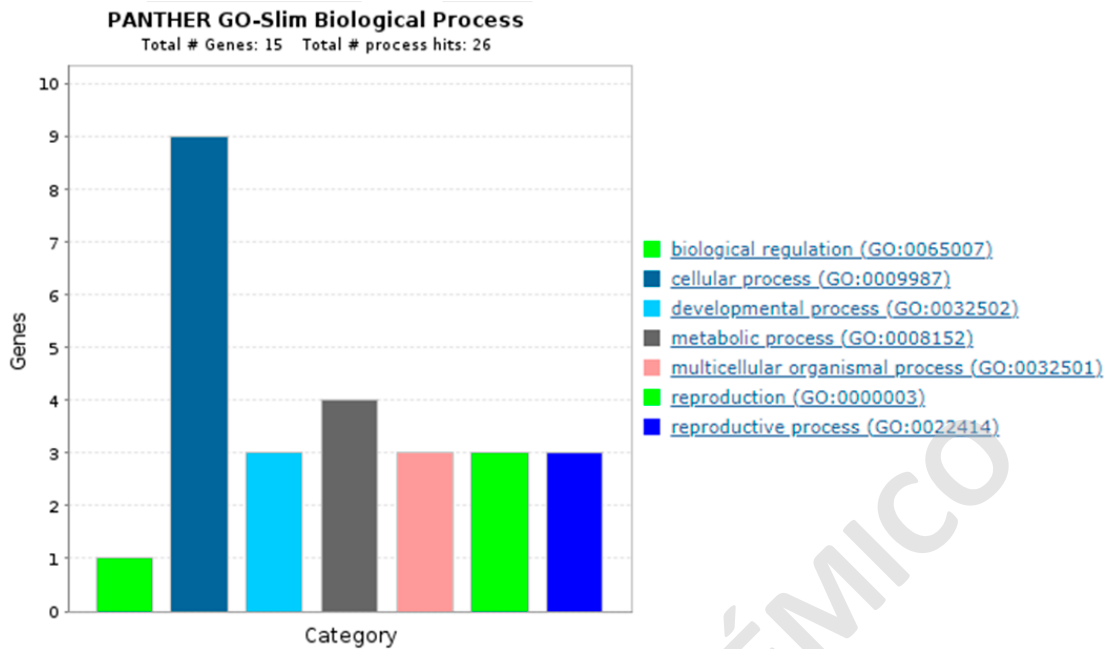


**Figura 24: Gráfico de barras de componente celular de GO en genes WT.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en rosado se encuentra la categoría entidad anatómica celular y en verde complejo contenedor de proteínas (132).

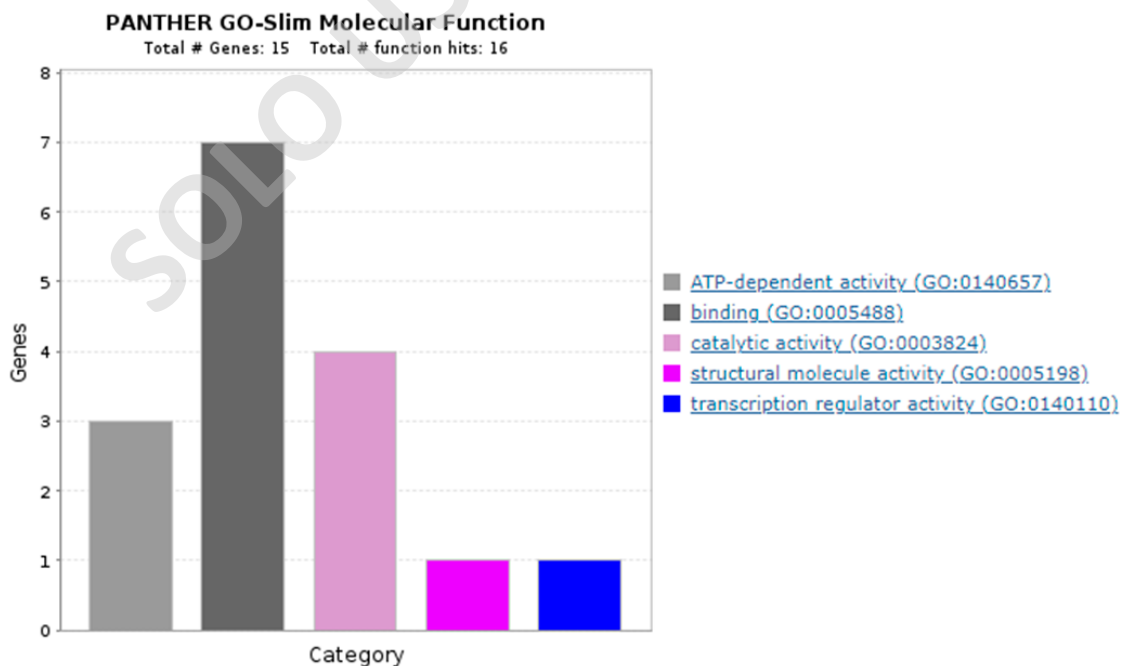
En relación a estas clasificaciones, en los tres casos de ontología las distribuciones de ambas líneas celulares fueron similares. Un ejemplo de ello es lo que ocurre en la ontología proceso biológico, donde las clasificaciones proceso celular y metabólico son las más pobladas, presentando un 72 y 45% en el caso de aquellas KO de JMJD1B y de 68 y 45% en WT, respectivamente. Sin embargo, el KO de JMJD1B mostró una disminución en genes de actividad de molécula estructural, obteniendo un 5,8% frente a un 13% de las células WT.

Similarmente, se realizó el mismo análisis para los genes que se encontraron enriquecidos en ambas líneas celulares (**Figuras 16-18**). Donde el KO de JMJD1B no obtuvo resultados estadísticamente significativos (según test exacto de Fisher) para la categoría 'proceso biológico' (información no mostrada), pero sí en 'función molecular' con el inhibidor de proteasas A2m (**Tabla suplementaria 1**) y en 'componente celular', destacando nucleosomas, cromatina, germoplasma y plasma polar (**Tabla suplementaria 2**). De igual forma, los genes del enriquecimiento se clasificaron bajo las tres grandes categorías resultando en las **Figuras 25, 26 y 27**. En las que se observan gráficos de barras con el número de genes (eje Y) pertenecientes a las distintas categorías de la ontología en cuestión (eje X).

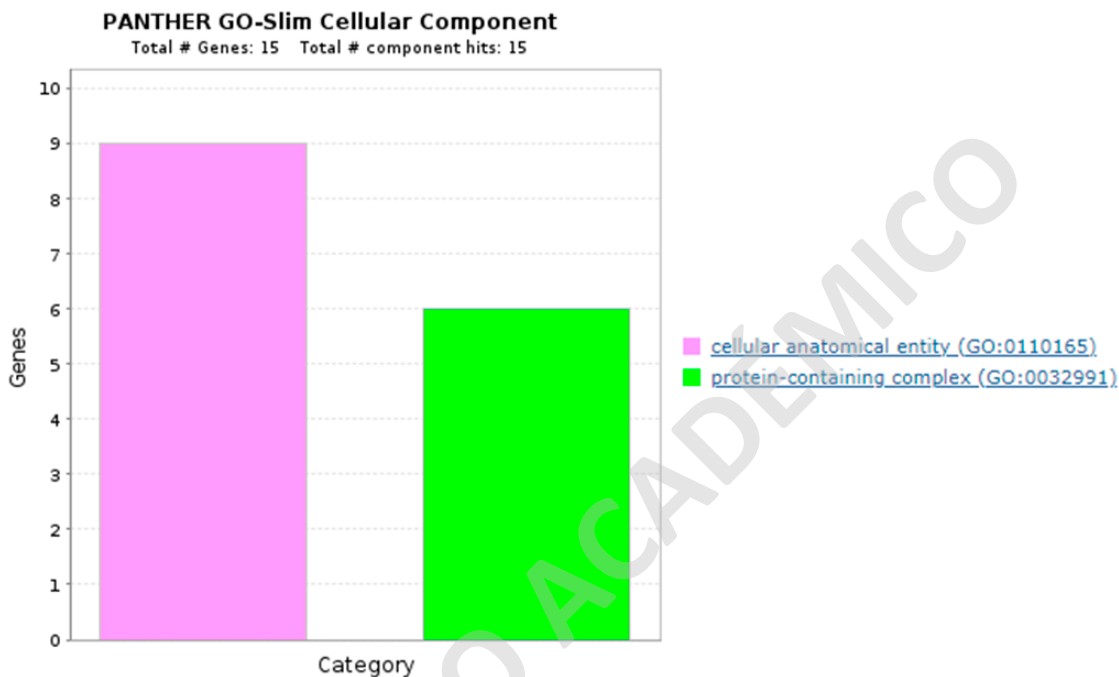
La **Figura 25** muestra la ontología de proceso biológico para el KO de JMJD1B, donde se encontró un gen de regulación biológica (Ccar2), 9 de proceso celular (Ccar2, Rps18, Psmc3, Ddx3x, Cct8, Ddx3y, Psmc3, Psmc2, wdr7 y, wdr77), 3 de proceso de desarrollo (Ddx3x, Ddx3y y wdr77), 4 de proceso metabólico (Ccar2, Psmc3, Psmc2 y Otud5), 3 de proceso de organismo multicelular (Ddx3x, Ddx3y y wdr77), 3 de reproducción (Ddx3x, Ddx3y y wdr77) y 3 de proceso reproductivo (Ddx3x, Ddx3y y wdr77). De la misma manera, la **Figura 26** muestra la ontología de función molecular, de las mismas células, en donde hay 3 genes con actividad dependiente de ATP (Psmc3, Ddx3x y Ddx3y), 7 de unión (Hist1h2ak, Ccar2, Rps18, Ddx3x, Cct8, Ddx3y y Hist1h2af), 4 de actividad catalítica (Psmc3, Ddx3x, Ddx3y y Otud5), 1 de actividad de molécula estructural (Rps18) y 1 de actividad reguladora de la transcripción (Ccar2). Finalmente, la **Figura 27** muestra la ontología de componente celular, donde 9 genes se asocian a entidad anatómica celular y 6 a un complejo contenedor de proteínas.



**Figura 25: Gráfico de barras de proceso biológico de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología proceso biológico (eje X). De izquierda a derecha, en verde se encuentra la categoría regulación biológica, en azul proceso celular, en celeste proceso de desarrollo, en gris proceso metabólico, en coral proceso de organismo multicelular, en verde chillón reproducción y en azul eléctrico proceso reproductivo (132).



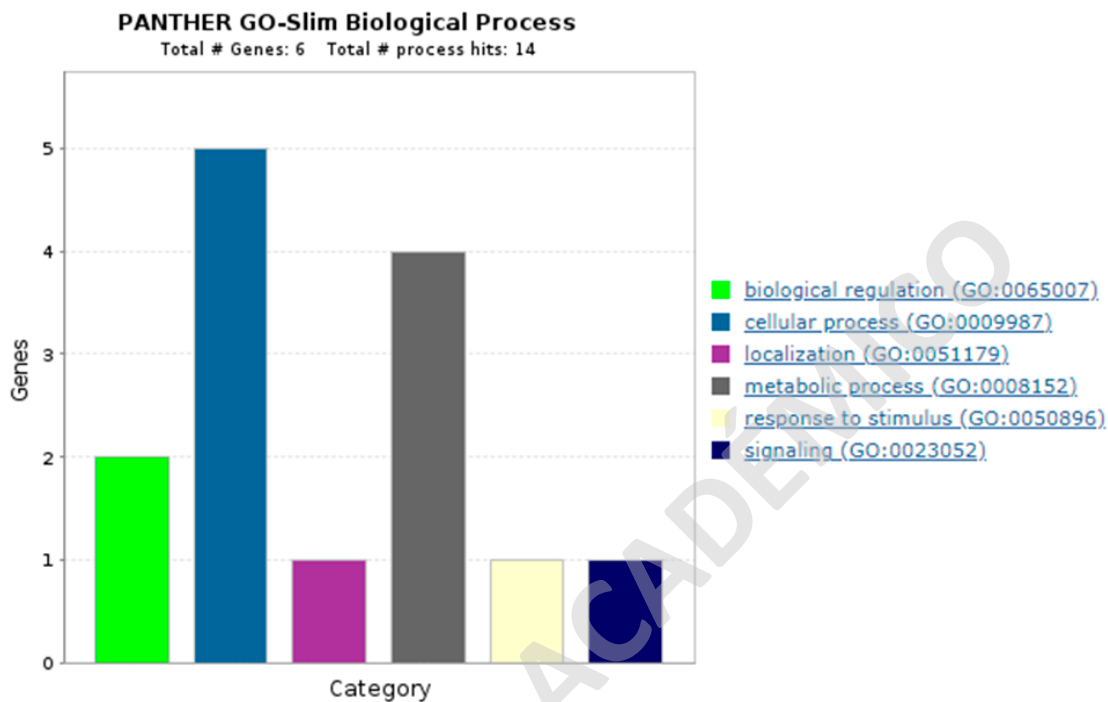
**Figura 26: Gráfico de barras de función molecular de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología función molecular (eje X). De izquierda a derecha, en gris se encuentra la categoría de actividad dependiente de ATP, en marengo unión, en lavanda actividad catalítica, en morado actividad de molécula estructural y el azul actividad reguladora de la transcripción (132).



**Figura 27: Gráfico de barras de componente celular de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología componente celular (eje X). De izquierda a derecha, en rosado se encuentra la categoría entidad anatómica celular y en verde complejo contenedor de proteínas (132).

Por su parte, el análisis de los genes enriquecidos en las células WT no obtuvo resultados estadísticamente significativos en ninguna de las tres grandes ontologías. No obstante, de igual forma los distintos genes de enriquecimiento se fueron clasificando según la ontología en cuestión (**Figuras 28, 29 y 30**). Donde la **Figura 28** muestra la ontología de proceso biológico, en el que se encuentran 2 genes de regulación biológica (Stk38 y Cnot2), 5 de proceso celular (Stk38, Xpo1, Cand1, Eif3a y Cnot2), 1 de localización (Xpo1), 4 de proceso metabólico (Stk38, Cand1, Eif3a y Cnot2), 1 de respuesta a estímulos (Stk38) y 1 de señalización (Stk38). Igualmente, la **Figura 29** muestra la ontología de función molecular en donde hay 2 genes de unión (Xpo1 y Eif3a), 2 de actividad catalítica (Stk38 y Hal) y 1 con actividad reguladora de la traducción (Eif3a). En tanto, la

**Figura 30** muestra la ontología de componente celular, donde hay 4 genes de entidad anatómica celular y 2 de un complejo contenedor de proteínas.



**Figura 28:** Gráfico de barras de proceso biológico de GO para genes enriquecidos en WT. Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en verde se encuentra la categoría regulación biológica, en azul proceso celular, en malva localización, en marengo proceso metabólico, en crema respuesta a estímulos y en azul oscuro señalización (132).

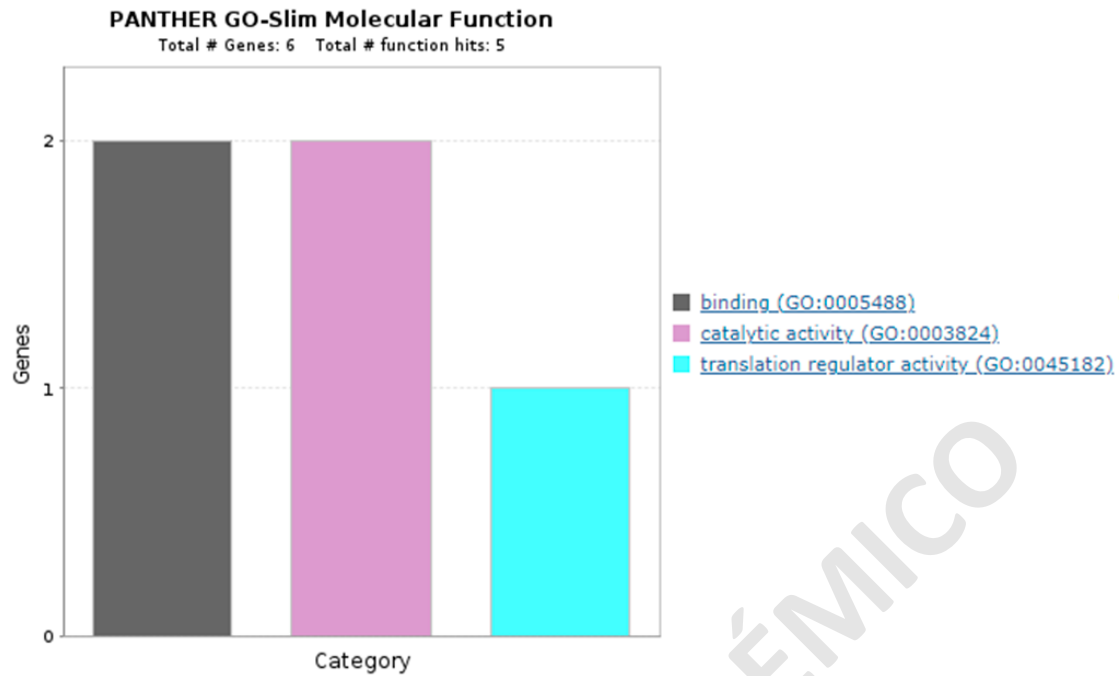
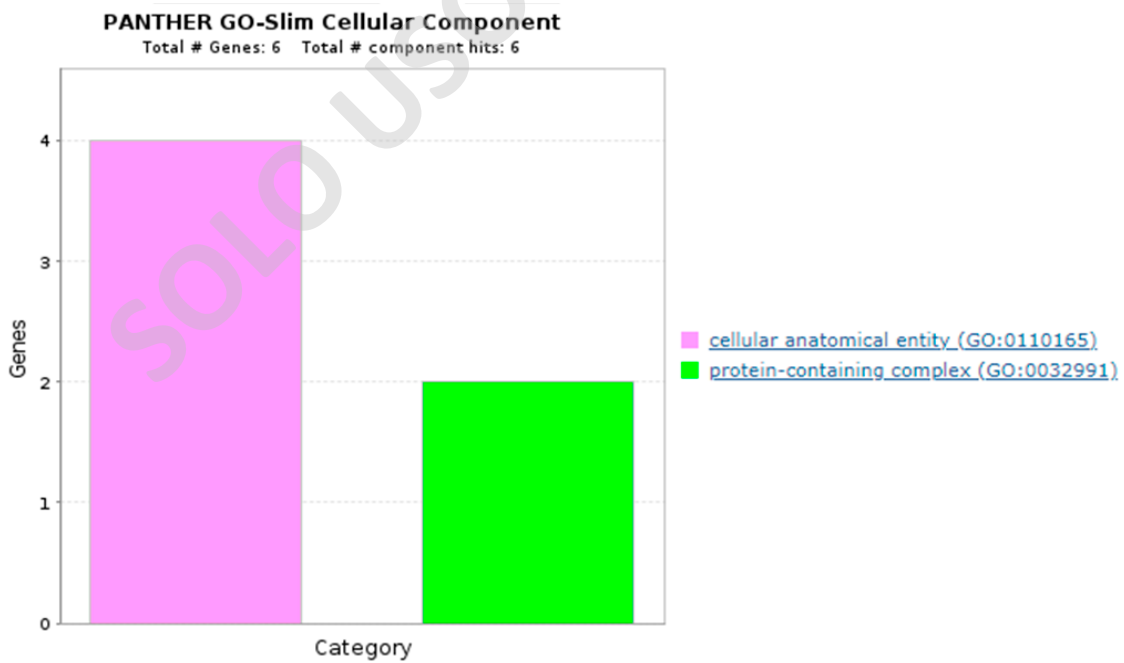


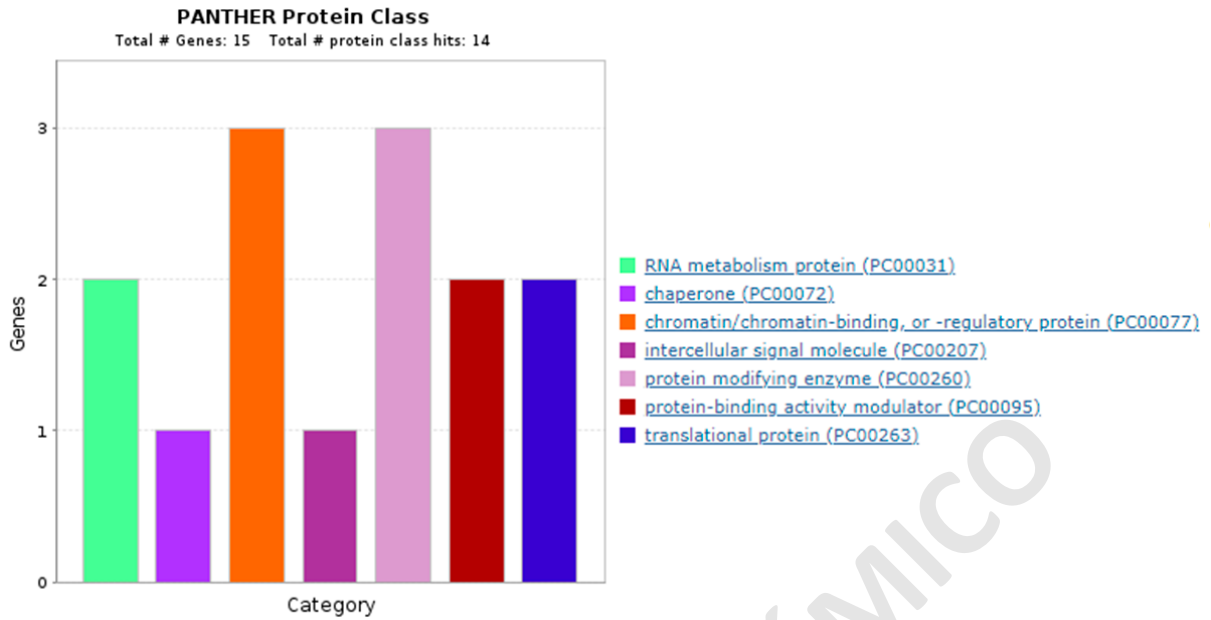
Figura 29: Gráfico de barras de función molecular de GO para genes enriquecidos en WT. Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en gris se encuentra la categoría unión, en lavanda actividad catalítica y en celeste regulador de la actividad de la traducción (132).



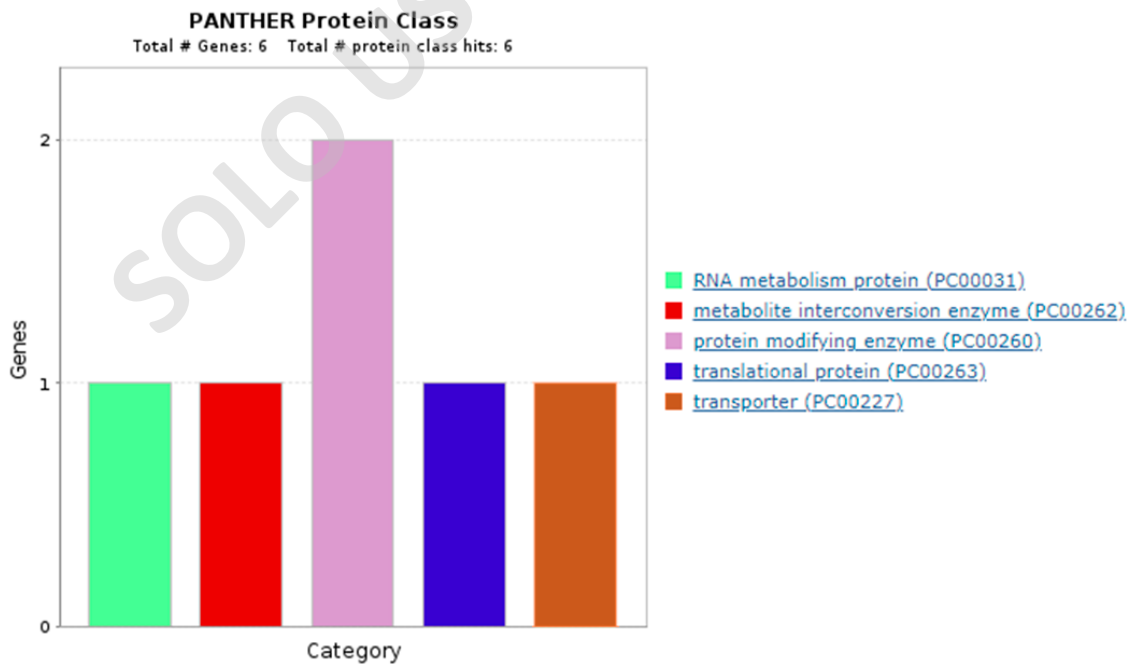
**Figura 30: Gráfico de barras de componente celular de GO para genes enriquecidos en WT.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en rosado se encuentra la categoría entidad anatómica celular y en verde complejo contenedor de proteínas (132).

En general, la ontología genética indica que los genes enriquecidos en el KO de JMJD1B participan en un 41% en procesos celulares y un 18% en desarrollo, además de tener un 18% de actividad catalítica y 29% de unión. Mientras que aquellos genes enriquecidos en WT presentaron un 83% de participación en procesos celulares y un 67% en procesos metabólicos, además de un 33% con actividad catalítica y otro 33% en unión. Sin embargo, estas clasificaciones resultan bastante generales, por lo que se optó por otra de las opciones que brinda PANTHER 'clase de proteína' para complementar el análisis (**Figuras 31 y 32**).

La **Figura 31** muestra la clase de proteína de los genes enriquecidos en el KO de JMJD1B, donde se observan 2 proteínas del metabolismo del RNA (Ddx3x y Ddx3y), 1 chaperona (Cct8), 3 proteínas de unión o regulación de cromatina (Hist1h2ak, Ccar2 y Hist1h2af), 1 molécula de señal intracelular (Fgg), 3 enzimas modificadoras de proteínas (Psmc3, Psmd2 y Otud5), 2 moduladores de la actividad de unión a proteínas (A2m) y 2 proteínas traduccionales (Rpl38 y Rps19). Por su lado, la **Figura 32** muestra la clase de proteína de los genes enriquecidos en WT, donde se observa 1 proteína del metabolismo del RNA (Cnot2), 1 enzima de interconversión de metabolitos (Hal), 2 enzimas modificadoras de proteínas (Stk38 y Cand1), 1 proteína traduccional (Eif3a) y 1 transportador (Xpo1). En síntesis, el KO de JMJD1B posee un enriquecimiento en proteínas de unión o regulación de cromatina que WT no, mientras que estas últimas presentan un enriquecimiento en proteínas menos específicas y más variadas asociadas al normal funcionamiento de la célula.



**Figura 31: Gráfico de barras de clase de proteína de GO para genes enriquecidos en KO de JMJD1B.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en verde se encuentra la categoría proteína de metabolismo de RNA, en iris chaperona, en naranja proteína de unión o regulación de cromatina, en malva molécula de señal intercelular, en lavanda enzimas de modificadora de proteínas, en burdeo modulador de la actividad de unión a proteína y en azul proteínas traduccionales.





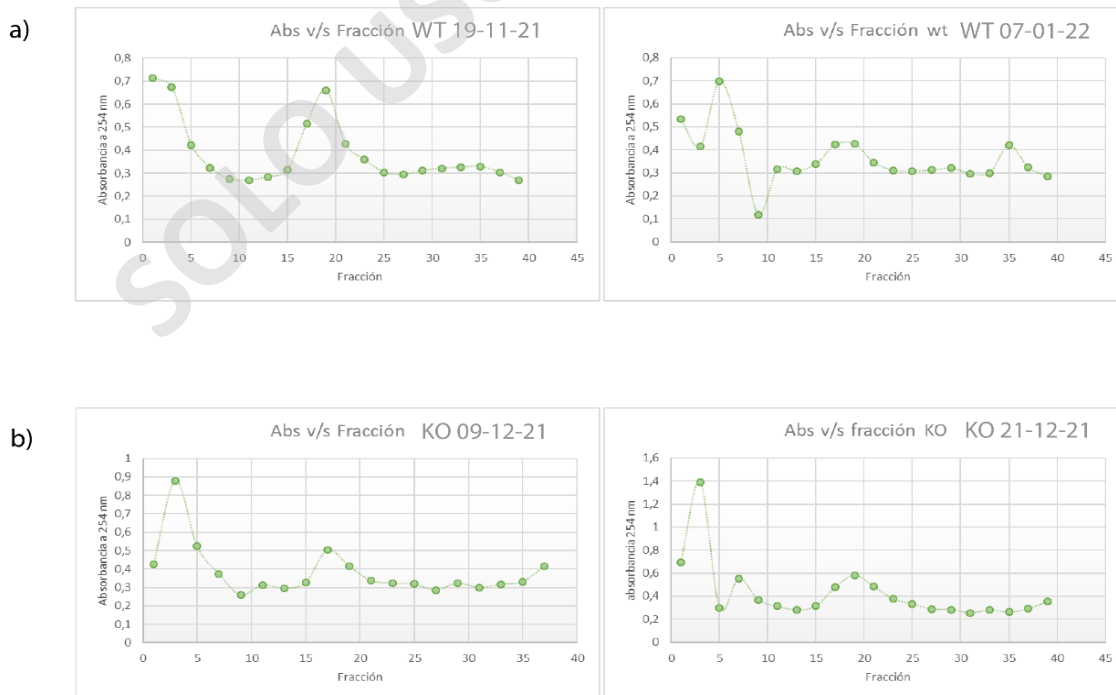
**Figura 32: Gráfico de barras de clase de proteína de GO para genes enriquecidos en WT.** Se muestra el número de genes (eje Y) de la ontología clase de proteína (eje X). De izquierda a derecha, en verde se encuentra la categoría proteína de metabolismo de RNA, en rojo enzima de interconversión de metabolito, en lavanda enzima modificadora de proteína, en azul proteína traduccional y en naranja transportador.

### 4.3 PTMs de las histonas H3 y H4 sintetizada de novo y asociadas a ribosomas.

Con el objetivo de analizar las modificaciones post-traduccionales de las histonas H3 y H4 sintetizadas de novo y aun asociadas al ribosoma, se purificaron ribosomas, se corrieron en un gel, se tiñeron con azul de Coomassie y se cortaron las bandas del tamaño de histonas para enviarlas a análisis de PTM.

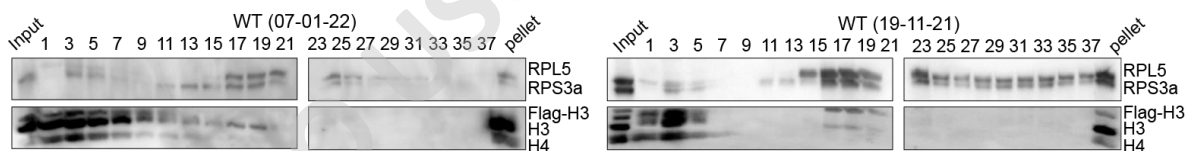
#### 4.3.1 Purificación de ribosomas.

Para aislar histonas H3 y H4 asociadas a los ribosomas, los extractos celulares se cargaron en las gradientes de sacarosa y pasado el tiempo de ultracentrifugación, se cortaron las gradientes, y se midió la absorbancia a 254 nm para la obtención de los perfiles de absorbancia de los ribosomas (133). Se graficaron sólo las absorbancias obtenidas en las fracciones impares (**Figura 33**), en donde se aprecian diferentes *peaks* de absorbancia: el primer *peak* dentro de las 3 primeras fracciones corresponde a RNAs y proteínas solubles, mientras que el segundo *peak* tiene lugar entre las fracciones 17 y 21 y corresponde a ribosomas.

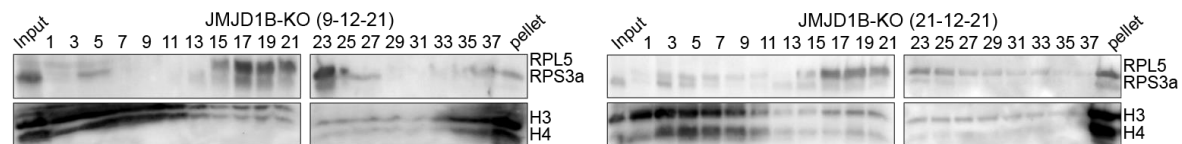


**Figura 33: Gráficas de las absorbancias de las purificaciones de ribosomas.** Se muestran las gráficas de las absorbancias (eje Y) de las fracciones impares (eje X) tituladas según la línea celular y la fecha en que fueron realizadas. **(a)** Corresponden a los gráficos de las mESC WT realizados el 19-11-21 (izquierda) y el 07-01-22 (derecha). **(b)** Corresponden a los gráficos de las mESC KO de JMJD1B realizados el 09-11-21 (izquierda) y el 21-12-21 (derecha).

La **Figura 34** muestra el análisis de western blot de fracciones derivadas de las purificaciones de ribosomas provenientes de las células mESC WT realizadas el 07-01-22 (izquierda) y el 19-11-21 (derecha). En ella se encuentra el input, que corresponde a la muestra cargada inicialmente en la gradiente de sacarosa, las fracciones impares y el pellet, que es el último corte realizado. Se muestra que el peak de la elusión de RPL5 y RPS3a se encuentran entre las fracciones 17 a la 21 en ambas muestras. Mientras que las histonas H3 y H4 presentan un primer peak en las primeras fracciones y luego nuevamente se encuentran entre las fracciones 17 a 21. Por su parte, la **Figura 35** muestra las purificaciones de ribosomas provenientes de células mESC KO de JMJD1B realizadas el 9-12-21 (izquierda) y el 21-12-21 (derecha). En ella se encuentra el input, que corresponde a la muestra cargada inicialmente en la gradiente de sacarosa, las fracciones impares y el pellet, que es el último corte realizado. Se muestra que las proteínas ribosomales se encuentran entre las fracciones 17 y 21, junto con el segundo peak de las histonas H3 y H4.



**Figura 34: Western blot de las purificaciones de ribosomas desde las células mESC WT.** Se muestran los western blots de las purificaciones de ribosomas de las células mESC WT con la fecha en que fue realizada la purificación. Las proteínas evaluadas fueron RPL5 de 34kDa, RPS3a de 30 kDa, Flag de 24 kDa y las histonas H3 y H4 de 17 y 14 kDa respectivamente.



**Figura 35: Western blot de las purificaciones de ribosomas desde las células mESC KO de JMJD1B.** Se muestran los western blots de las purificaciones de ribosomas de las células mESC KO de JMJD1B con la fecha

en que fue realizada la purificación. Las proteínas evaluadas fueron RPL5 de 34kDa, RPS3a de 30 kDa y las histonas H3 y H4 de 17 y 14 kDa respectivamente.

Considerando las **Figuras 33, 34 y 35**, se decidió tomar desde la fracción 17 a la 21 de cada una de las gradientes de mESC WT y KO de JMJD1B analizadas. Estas fracciones se concentraron mediante una precipitación de MeOH/cloroformo descrito previamente en la sección **3.2.9** y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12.5%, tiñéndose con azul de Coomassie. La **Figura 36** muestra el gel teñido con dichas muestras, correspondientes a duplicados de mESC WT y KO de JMJD1B obtenidos en distintos días. Este gel se cortó según el ladder entre 12 y 26 kDa, dado que es en esta zona en la que se espera encontrar las histonas H3 y H4. Estos cortes de geles se enviaron para el análisis de modificaciones post-traduccionales al laboratorio del Dr Axel Imhof en Alemania (Ludwig-Maximilians-University of Munich, LMU). En estos análisis se excluyeron las mESC KH2 dada la redundancia con las mESC WT y debido a que no sería comparable con aquellas KO de JMJD1B al no tener la fusión H3-FLAG.



**Figura 36: Corte de gel de las muestras de ribosomas utilizadas para el análisis por espectrometría de masas.** Se muestran los geles de poliacrilamida cargados con las fracciones ribosomales de células WT y JMJD1B-KO teñidos con azul de Coomassie. Se muestran las zonas de corte de cada línea celular junto al estándar de peso molecular.

#### **4.3.2 Espectrometría de masas y PTMs de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas asociadas a ribosomas.**

En la **Figura 37** se logra dilucidar, desde otra perspectiva, el enriquecimiento de las histonas H3 y H4 por parte del knockout de JMJD1B. Donde independientemente de la muestra, WT o KO, siempre son estas últimas las que presentan una mayor cantidad de las histonas en cuestión. Además, existe una mayor presencia de histona H4 que de histona H3.



**Figura 37: Distribución de las histonas H3 y H4.** En el eje X se encuentran las distintas muestras WT y KO con sus respectivas fechas, mientras que en el eje Y se encuentran las absorbancias relativas de las histonas en cuestión. Se muestra la distribución de las histonas H3 (izquierda) y H4 (derecha) en las cuatro muestras evaluadas.

A continuación, se presentan diversas tablas con los resultados obtenidos con las distintas PTMs encontradas en las histonas H3 y H4. En ellas, la primera columna muestra el residuo modificado y luego sus respectivas PTMs. En las columnas 2, 3, 5 y 6 se ven las muestras en cuestión (WT y KO) y los porcentajes correspondientes a cada PTM. Mientras que las columnas 4 y 7 muestran las desviaciones estándar existentes para cada PTM.

**Tabla 4: Metilación de H3K4.** Se muestran los porcentajes de las distintas modificaciones de la lisina 4 de la histona H3 junto a sus respectivas desviaciones estándar. p, sin modificación; me1, monometilación.

H3K4	WT 07-01-22	WT 19-11-21	Desviación estándar	KO 09-11-21	KO 21-12-21	Desviación estándar
p	93,7	23	50	75,8	99,7	16,9
me1	6,3	77	50	24,2	0,3	16,9

**Tabla 5: Metilación y acetilación de H3K9K14.** Se muestran los porcentajes de las distintas modificaciones de las lisinas 9 y 14 de la histona H3 junto a sus respectivas desviaciones estándar. p, sin modificación; me1, monometilación; me2, dimetilación; me3, trimetilación; ac, acetilación.

H3K9K14	WT 07-01-22	WT 19-11-21	Desviación estándar	KO 09-11-21	KO 21-12-21	Desviación estándar
p/p	29,4	15,5	9,8	26,3	48,7	15,8
me1/p	34,4	81,9	33,6	51,9	31,2	14,6
me3/p	14	0,1	9,8	4,8	5,3	0,1
me1/ac	2,1	0,1	1,4	2,7	1,8	0,6
me2/p	12,2	0,4	8,3	5,9	7,8	1,3
ac/ac	7,8	2	4,1	8,4	5,2	2,3

**Tabla 6: Metilación y acetilación de H3K18K23.** Se muestran los porcentajes de las distintas modificaciones de las lisinas 18 y 23 de la histona H3 junto a sus respectivas desviaciones estándar. p, sin modificación; ac, acetilación.

H3K18K23	WT 07-01-22	WT 19-11-21	Desviación estándar	KO 09-11-21	KO 21-12-21	Desviación estándar
p/p	65,2	79,2	9,9	72,9	84,2	8
ac/p	3,4	6,6	2,3	4,6	5,1	0,4
p/ac	22,6	5,7	12	19,5	10,6	6,3
ac/ac	8,8	8,5	0,2	3	0	2.1

**Tabla 7: Metilación de H3K27K36K37.** Se muestran los porcentajes de las distintas modificaciones de las lisinas 27, 36 y 37 de la histona H3 junto a sus respectivas desviaciones estándar. p, sin modificación; me1, monometilación; me2, dimetilación; me3, trimetilación.

H3K27K36K37	WT 07-01-22	WT 19-11-21	Desviación estándar	KO 09-11-21	KO 21-12-21	Desviación estándar
p/p/p	28,4	99,3	50,1	26,1	51	17,6
p/me1/p	2,2	0	1,6	0,9	0,7	0,4
me1/p/p	9,5	0,3	6,5	5,3	5	0,2
me2/p/p	31,9	0,2	22,4	30,2	16,9	9,4
p/me2/p	3,7	0	2,6	1,5	1	0,35
me3/p/p	5,8	0,1	4	12,8	8,5	3
me2/me1/p	16,3	0,1	11,5	17,4	13,3	2,9
me1/me1/p	2,4	0,1	1,6	6	3,8	1,6

**Tabla 8: Metilación de H3K79.** Se muestran los porcentajes de las distintas modificaciones de la lisina 79 de la histona H3 junto a sus respectivas desviaciones estándar. p, sin modificación; me1, monometilación.

H3K79	WT 07-01-22	WT 19-11-21	Desviación estándar	KO 09-11-21	KO 21-12-21	Desviación estándar
p	94,4	99,9	3,9	92,7	93,9	0,9
me1	5,6	0,1	3,9	7,3	6,1	0,9

**Tabla 9: Metilación de H4K20.** Se muestran los porcentajes de las distintas modificaciones de la lisina 20 de la histona H4 junto a sus respectivas desviaciones estándar. p, sin modificación; me1, monometilación; me2, dimetilación; me3, trimetilación.

H4K20	WT 07-01-22	WT 19-11-21	Desviación estándar	KO 09-11-21	KO 21-12-21	Desviación estándar
p	2,5	0,5	1,5	3	5,2	1,6
me1	92,4	99,4	5	89,8	88,8	0,7
me2	4,9	0	3,9	6,8	5,6	0,9
me3	0,2	0	1,2	0,4	0,4	0

Respecto a los sustratos de JMJD1B, la H3K9me1 independientemente de si la lisina 14 está acetilada o no metilada, en las WT (07-01-22 y 19-11-21) alcanzan el 36,5 y 82% respectivamente, mientras que en las KO de JMJD1B (09-11-21 y 21-12-21) un 54,6 y 33% respectivamente. De manera similar a lo que ocurre con la no metilación de H3K9K14, KO de JMJD1B tendería en este caso a la baja de H3K9me1, lo que sería consistente con nuestros resultados anteriores (55). Sin embargo, dada la dispersión de los datos especialmente de las células WT no se puede determinar con confianza el comportamiento de esta modificación (**Tabla 5**).

Por su parte, las PTMs del residuo de lisina 79 de la histona H3 (H3K79) presentadas en la **Tabla 8**, a pesar de la dispersión de datos entre muestras de una misma línea celular, la no metilación de esta lisina es claramente dominante en todas las muestras, donde, no se encontró mayores diferencias entre las líneas celulares evaluadas.

De manera similar, la dispersión de datos de las PTMs en el residuo de lisina 20 de la histona H4 no fue tan alta como en las otras modificaciones, lo que permite mayor confianza al momento de analizar los datos. Al respecto, la monometilación de H4K20 es la marca predominante en ambas condiciones, la cual además presenta una leve disminución en células KO de JMJD1B respecto a las WT. De la misma manera, tanto la no metilación de H4K20 como las H4K20me2/3 se benefician de ello y presentan un leve aumento en KO de JMJD1B.

Por otro lado, la dispersión de los datos entre muestras del mismo tipo celular no sólo entre los porcentajes de las distintas PTMs, sino que también el número de histonas H3 y H4, entorpeció gran parte de las conclusiones respecto a las marcas en cuestión (**Tabla 4-7**). Sin embargo, este fenómeno fue más marcado en células WT donde incluso la cantidad de histonas H3 y H4 fue inmensamente menor no sólo respecto a sus pares KO de JMJD1B, sino que igualmente en relación al otro WT (**Figura 37**). Así, se espera enviar una tercera muestra de ambas líneas celulares.

## 5-. DISCUSIÓN.

Actualmente se sabe que las alteraciones epigenéticas resultantes de desregulaciones de las enzimas que modifican tanto al DNA como a las histonas, también son una causa subyacente del desarrollo del cáncer (35). JMJD1B es una desmetilasa que tiene como sustrato la lisina 9 de la histona H3 mono y dimetilada (H3K9me1/2) y que, según estudios previos en el laboratorio no sólo es fundamental para la estabilidad genómica, sino que también un knockdown de esta proteína generó una acumulación de las histonas H3 y H4 en tempranas etapas de su cascada de maduración, al igual que de la chaperona NASP (55). Es por ello que se planteó la pregunta: ¿Cómo afecta JMJD1B la cascada de maduración de la histona H3? Para lo cual se dispuso a caracterizar la función de JMJD1B en la maduración de la histona H3 recientemente sintetizada. Al respecto, se encontró que las células mESC KO de JMJD1B crecen más rápido que las WT, pero no muestran diferencias a la hora de diferenciarse. De la misma manera, la interactómica de la histona H3 no mostró proteínas exclusivas en el KO de JMJD1B, pero sí diferencias en las proteínas en que estaban enriquecidas respecto al WT. Asimismo, las PTMs en la histona H3, y una de H4, mostraron tanto aumentos como disminuciones.

Lo observado en los western blots de los extractos celulares (**Figura 9**) concuerda con lo observado previamente en el laboratorio en células HeLa con un knockdown de JMJD1B, donde se observa un aumento en las histonas H3 y H4, en NASP y en HSP90 (55), esta última si bien no parece alterada (**Figura 9a**), sí se ve que el knockout de JMJD1B posee enriquecimiento de dicha proteína respecto al WT en los análisis de interactómica (**Figura 17**). Cabe destacar que todas estas proteínas conforman el complejo II en la cascada de maduración de las histonas H3 y H4 (22,24,134). Por su parte, el hallazgo de una mayor proliferación por parte de las células mESC KO de JMJD1B (**Figura 10**), plantea la interrogante de qué procesos se ven afectados y son responsables de una mayor proliferación celular. Al respecto, se observó que la deficiencia de esta desmetilasa puede inhibir la señalización de p53-p21, lo que permite no sólo la proliferación de las células cancerígenas, sino que también su supervivencia (135). De la misma manera, se ha visto que células humanas de leucemia promielocítica (NB4) (136) con un knockdown de JMJD1B presentan una mayor proliferación en comparación con el control. Este estudio además realizó un análisis de citometría, mediante el cual determinó que esta línea celular presentaba un porcentaje claramente mayor de células en fase S respecto al control, lo que indicaría una alta tasa de síntesis de DNA y proliferación celular cuando JMJD1B es deficiente (56).

Adicionalmente, en células madre espermatozonales la pérdida conjunta de JMJD1A y JMJD1B indujo a la pérdida de células germinales masculinas, al impedir el cambio de expresión génica que permite la diferenciación de proespermatozonias a espermatozonias (52). De la misma manera, se ha visto que ratones hembra knockout de JMJD1B exhiben una función reproductiva gravemente afectada y ser en gran parte infértiles. Mientras que, anteriormente en el laboratorio se evidenció, gracias a un marcador de daño de DNA de doble cadena, que el knockdown de JMJD1B en células HeLa dañaba el DNA e inducía estrés en la replicación dado que altera la deposición de la histona H3 a la cromatina (55). Todo lo anterior, da cuenta de que la deficiencia de la desmetilasa JMJD1B no sólo altera la mitosis, sino que también la meiosis.

Las células madre embrionarias cultivadas en presencia de LIF o MEF conservan su pluripotencia y capacidad de autorrenovación (137,138). Pero en ausencia de LIF, las células comienzan espontáneamente su diferenciación y posterior formación de agregados multicelulares tridimensionales conocidos como cuerpos embrionarios (EBs). Estos EBs facilitan las interacciones multicelulares existentes entre el contacto célula-célula, permitiendo así su comunicación (85). Generalmente se utilizan 3 métodos de cultivo para la inducción de la diferenciación y formación de EBs, los que pueden ser: el cultivo en suspensión líquida en placas para bacteria, cultivo en gotas colgantes y cultivo en semisólidos de metilcelulosa (139,140). Dada la diversidad de cultivos y condiciones de los mismos, las características de los EBs no son homogéneas. Sin embargo, según el estado de diferenciación se clasifican como EBs quísticos o simples (141–143). A pesar de ello, en la mayor parte de los estudios se describen sólo como EBs independientemente del estado de diferenciación en el que se encuentren (144). Al respecto, entre el día 2 y 4 post-remoción de LIF (**Figura 11**), se observa claramente la formación de dichos EBs, mientras que en el día 7 se ven proyecciones de los mismos hacia aquellos más cercanos. No obstante, no se observaron diferencias durante este proceso entre las células carentes de JMJD1B y las demás, lo que podría indicar que su actividad no es fundamental en los primeros estadios de diferenciación, pero sí es requerida más adelante tanto para la diferenciación de células madre hematopoyéticas (135), como para la fertilidad en ratones (52). Por otro lado, cabe destacar que si bien estas células KO de JMJD1B no mostraron diferencias al formar EBs, sí lo hicieron a la hora de proliferar solo en el estado indiferenciado.

El análisis del componente principal realizado en los estudios del interactoma de la histona H3 confirmó la variabilidad de los proteomas evaluados, lo que indicaría una individualidad de las



mismas (**Figura 14**). Mientras que lo observado en el diagrama de Venn (**Figura 15**) da cuenta de la pérdida o ganancia de interacción de algunas proteínas con H3 al no estar presente JMJD1B. Por su parte, los heatmaps muestran que, ambas líneas celulares están enriquecidas en proteínas que participan en la transcripción y subunidades del proteosoma, encargado de degradar proteínas defectuosas que estén ubiquitinadas (145). WT en general presentó proteínas asociadas en algún punto con los procesos del dogma central de la biología molecular (**Figura 18**). En cambio, las proteínas del KO de JMJD1B fueron en su mayoría chaperonas y/o reguladoras de procesos celulares, como la respuesta inmune (**Figura 19**). No obstante, KO de JMJD1B mostró un enriquecimiento de la chaperona HSP90, lo que coincide con lo observado previamente en células HeLa (55). De todas formas, se esperaba encontrar una mayor cantidad de proteínas conocidas por interactuar con la histona H3, tal como fue el caso de HSP90, sin embargo, se aprecian sólo 4 de ellas (**Figura 16**). Lo que podría deberse a un bloqueo estérico por parte de aquellas proteínas más enriquecidas, a las alteraciones en las PTMs que recluten o dejen de reclutar otras proteínas distintas al WT o incluso que dada su acumulación citosólica se reclutan más chaperonas para asegurar un correcto plegamiento y/o PTMs para su translocación al núcleo.

En cuanto a la ontología genética, tanto el KO de JMJD1B como WT mostraron principalmente genes que participan en procesos celulares, con actividad catalítica y de unión, diferenciándose en que estas últimas presentan participación en procesos metabólicos, mientras KO de JMJD1B en desarrollo (**Figuras 25, 26, 28 y 29**). No obstante, si bien los genes de enriquecimiento de ambas líneas celulares se clasificaron bajo los tres grandes *clusters* de GO, los *clusters* hijos fueron bastante generales y dan una idea vaga de la funcionalidad de cada gen. Por lo que, se decidió por complementar lo anterior por la ontología de clase de proteína brindada por PANTHER (**Figuras 31 y 32**). En ella, se observa que el KO de JMJD1B posee más proteínas de unión o regulación de cromatina que WT, pero estas últimas presentan mayor variabilidad de proteínas requeridas para un normal funcionamiento de la célula.

Las PTMs en las colas de las histonas desempeñan un papel crucial en el modelamiento de la arquitectura de la cromatina, lo que no sólo afecta la accesibilidad al DNA, sino que, a su vez también la expresión génica (66,146). Al respecto, algunas PTMs activadoras en cromatina son H3K4me1, 2 y 3 y acetilado, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac y H3K79me2/3 y acetilado (34,56,66,146–152). Mientras que H3K9me1/2/3, H3K27me1/2/3 y H4K20me1/3 son modificaciones represoras (34,36,146,150,153). No obstante, toda aquella información corresponde a histonas nucleosomales,

quienes constituyen el 99% de las histonas totales, donde se ha visto que patrones de modificación de la histona H3 pueden verse influenciados por una modificación anterior que ocurre antes de que las histonas se incorporen a la cromatina (7), tal como ocurre con la H3K9me1 (23). Por lo que, entender qué ocurre con las histonas antes de llegar al núcleo es un desafío que podría dar respuesta a distintos fenómenos producidos por el desajuste de las mismas, ya sea por una perturbación en sus niveles o en las PTMs. En función de aquello, se evaluaron las histonas citosólicas, quienes corresponden al 0,4% de las histonas totales (7). Sin embargo, los esfuerzos de los distintos investigadores se han concentrado en el 99% de las histonas presentes en la célula, por lo que los resultados obtenidos carecen de una fuente de comparación para la discusión de los mismos.

De la misma manera, otros autores proponen que a pesar de que no se conoce la combinación de metiltransferasa/desmetilasa responsables del ajuste de la metilación de H3K9, la acción antagónica de las desmetilasas JMJD1A/JMJD1B y la metiltransferasa G9A serían necesarias para la reorganización del epigenoma metilado de H3K9 luego de la diferenciación (39). Respecto a las PTMs en H3K9K14, la dispersión de los datos es tan grande que entorpece un correcto análisis. Sin embargo, la monometilación de H3K9 se encuentra mayormente con H3K14 no metilada respecto a esta misma marca acetilada. Por su parte, si sólo se mira H3K9me1 y no se toma en cuenta el estado de H3K14, las WT presentan un 36,5 y un 82%, mientras que las KO de JMJD1B un 54,6 y un 33%. De manera similar, la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 con la lisina 14 no metilada, muestra un 12,2 y 0,4% en WT y un 5,9 y 7,8% en KO de JMJD1B (**Tabla 5**). Recordando que la monometilación de H3K9 se asocia a heterocromatina y la acetilación de la H3K14 a eucromatina (56,147,148,150,154) y que la desmetilasa JMJD1B tiene como sustrato a H3K9 mono y dimetilada (34–37), se esperaba encontrar una disminución de H3K9me1 tal como se observó previamente en el laboratorio en un knockdown de JMJD1B (55). No obstante, se esperaría una acumulación de ambas marcas según la lógica del funcionamiento de JMJD1B y de otros estudios (39,52,135,155). Donde incluso no sería de extrañar que la trimetilación de H3K9 se vea alterada, a pesar de que no sea sustrato de JMJD1B, dado que esta desmetilasa la regula indirectamente al actuar sobre sus precursores (34). Sin embargo, debido a que las muestras WT difieren rotundamente en estas PTMs no es posible saber el impacto que tiene el knockout de la desmetilasa JMJD1B en ella. La diferencia entre muestras podría deberse a la asincronía de las células tratadas, dado a que se presenta una cantidad de histonas diferentes a lo largo del ciclo celular, además de que estas PTMs varían según estas mismas etapas. Por otro lado, otros investigadores vieron que la pérdida conjunta de ambas

isoenzimas JMJD1A/JMJD1B produce una expresión de genes metabólicos perturbada junto con una rápida muerte de células madre embrionarias, dadas por una acumulación excesiva de la metilación de H3K9 en células madre embrionarias (39).

De igual importancia, la **Tabla 8** mostró una clara disminución de las acetilaciones de las lisinas 18 y 23 de la histona H3 en las células KO de JMJD1B, aunque ninguna de las dos es sustrato de esta desmetilasa, lo que deja en evidencia el impacto de esta proteína en el código de histonas. Aunque no existen estudios de la función de estas PTMs en histonas solubles, la acetilación de H3K18 en la cromatina, tal como se describió anteriormente, se asocia a activación génica (151), mientras que la acetilación de H3K23 a pesar de no estar bien estudiada, se sabe que las acetilaciones están generalmente relacionadas con la expresión génica (156). Asimismo, muestras de carcinoma de mama mostraron que altos niveles de H3K23ac y de la oncoproteína TRIM24, quien reconoce dicha marca, se relacionaron positivamente con una supervivencia más corta en pacientes que padecen este tipo de cáncer (157). Considerando lo anterior, esto sugiere que JMJD1B favorece la génesis del cáncer de seno dado su aporte en el código de histonas.

Por su parte, se observó un aumento de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 con las lisinas 36 y 37 no metiladas (H3K27me3K36pK37p), como de la monometilación de las lisinas 27 y 36 con la lisina 37 no metilada (H3K27me1K36me1K37p) (**Tabla 7**). Respecto a la función de dichas marcas, nuevamente se llega al conflicto de que no hay información de ellas en histonas solubles. Aunque en cromatina la monometilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 son consideradas marcas represoras (34,66,146,150). La H3K27me3 es impuesta por EZH2 quien forma parte del complejo PRC2 (158), y se ha visto aumentada en tejidos de cáncer de próstata y se correlacionó con características tumorales agresivas (159). Lo que sugiere un potencial inhibitorio de JMJD1B en su impacto temprano en las PTMs que más tarde impactarán en la génesis del cáncer de próstata al llegar a la cromatina.

En cambio, la lisina 79 de la histona H3 (H3K79) se encontró en dos estados: no metilada y monometilada. Donde a pesar de la no metilación de este residuo fuera la marca predominante entre muestras, las células KO de JMJD1B presentaron una leve disminución en ella, lo que se relaciona con el leve aumento de la H3K79me1 en estas células respecto a las WT (**Tabla 8**). A pesar de que no se ha descrito la función de esta marca en histonas solubles, en cromatina la di y trimetilación de la misma se asocian a altos niveles de expresión génica (152), mientras que la H3K79me1 no es suficiente para mantenerlos (160). Igualmente, otros autores describen esta marca

en cromatina como no concluyente respecto a la activación y represión génica (150). Lo anterior, es destacable dada la poca información respecto a la función de H3K79me1 disponible, en ambas histonas solubles y nucleares, sino también por la lejanía entre el sustrato de JMJD1B y H3K79 (**Figura 5**).

Paralelamente, las PTMs de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20), fueron las que obtuvieron la menor dispersión de datos, lo que facilitó el análisis de los mismos al ser estos de mayor confianza. Donde se observó que a pesar de que la monometilación de H4K20 es predominante en todas las muestras, las células KO de JMJD1B presentaron una leve disminución en ella, lo que fue aprovechado tanto por la no metilación de H4K20 como las H4K20me2/3, quienes presentan un leve aumento respecto a las WT (**Tabla 9**). Respecto a las funciones de dichas marcas, nuevamente no hay evidencias de ellas en histonas solubles, pero en cromatina, ambas se asocian a represión (56,66,150,153). Cabe destacar que no existe literatura que relacione estas PTMs con la desmetilasa JMJD1B.

A pesar de la dispersión de datos entre las muestras, especialmente WT, las células KO de JMJD1B no se mostraron similares a ningún valor de las células WT. Sin embargo, dicha dispersión entorpeció un análisis concluyente de las distintas PTMs, incluidas los sustratos de JMJD1B. Por lo que, para poder realizar un análisis de mayor confianza se debería enviar al menos una tercera muestra de cada línea celular y/o considerar el estado de las células al momento de trabajar con ellas, para lo cual habría que sincronizarlas para evaluar estas PTMs en el mismo momento de ciclo celular en ambas condiciones. De la misma manera, se podría proponer un modelo que dé cuenta de qué procesos se ven afectados por la deficiencia de JMJD1B que generan una mayor proliferación respecto a las WT. Todo lo anterior, para lograr un mejor entendimiento y comprensión de las implicancias de JMJD1B en las células y así, poder proponer y estudiar la viabilidad de distintas terapias que tengan como blanco a esta desmetilasa en contexto de cáncer, donde se ha visto alterada su función.

De este modo, las células knockout de la desmetilasa JMJD1B no sólo crecen más rápido que sus pares WT, sino que también presentan diferencias en el enriquecimiento de distintas proteínas, tales como NASP y HSP90 quienes forman parte de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4. De la misma manera, su ausencia no deja indiferente a las PTMs de estas histonas citosólicas, pero se debe retomar la experimentación para validar los resultados al evaluar una tercera muestra.

## 6-. CONCLUSIONES.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar el rol de JMJD1B en la maduración de la histona H3 recientemente sintetizada, mediante el análisis de muestras de células mESC wild type y knockout de esta desmetilasa. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1-. La caracterización de la función de JMJD1B en la maduración de la histona H3 recientemente sintetizada se encaminó gracias a la evaluación de las distintas PTMs de la histona H3 citosólica, su interatómica y los ensayos de proliferación y diferenciación de células carentes de JMJD1B.

2-. Las células mESC KO de JMJD1B presentan una mayor proliferación que sus pares WT, al igual que contienen una mayor cantidad de histonas H3 y H4, tal como ocurre en cáncer, pero al momento de diferenciarse y formar cuerpos embrionarios estas no muestran diferencias.

3-. Los resultados de la interactómica de la histona H3 dan cuenta de que aquellas células KO de JMJD1B se encuentran enriquecidas principalmente en chaperonas y elementos de cromatina, mientras que aquellas predominantes en WT se asocian a la traducción y al proteosoma.

4-. Los cambios en las distintas PTMs en aquellas células KO de JMJD1B no son concluyentes dada la dispersión de los datos entre las muestras WT. Sin embargo, es innegable que el KO de JMJD1B tiene un impacto en ellas.

5-. En general, los resultados obtenidos apuntan a que la deficiencia de JMJD1B promueve la proliferación celular en células indiferenciadas, pero no afecta la formación de EBs. Al mismo tiempo que se asocia a una mayor interacción de la histona H3 citosólica con chaperonas e impacta en las PTMs no sólo de esta histona H3, sino que también de su compañera H4.

## 7-. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS.

La función que cumplen las enzimas modificadoras de histonas como la desmetilasa JMJD1B, son de vital importancia en la estabilidad genómica y sobrevivencia de las células, dado que cualquier perturbación en la estructura de la cromatina podría conducir a una expresión aberrante de genes, lo que a su vez podrían gatillar un cáncer. Es por ello que un mejor entendimiento tanto de los sustratos de estas enzimas como el impacto que tienen sus modificaciones en el código de histonas, es crucial para poder desarrollar algún fármaco o terapia que tenga como blanco estas enzimas defectuosas ya sea inhibiéndolas o potenciando su acción según corresponda. Lo anterior, gracias a la medicina genómica y la farmacogenética, que cada día toman mayor fuerza y relevancia para lograr una sanación personalizada para el paciente y no según un protocolo genérico.

Bajo esta misma línea, dado que la perturbación en los niveles de JMJD1B genera diversos problemas en el organismo, mantener sus niveles dentro de un rango normal es relevante tanto para una correcta expresión génica, como la estabilidad del genoma. a modo de prediagnóstico podría realizarse un microarreglo que contenga como sondas aquellas secuencias de JMJD1B mutadas no sólo en los diferentes cánceres (**Figura 38**), sino que también en otras patologías en donde su función se encuentre alterada. Lo anterior, junto con la secuencia normal de este gen para evaluar no solo una posible predisposición a la enfermedad en cuestión, sino que también evaluar los posibles pasos a seguir en caso de que esta patología ya haya tomado lugar.

Al respecto, la sobreexpresión de JMJD1B promueve el cáncer de próstata (161), de hígado (48), de seno (162) y de estómago (163), entre otros. Por lo que, la disminución de esta desmetilasa es crucial para un mejor pronóstico. En donde, una terapia génica basada en la utilización de morfolinós lograría disminuir los niveles de esta proteína al unirse en algún punto de la región 5'UTR y así impedir el ensamble de las subunidades del ribosoma por un impedimento estérico (**Figura 39**). Su ventaja por sobre el RNA de interferencia radica en que este no es reconocido por nucleasas, por lo que no se degrada, pero sí se va perdiendo con las divisiones celulares (164,165). Además, están aprobados por la FDA debido a que se utilizan como sustituyentes proporcionando una mejor actividad, selectividad, beneficios farmacocinéticos e incluso como estructura de andamiaje para poner otros sustituyentes y conferir actividades específicas adicionales (166) en diversos fármacos como catalizadores, pesticidas, antioxidantes, bactericidas, analgésicos, anestésicos, antidepresivos, supresores del apetito, agentes antitumorales, antibióticos, antifúngicos, y otros agentes fisiológicamente activos (167).

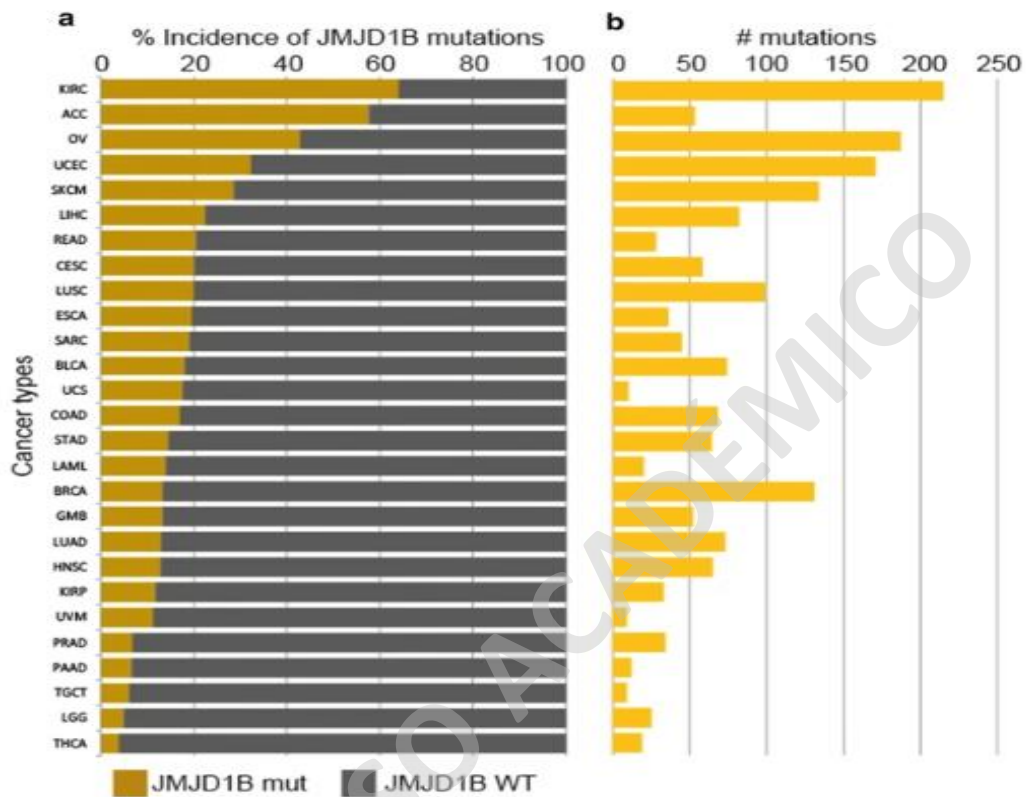
Por su parte, cuando existe una deficiencia de esta desmetilasa se genera síndrome mielodisplásico (56), leucemia mieloide (46) y cáncer colonrectal (168). En función de aquello, generar una terapia génica con un switch o interruptor que permita inducir la presencia de mayor cantidad de proteína sin generar un desbalance que nos lleve al otro extremo. Incluso, en un estudio publicado en 2015 se inyectó el gen del factor IX en 10 individuos con hemofilia tipo B mediante la utilización de un vector autocomplementario del serotipo 8 del virus adenoasociado (AAV8), a los cuales se les evaluó la presencia de esta proteína en la sangre. Los resultados fueron una disminución del 90% de los episodios hemorrágicos, además de una reducción igualmente drástica de la necesidad del factor IX inyectado. Este efecto perduró durante tres años. Cabe destacar que, esta inyección del factor IX sólo compuso la concentración de esta proteína al 5% de su valor normal (169).

En función de aquello, se podría utilizar la ribozima T3H38 diseñada por Guocai Zhong, et al en el 2019, para su fusión con el gen de JMJD1B en una construcción que estará contenida en un adenovirus asociado (AAV). Esta ribozima se autoescinde generando el truncamiento del mensajero, quien posteriormente se degrada evitando así su expresión (**Figura 40**). Resultando en el switch 'apagado'. Mientras que en presencia de un morfolino, esta proteína sería capaz de expresarse dado que este se une al sitio activo de la ribozima (sitio de autoescisión), permitiendo así la generación del mensajero y por ende de la proteína de interés, en este caso la desmetilasa JMJD1B (**Figura 41**) (166). De la misma manera, la estrategia a utilizar se encuentra representada en la **Figura 42**.

Adicionalmente, la relevancia de la ribozima tipo III generada por Guocai Zhong, et al radica en que aceleró el desmontaje de esta enzima sin ir en detrimento de la eficiencia de escisión, lo que permite prevenir la religación y por ende aumenta la eficiencia de inhibición de la expresión de la proteína en cuestión (166). Por otro lado, los morfolinós muestran una mejor eficiencia a menores concentraciones y una alta especificidad a mayores concentraciones para la inhibición de la ribozima (170).

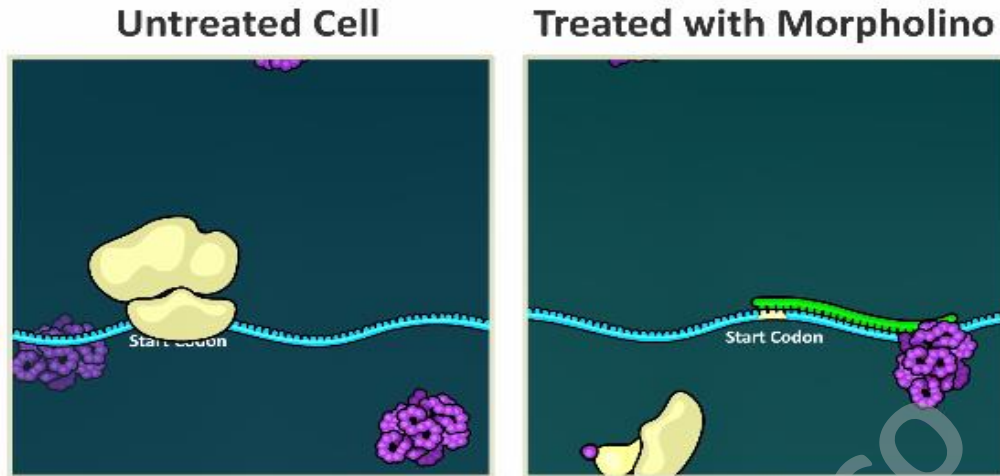
Por otro lado, a pesar de que los datos de las PTMs no fueran concluyentes dada la dispersión de los datos, particularmente de aquellas células WT, sin lugar a dudas es algo que se volverá a analizar para así evaluar el impacto de JMJD1B en ellas. No obstante, esto podría realizarse con células sincrónicas para lograr no sólo deshacerse de la gran dispersión de datos, sino que también lograr compararlas en un mismo momento metabólico. De manera similar, se debería analizar y estudiar el motivo detrás del rápido crecimiento celular por parte de las células KO de JMJD1B. Lo anterior,

para comprender si aquellos procesos alterados detrás de la mayor proliferación celular se relacionan con aquellos que propician la génesis del cáncer cuando esta desmetilasa es deficiente.



**Figura 38: Correlación entre mutaciones del gen JMJD1B con una alta incidencia de cáncer e inestabilidad genómica. (a)** Se muestra la incidencia de mutaciones JMJD1B entre pacientes con diferentes tipos de cáncer. Las mutaciones incluyen mutaciones puntuales e inserciones/delecciones. **(b)** Se muestra el número total de mutaciones encontradas por cada tipo de cáncer en el gen JMJD1B. Los datos de Affymetrix se obtuvieron del portal de datos de cáncer de los NIH (25).





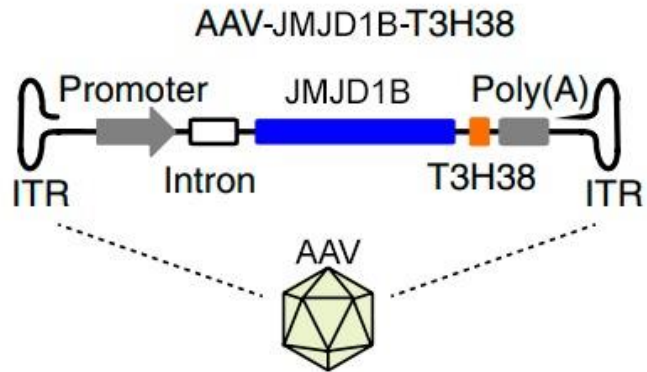
**Figura 39: Esquema de la traducción con y sin morfolinis.** Se muestra a la izquierda una célula sin morfolinis en la que se produce el ensamble del ribosoma, por lo que la traducción tiene lugar. Mientras que a la derecha, en una célula tratada con morfolinis (en verde), este se une a la región codificante impidiendo el ensamble del ribosoma, por lo que este se suelta y la traducción no tiene lugar (164).



**Figura 40: Esquema representativo de la inactivación génica mediada por la ribozima.** HHR corresponde a la ribozima con cabeza de martillo (Hammer Head Ribozyme) en amarillo (166).



**Figura 41: Esquema representativo de la inactivación de la ribozima mediada por oligos de morfolinis.** La ribozima se muestra en color amarillo y los morfolinis en azul (166).



**Figura 42: Esquema representativo del vector contenido en el AAV.** Se muestra el vector que contendría el gen de JMJD1B y la ribozima para la terapia génica en caso de deficiencia de esta desmetilasa (166).

SOLO USO ACADÉMICO

## 8-. REFERENCIAS.

1. Discovering new cell types one at a time | Bio 2.0 | Learn Science at Scitable [Internet]. [cited 2022 Feb 28]. Available from: [https://www.nature.com/scitable/blog/bio2.0/discovering\\_new\\_cell\\_types\\_one/](https://www.nature.com/scitable/blog/bio2.0/discovering_new_cell_types_one/)
2. Escobar TM, Oksuz O, Saldaña-Meyer R, Descostes N, Bonasio R, Reinberg D. Active and Repressed Chromatin Domains Exhibit Distinct Nucleosome Segregation during DNA Replication. *Cell*. 2019 Oct 31;179(4):953-963.e11.
3. Bhasin M, Reinherz EL, Reche PA. Recognition and Classification of Histones Using Support Vector Machine. <https://home.liebertpub.com/cmb> [Internet]. 2006 Feb 10 [cited 2022 Feb 28];13(1):102–12. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/cmb.2006.13.102>
4. Histonas - info-farmacia [Internet]. [cited 2022 Feb 28]. Available from: <http://www.info-farmacia.com/bioquimica/histonas>
5. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Apr 1;13(2):127–35.
6. Markert J, Luger K. Nucleosomes Meet Their Remodeler Match. *Trends Biochem Sci*. 2021 Jan 1;46(1):41–50.
7. Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A, Almouzni G. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol Cell* [Internet]. 2006 Oct 20 [cited 2022 Mar 9];24(2):309–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17052464/>
8. Hammond CM, Strømme CB, Huang H, Patel DJ, Groth A. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Feb 27];18(3):141–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053344/>
9. Prado F, Aguilera A. Partial Depletion of Histone H4 Increases Homologous Recombination-Mediated Genetic Instability. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2022 Feb 28];25(4):1526. Available from: </pmc/articles/PMC548009/>
10. Singh RK, Liang D, Gajjalaiahvari UR, Kabbaj MHM, Paik J, Gunjan A. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle* [Internet]. 2010 Oct 15 [cited 2022

Feb 28];9(20):4236. Available from: /pmc/articles/PMC3055206/

11. Definition of genomic instability - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2022 Feb 28]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/genomic-instability>
12. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* [Internet]. 2017;168(4):644–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867417300053#bib24>
13. Talking Glossary of Genetic Terms | NHGRI [Internet]. [cited 2022 Feb 28]. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ciclo-celular>.
14. Wang J, Lindahl T. Maintenance of Genome Stability. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Jun 23];14(3):119. Available from: /pmc/articles/PMC4936602/
15. Benjamin Schuster-Böckler & Ben Lehner. Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;488:504–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11273>.
16. Thompson LL, Guppy BJ, Sawchuk L, Davie JR, McManus KJ. Regulation of chromatin structure via histone post-translational modification and the link to carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2013 323 [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2022 Jun 23];32(3):363–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-013-9434-8>
17. Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 2013 203 [Internet]. 2013 Mar 5 [cited 2022 Jun 23];20(3):259–66. Available from: <https://www.nature.com/articles/nsmb.2470>
18. Mishra LN, Pepenella S, Rogge R, Hansen JC, Hayes JJ. Acetylation Mimics Within a Single Nucleosome Alter Local DNA Accessibility In Compacted Nucleosome Arrays. *Sci Reports* 2016 61 [Internet]. 2016 Oct 6 [cited 2022 Jun 23];6(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep34808>
19. McGrath J, Trojer P. Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacol Ther*. 2015 Jun 1;150:1–22.

20. A. Zweidler, G.S. Gein, J.L. Stein WFM. Core histone variants of the mouse: primary structure and differential expression. 1984;339–71.
21. Loyola A, Almouzni G. Marking histone H3 variants: How, when and why? Trends Biochem Sci. 2007 Sep;32(9):425–33.
22. Campos EI, Fillingham J, Li G, Zheng H, Voigt P, Kuo WHW, et al. The Program for Processing Newly-synthesized Histones H3.1 and H4. Nat Struct Mol Biol [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Mar 9];17(11):1343. Available from: /pmc/articles/PMC2988979/
23. Alvarez F, Muñoz F, Schilcher P, Imhof A, Almouzni G, Loyola A. Sequential Establishment of Marks on Soluble Histones H3 and H4. J Biol Chem [Internet]. 2011 May 20 [cited 2022 Mar 1];286(20):17714. Available from: /pmc/articles/PMC3093847/
24. Saavedra F, Rivera C, Rivas E, Merino P, Garrido D, Hernández S, et al. PP32 and SET/TAF-I $\beta$  proteins regulate the acetylation of newly synthesized histone H4. Nucleic Acids Res [Internet]. 2017 Nov 16 [cited 2022 Mar 1];45(20):11700–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28977641/>
25. Saavedra F. La desmetilasa JMJD1B es necesaria para el correcto procesamiento citosólico de las histonas H3 y H4 y para su suministro al interior del núcleo. Universidad Andrés Bello; 2018.
26. Stillman B. Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression. Cell [Internet]. 2018 Sep 20 [cited 2022 Mar 1];175(1):6–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30217360/>
27. El código de las histonas: un lenguaje genético más allá del ADN - Genotipia [Internet]. [cited 2022 Mar 8]. Available from: <https://genotipia.com/el-codigo-de-las-histonas-un-lenguaje-genetico-mas-alla-del-adn/>
28. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana [Internet]. [cited 2022 Mar 8]. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-72732012000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732012000100006)
29. Rivera C, Saavedra F, Alvarez F, Díaz-Celis C, Ugalde V, Li J, et al. Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. Nucleic Acids Res [Internet]. 2015 Oct 30 [cited 2022 Mar 7];43(19):9097. Available from: /pmc/articles/PMC4627087/

30. Jasencakova Z, Groth A. Restoring chromatin after replication: how new and old histone marks come together. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 7];21(2):231–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19815085/>
31. Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, Roche D, Quivy JP, Imhof A, et al. The HP1 $\alpha$ -CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* [Internet]. 2009 [cited 2022 Mar 7];10(7):769. Available from: </pmc/articles/PMC2727428/>
32. Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, et al. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Jan 6 [cited 2022 Mar 9];281(1):559–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16267050/>
33. Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):285–91.
34. Brauchle M, Yao Z, Arora R, Thigale S, Clay I, Inverardi B, et al. Protein Complex Interactor Analysis and Differential Activity of KDM3 Subfamily Members Towards H3K9 Methylation. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 11 [cited 2022 Mar 10];8(4). Available from: </pmc/articles/PMC3623819/>
35. Sui Y, Gu R, Janknecht R. Crucial Functions of the JMJD1/KDM3 Epigenetic Regulators in Cancer. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Mar 10];19(1):3. Available from: </pmc/articles/PMC7772267/>
36. Mozzetta C, Boyarchuk E, Pontis J, Ait-Si-Ali S. Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2022 Mar 14];16(8):499–513. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26204160/>
37. Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Mar 14];13(5):297–311. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22473470/>
38. Li S, Ali S, Duan X, Liu S, Du J, Liu C, et al. JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Rep* [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2022 Mar 14];23(2):389. Available from:

/pmc/articles/PMC5933860/

39. Kuroki S, Nakai Y, Maeda R, Okashita N, Akiyoshi M, Yamaguchi Y, et al. Combined Loss of JMJD1A and JMJD1B Reveals Critical Roles for H3K9 Demethylation in the Maintenance of Embryonic Stem Cells and Early Embryogenesis. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2022 Mar 10];10(4):1340. Available from: /pmc/articles/PMC5998703/
40. ¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [cited 2022 Mar 16]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
41. Alexandrov LB, Stratton MR. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 2014 Feb 1;24(1):52–60.
42. Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* [Internet]. 2007 Feb 23 [cited 2022 Mar 17];128(4):787–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17320514/>
43. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, et al. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* [Internet]. 2008 Jul 25 [cited 2022 Mar 17];31(2):167–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657500/>
44. Peterson CL, Côté J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2022 Mar 17];18(6):602–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15075289/>
45. Li J, Yu B, Deng P, Cheng Y, Yu Y, Kevork K, et al. KDM3 epigenetically controls tumorigenic potentials of human colorectal cancer stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat Commun* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 24];8. Available from: /pmc/articles/PMC5414094/
46. Hu Z, Gomes I, Horrigan SK, Kravarusic J, Mar B, Arbieva Z, et al. A novel nuclear protein, 5qNCA (LOC51780) is a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on chromosome 5 band q31. *Oncogene* [Internet]. 2001 Oct 18 [cited 2022 Jun 24];20(47):6946–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687974/>
47. Xu X, Nagel S, Quentmeier H, Wang Z, Pommerenke C, Dirks WG, et al. KDM3B shows tumor-suppressive activity and transcriptionally regulates HOXA1 through retinoic acid

- response elements in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2022 Jun 24];59(1):204–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28540746/>
48. An MJ, Kim DH, Kim CH, Kim M, Rhee S, Seo SB, et al. Histone demethylase KDM3B regulates the transcriptional network of cell-cycle genes in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2022 Mar 18];508(2):576–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30514438/>
49. Saraç H, Morova T, Pires E, McCullagh J, Kaplan A, Cingöz A, et al. Systematic characterization of chromatin modifying enzymes identifies KDM3B as a critical regulator in castration resistant prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2020 Mar 5 [cited 2022 Mar 18];39(10):2187–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31822799/>
50. Definición de diferenciación celular - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. [cited 2022 Nov 13]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/diferenciacion-celular>
51. Cloos PAC, Christensen J, Agger K, Helin K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2022 Nov 13];22(9):1115–40. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/22/9/1115.full>
52. Kuroki S, Maeda R, Yano M, Kitano S, Miyachi H, Fukuda M, et al. H3K9 Demethylases JMJD1A and JMJD1B Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline. *Stem Cell Reports*. 2020 Aug 11;15(2):424–38.
53. Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, Ng HH. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2022 Nov 13];21(20):2545–57. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/21/20/2545.full>
54. Lockman K, Taylor JM, Mack CP. The histone demethylase, Jmjd1a, interacts with the myocardin factors to regulate SMC differentiation marker gene expression. *Circ Res* [Internet]. 2007 Dec 7 [cited 2022 Nov 13];101(12). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.107.164178>



55. Saavedra F, Gurard-Levin ZA, Rojas-Villalobos C, Vassias I, Quatrini R, Almouzni G, et al. JMJD1B, a novel player in histone H3 and H4 processing to ensure genome stability. *Epigenetics and Chromatin* [Internet]. 2020;13(1):1–15. Available from: <https://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13072-020-00331-1>
56. Wang X, Fan H, Xu C, Jiang G, Wang H, Zhang J. KDM3B suppresses APL progression by restricting chromatin accessibility and facilitating the ATRA-mediated degradation of PML/RAR $\alpha$ . *Cancer Cell Int* [Internet]. 2019 Oct 4 [cited 2022 Jun 24];19(1). Available from: </pmc/articles/PMC6778369/>
57. Leucemia mieloide aguda (LMA) - Hematología y oncología - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2022 Jun 24]. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-cl/professional/hematología-y-oncología/leucemias/leucemia-mieloide-aguda-lma>
58. Aso T, Shilatifard A, Conaway JW, Conaway RC. Transcription syndromes and the role of RNA polymerase II general transcription factors in human disease. *J Clin Invest* [Internet]. 1996 Apr 1 [cited 2022 Mar 10];97(7):1561. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507218/>
59. Zoghbi HY. MeCP2 dysfunction in humans and mice. *J Child Neurol* [Internet]. 2005 [cited 2022 Mar 10];20(9):736–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16225828/>
60. Biggar KK, Li SSC. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014 161 [Internet]. 2014 Dec 10 [cited 2022 Jun 21];16(1):5–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3915>
61. Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2022 Jul 3];271(17):3459–69. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.2004.04266.x>
62. McAnena P, Brown JAL, Kerin MJ. Circulating Nucleosomes and Nucleosome Modifications as Biomarkers in Cancer. *Cancers* 2017, Vol 9, Page 5 [Internet]. 2017 Jan 8 [cited 2022 Jul 3];9(1):5. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/9/1/5/htm>

63. Park YS, Jin MY, Kim YJ, Yook JH, Kim BS, Jang SJ. The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 Jul 3];15(7):1968–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18470569/>
64. Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, Matsumoto A, Higashi S, Kimura H, et al. Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. *Cancer Sci* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2022 Jul 3];104(7):889–95. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cas.12166>
65. Nakazawa T, Kondo T, Ma D, Niu D, Mochizuki K, Kawasaki T, et al. Global histone modification of histone H3 in colorectal cancer and its precursor lesions. *Hum Pathol*. 2012 Jun 1;43(6):834–42.
66. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693–705.
67. Morten BC, Scott RJ, Avery-Kiejda KA. Comparison of Three Different Methods for Determining Cell Proliferation in Breast Cancer Cell Lines. *J Vis Exp* [Internet]. 2016 Sep 3 [cited 2022 May 26];2016(115):54350. Available from: </pmc/articles/PMC5091975/>
68. Sharma A, Kumar G, Sharma S, Walia K, Chouhan P, Mandal B, et al. Methods for binding analysis of small GTP-binding proteins with their effectors. *Methods Cell Biol*. 2021 Jan 1;166:235–50.
69. Protein-Protein Interaction - Berthold Technologies GmbH & Co.KG [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/applications/protein-protein-interaction/>
70. Ensayo de complementación de proteínas-fragmento - Copro, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: [https://copro.com.ar/Ensayo\\_de\\_complementacion\\_de\\_proteinas-fragmento.html](https://copro.com.ar/Ensayo_de_complementacion_de_proteinas-fragmento.html)
71. Visualización de fagos - frwiki.wiki [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: [https://es.frwiki.wiki/wiki/Phage\\_display](https://es.frwiki.wiki/wiki/Phage_display)
72. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from:

- <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/cristalografia-de-rayos-x>
73. Unidad de Resonancia Magnética Nuclear [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: <https://www.scai.uma.es/areas/aqcm/rmn/rmn.html>
  74. Cromatografía por afinidad – Cienciadelux [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: <https://cienciadelux.com/2015/08/16/cromatografia-por-afinidad/>
  75. Microarreglo de proteínas Motivación para el desarrolloHaciendo la matriz [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: [https://hmong.es/wiki/Protein\\_microarray](https://hmong.es/wiki/Protein_microarray)
  76. Co-Immunoprecipitation (Co-IP) | Thermo Fisher Scientific - CL [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>
  77. Purificación por afinidad en tándem Etiquetas variantesyHistoria [Internet]. [cited 2022 May 11]. Available from: [https://hmong.es/wiki/Tandem\\_affinity\\_purification](https://hmong.es/wiki/Tandem_affinity_purification)
  78. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nat* 2000 4056788 [Internet]. 2000 Jun 15 [cited 2022 May 16];405(6788):837–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/35015709>
  79. Liu Y, Wang M, Xi J, Luo F, Li A. PTM-ssMP: A web server for predicting different types of post-translational modification sites using novel site-specific modification profile. *Int J Biol Sci*. 2018 May 22;14(8):946–56.
  80. (PDF) Modificaciones postraduccionales: Métodos de estudio y enfermedades asociadas | Rebeca Pacheco López - Academia.edu [Internet]. [cited 2022 May 16]. Available from: [https://www.academia.edu/43738809/Modificaciones\\_postraduccionales\\_Métodos\\_de\\_estudio\\_y\\_enfermedades\\_asociadas](https://www.academia.edu/43738809/Modificaciones_postraduccionales_Métodos_de_estudio_y_enfermedades_asociadas)
  81. Dignani JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1983 Mar 3 [cited 2022 Jun 3];11(5):1475. Available from: </pmc/articles/PMC325809/?report=abstract>
  82. Cell Counting Kit - 8 for quantitation of viable cell number in proliferation and cytotoxicity

- assays | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from:  
<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sigma/96992>
83. LIF Recombinant Mouse Protein, embryonic stem cell-qualified [Internet]. [cited 2022 Jun 3]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A35934>
84. Lif - Leukemia inhibitory factor precursor - Mus musculus (Mouse) - Lif gene & protein [Internet]. [cited 2022 Jun 3]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P09056>
85. Sci-Hub | Stem Cells and Tissue Repair. Methods in Molecular Biology | 10.1007/978-1-0716-0655-1 [Internet]. [cited 2022 Jun 3]. Available from: <https://sci-hub.se/10.1007/978-1-0716-0655-1>
86. Arias ME, Felmer R. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. Arch Med Vet [Internet]. 2009 [cited 2022 Jun 3];41(3):185–95. Available from:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2009000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2009000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
87. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation - PubMed [Internet]. [cited 2022 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10368935/>
88. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nat 1981 2925819 [Internet]. 1981 [cited 2022 Jun 3];292(5819):154–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/292154a0>
89. Polr2a - DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08775/entry>
90. Pcbp2 - Poly(rC)-binding protein 2 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q61990/entry>
91. Upp2 - Uridine phosphorylase 2 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8CGR7/entry>

92. Arg1 - Arginase-1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q61176/entry>
93. Las1l - Ribosomal biogenesis protein LAS1L - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A2BE28/entry>
94. Eif4g1 - Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6NZJ6/entry>
95. Eif3c - Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8R1B4/entry>
96. Flna - Filamin-A - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8BTM8/entry>
97. Psma3 - Proteasome subunit alpha type-3 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O70435/entry>
98. Vars1 - Valine--tRNA ligase - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Z1Q9/entry>
99. Sf3b1 - Splicing factor 3B subunit 1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q99NB9/entry>
100. C1qb - Complement C1q subcomponent subunit B - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P14106/entry>
101. Vcp - Transitional endoplasmic reticulum ATPase - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q01853/entry>
102. Pelp1 - Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 - Mus musculus (Mouse) |

- UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9DBD5/entry>
103. Mdn1 - Midasin - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A2ANY6/entry>
104. Cad - CAD protein - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/B2RQC6/entry>
105. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q920B9/entry>
106. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P28665/entry>
107. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P60229/entry>
108. Cct2 - T-complex protein 1 subunit beta - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80314/entry>
109. UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8K0E8/entry>
110. Quantitative proteomics: label-free quantitation of proteins - Ashok R. Dinsarapu Ph.D [Internet]. [cited 2022 Jul 27]. Available from:  
<https://adinsarapu.github.io/posts/2018/04/blog-post-lfq/>
111. Cao X. No Title [Internet]. Re: What is the difference between LFQ intensity and plain intensity? 2018. Available from:  
[https://www.researchgate.net/post/What\\_is\\_the\\_difference\\_between\\_LFQ\\_intensity\\_and\\_plain\\_intensity/5a67f609eeae390cbf765a16/citation/download](https://www.researchgate.net/post/What_is_the_difference_between_LFQ_intensity_and_plain_intensity/5a67f609eeae390cbf765a16/citation/download)
112. Otud4 - OTU domain-containing protein 4 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/B2RRE7/entry>
113. Rpl38 - 60S ribosomal protein L38 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt

- [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9JJI8/entry>
114. C3 - Complement C3 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P01027/entry>
  115. Sub1 - Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11031/entry>
  116. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q62167/entry>
  117. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P46471/entry>
  118. Cct7 - T-complex protein 1 subunit eta - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80313/entry>
  119. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8VCM7/entry>
  120. A2m - Alpha-2-macroglobulin-P - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6GQT1/entry>
  121. Ccar1 - Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8CH18/entry>
  122. Psm2 - 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8VDM4/entry>
  123. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q99J09/entry>
  124. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from:  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6ZQ08/entry>

125. Eif3a - Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P23116/entry>
126. Hal - Histidine ammonia-lyase - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35492/entry>
127. UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6P5F9/entry>
128. UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6ZQ38/entry>
129. UniProt [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q91VJ4/entry>
130. Ontologías y su importancia en la biología [Internet]. 2018. Available from: <https://bioinfo2.ugr.es/biocomputacion/wp-content/uploads/2018/11/Ontologías.pdf>
131. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, Mushayahama T, Albou LP, Mi H. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci.* 2022 Jan 1;31(1):8–22.
132. Thomas PD. PANTHER Classification System [Internet]. Available from: <http://pantherdb.org/about.jsp>
133. Zheng M, Wang Y, Liu X, Sol J, Yun Long W, Xu Y, et al. The RICE MINUTE-LIKE1 (RML1) gene, encoding a ribosomal large subunit protein L3B, regulates leaf morphology and plant architecture in rice. *J Exp Bot* [Internet]. 2016;67(11):3457–3469. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article/67/11/3457/2197692?login=false>
134. Alvarez F, Muñoz F, Schilcher P, Imhof A, Almouzni G, Loyola A. Sequential Establishment of Marks on Soluble Histones H3 and H4. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 May 20 [cited 2022 Mar 7];286(20):17714. Available from: </pmc/articles/PMC3093847/>
135. Li S, Ali S, Duan X, Liu S, Du J, Liu C, et al. JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Rep* [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2022 Mar 10];23(2):389. Available from: </pmc/articles/PMC5933860/>



136. MEDCICLOPEDIA: DICCIONARIO ILUSTRADO DE TÉRMINOS MÉDICOS [Internet]. [cited 2022 Jul 18]. Available from: <https://www.iqb.es/diccio/c/celulas.htm>
137. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nat* 1988 336:6200 [Internet]. 1988 [cited 2022 Jun 28];336(6200):688–90. Available from: <https://www.nature.com/articles/336688a0>
138. Shen MM, Leder P. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992 [cited 2022 Jun 28];89(17):8240–4. Available from: <https://www.pnas.org>
139. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Jan 1;7(6):862–9.
140. Höpfl G, Gassmann M, Desbaillets I. Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2004 [cited 2022 Jun 28];254:79–98. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-741-6:079>
141. Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abé SI, et al. Endoderm-Specific Gene Expression in Embryonic Stem Cells Differentiated to Embryoid Bodies. *Exp Cell Res*. 1996 Nov 25;229(1):27–34.
142. Magyar JP, Nemir M, Ehler E, Suter N, Perriard JC, Eppenberger HM. Mass Production of Embryoid Bodies in Microbeads. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2022 Jun 28];944(1):135–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03828.x>
143. Conley BJ, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr 1;36(4):555–67.
144. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2007 May 1;103(5):389–98.
145. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Z2U1/entry>
146. Sharda A, Amnekar R V., Natu A, Sukanya, Gupta S. Histone posttranslational modifications:

- Potential role in diagnosis, prognosis, and therapeutics of cancer. *Progn Epigenetics*. 2019;351–73.
147. Turner BM. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Feb 20;12(2):110–2.
148. Roh TY, Cuddapah S, Cui K, Zhao K. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Oct 24 [cited 2022 Jun 30];103(43):15782–7. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607617103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607617103)
149. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):169–81.
150. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* [Internet]. 2007 May 18 [cited 2022 Jun 30];129(4):823–37. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867407006009/fulltext>
151. Stefanowicz D, Lee JY, Lee K, Shaheen F, Koo HK, Booth S, et al. Elevated H3K18 acetylation in airway epithelial cells of asthmatic subjects. *Respir Res* [Internet]. 2015 Aug 5 [cited 2022 Jul 2];16(1):1–13. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12931-015-0254-y>
152. Farooq Z, Banday S, Pandita TK, Altaf M. The many faces of histone H3K79 methylation. *Mutat Res Mutat Res*. 2016 Apr 1;768:46–52.
153. Tjalsma SJD, Hori M, Sato Y, Bousard A, Ohi A, Raposo AC, et al. H4K20me1 and H3K27me3 are concurrently loaded onto the inactive X chromosome but dispensable for inducing gene silencing. *EMBO Rep* [Internet]. 2021 Mar 3 [cited 2022 Aug 1];22(3):e51989. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.15252/embr.202051989>
154. Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A, Almouzni G. PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol Cell*. 2006 Oct 20;24(2):309–16.
155. Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Ichi, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, et al. JHDM2A, a JmjC-Containing H3K9 Demethylase, Facilitates Transcription Activation by Androgen Receptor. *Cell*. 2006 May 5;125(3):483–95.

156. Baxter E, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell Biosci* [Internet]. 2014 Aug 19 [cited 2022 Jul 19];4(1):1–11. Available from: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-3701-4-45>
157. Ma L, Yuan L, An J, Barton MC, Zhang Q, Liu Z. Histone H3 lysine 23 acetylation is associated with oncogene TRIM24 expression and a poor prognosis in breast cancer. *Tumor Biol* 2016 3711 [Internet]. 2016 Sep 16 [cited 2022 Jul 19];37(11):14803–12. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5344-z>
158. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* [Internet]. 2008 Nov 11 [cited 2022 Jul 19];32(4):503. Available from: </pmc/articles/PMC3641558/>
159. Ngollo M, Lebert A, Dagdemir A, Judes G, Karsli-Ceppioglu S, Daures M, et al. The association between Histone 3 Lysine 27 Trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters. *BMC Cancer* 2014 141 [Internet]. 2014 Dec 23 [cited 2022 Jul 19];14(1):1–15. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2407-14-994>
160. Alderton GK. Histone methylation: it's in the numbers. *Nat Rev Cancer* 2015 151 [Internet]. 2014 Dec 23 [cited 2022 Jul 19];15(1):1–1. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3883>
161. Saraç H, Morova T, Pires E, McCullagh J, Kaplan A, Cingöz A, et al. Systematic characterization of chromatin modifying enzymes identifies KDM3B as a critical regulator in castration resistant prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2020 Mar 5 [cited 2022 Nov 6];39(10):2187–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31822799/>
162. Tang M-HE, Varadan V, Kamalakaran S, Zhang MQ, Dimitrova N, Hicks J. Major Chromosomal Breakpoint Intervals in Breast Cancer Co-Localize with Differentially Methylated Regions. *Front Oncol*. 2012;0:197.
163. Qi L, Li L, Zhan C, Jiang M, Song D, Wu Y, et al. Comprehensive Analysis of Expression and Prognostic Value for JMJD5 and PKM2 in Stomach Adenocarcinoma. *Res Sq*. 2021;
164. What are Morpholinos - YouTube [Internet]. [cited 2022 Nov 7]. Available from: [https://www.youtube.com/watch?v=FHbKrOWOkww&ab\\_channel=GeneTools](https://www.youtube.com/watch?v=FHbKrOWOkww&ab_channel=GeneTools)

165. Arshad F, Khan MF, Akhtar W, Alam MM, Nainwal LM, Kaushik SK, et al. Revealing quinquennial anticancer journey of morpholine: A SAR based review. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Nov 4];167:324–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30776694/>
166. Zhong G, Wang H, He W, Li Y, Mou H, Tickner ZJ, et al. A reversible RNA on-switch that controls gene expression of AAV-delivered therapeutics in vivo. *Nat Biotechnol* 2019 382 [Internet]. 2019 Dec 23 [cited 2022 Nov 7];38(2):169–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0357-y>
167. Rupak K, Vulichi SR, Suman K. EMPHASIZING MORPHOLINE AND ITS DERIVATIVES (MAID): TYPICAL CANDIDATE OF PHARMACEUTICAL IMPORTANCE. *Int J Chem Sci* [Internet]. 2016 [cited 2022 Nov 4];14(3):1777–88. Available from: [www.sadgurupublications.com](http://www.sadgurupublications.com)
168. Liu Y, Zheng P, Liu Y, Ji T, Liu X, Yao S, et al. An epigenetic role for PRL-3 as a regulator of H3K9 methylation in colorectal cancer. *Gut* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Nov 6];62(4):571–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22345654/>
169. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Nov 11 [cited 2022 Nov 7];371(21):1994. Available from: </pmc/articles/PMC4278802/>
170. Kourounakis AP, Xanthopoulos D, Tzara A. Morpholine as a privileged structure: A review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Med Res Rev* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Nov 4];40(2):709–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.21634>

## 9-. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### 9.1 GO según PANTHER.

Mediante el sistema de clasificación PANTHER se realizaron los análisis de los genes enriquecidos tanto en el WT como en el KO de JMJD1B. Obteniéndose las Tablas suplementarias 1 y 2 presentadas a continuación, las que sólo muestran resultados con un valor p (p value) menor a 0,05.

**Tabla suplementaria 1: Ontología genética de KO de JMJD1B de función molecular.** En la primera columna se observa la ontología función molecular, en la segunda el número de genes perteneciente a la categoría en la segunda fila, la tercera fila el número de genes encontrados en la muestra de dicha categoría, el la cuarta la tasa esperada, en la quinta el enriquecimiento, en la sexta el p value y en la séptima la Tasa de falso descubrimiento.

	Mus musculus (REF)	Client Text Box Input (▼ Hierarchy NEW! ?)					
GO molecular function complete	#	# expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR	
<a href="#">brain-derived neurotrophic factor binding</a>	5	2	.00	> 100	+	9.08E-06	4.40E-02

**Tabla suplementaria 2: Ontología genética de KO de JMJD1B de componente celular.** En la primera columna se observa la ontología componente celular, en la segunda el número de genes perteneciente a la categoría en la segunda fila, la tercera fila el número de genes encontrados en la muestra de dicha categoría, el la cuarta la tasa esperada, en la quinta el enriquecimiento, en la sexta el p value y en la séptima la Tasa de falso descubrimiento.

	Mus musculus (REF)	Client Text Box Input ( Hierarchy.) NEW! ?)						
GO cellular component complete	#	# expected	Fold Enrichment	+/-	Δ raw P value	FDR		
<a href="#">CENP-A containing nucleosome</a>	10	2	.01	> 100	+	2.85E-05	5.81E-02	
<a href="#">CENP-A containing chromatin</a>	10	2	.01	> 100	+	2.85E-05	2.91E-02	
<a href="#">chromosome, centromeric core domain</a>	11	2	.01	> 100	+	3.37E-05	2.29E-02	
<a href="#">proteasome regulatory particle, base subcomplex</a>	12	2	.01	> 100	+	3.93E-05	2.00E-02	
<a href="#">cytosolic ribosome</a>	108	3	.07	40.74	+	5.43E-05	2.22E-02	
<a href="#">P granule</a>	20	2	.01	> 100	+	9.93E-05	3.38E-02	
<a href="#">germ plasm</a>	20	2	.01	> 100	+	9.93E-05	2.89E-02	
<a href="#">pole plasm</a>	20	2	.01	> 100	+	9.93E-05	2.53E-02	
<a href="#">proteasome regulatory particle</a>	23	2	.02	> 100	+	1.29E-04	2.92E-02	
<a href="#">intracellular non-membrane-bounded organelle</a>	4498	10	3.07	3.26	+	1.39E-04	2.83E-02	
<a href="#">non-membrane-bounded organelle</a>	4499	10	3.07	3.26	+	1.39E-04	2.58E-02	
<a href="#">proteasome accessory complex</a>	25	2	.02	> 100	+	1.51E-04	2.56E-02	
<a href="#">protein-containing complex</a>	5761	11	3.93	2.80	+	1.83E-04	2.87E-02	
<a href="#">ribosomal subunit</a>	195	3	.13	22.56	+	3.01E-04	4.39E-02	