



Universidad de Chile
Facultad de ciencias
Escuela de pregrado

“Interactómica de JMJD1B en extractos citosólicos de células HeLa y su rol en la maduración citosólica de las histonas H3 y H4”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

TATIANA ALEJANDRA CRUCES AYALA

Director del Seminario de Título:

Dra. María Alejandra Loyola Pedevila

Patrocinante:

Dr. Álvaro Alberto Glavic Maurer

Abril 2020

Santiago - Chile

BIOGRAFÍA



Nací el 5 de octubre de 1996 en la comuna de Santiago. Comencé a ir al jardín antes de lo presupuestado, pues mi hermano Franco, tan solo un año y medio mayor que yo, ya asistía, y con lo copiona que soy, yo también quería ir, así es que mis papás, Marisol y Alberto me llevaron. Estuve en el jardín “Naranjita” desde los 2 a los 5 años y aprendí a leer usando el silabario por mi cuenta. Mi enseñanza básica fue en el colegio “José Toribio Medina”, en donde estuve desde Kinder hasta 6to básico. Me caractericé por obtener siempre los primeros lugares académicos de mi curso, y participar en cuanto acto me solicitaban. Mi enseñanza media la viví en el “Liceo 1 Javiera Carrera”, donde estuve desde 7mo a 4to medio. Aquí fue donde me saqué mi primer rojo y aprendí a tolerar la frustración. El 2015 entré a la Universidad de Chile y además de enamorarme de mi carrera con el pasar de los años, conocí gente maravillosa con la que formamos un grupo de amigos muy bonito, “los cuprica”. Estoy agradecida de la vida por todo lo que he vivido hasta ahora y solo espero seguir creciendo como persona lo más feliz que se pueda.

DEDICATORIA

*A mis padres,
porque todo lo que soy
es gracias a ustedes.*

AGRADECIMIENTOS

A Francisco Saavedra por toda su paciencia, templanza y sabiduría, pues fue un guía fundamental en todo el proceso de este proyecto. A Claudia Espinoza por alegrarme con su característico humor cada día de experimentos y claramente por sus consejos para no cometer errores. A la Dra. Alejandra Loyola por aceptarme en su laboratorio y pese a estar en otro país, seguir atenta semana a semana cada avance que tenía, estando siempre disponible ante cualquier duda que me surgiera.

A Camila Stuardo por terminar de convencerme de entrar a esta carrera, la que hasta ahora ha sido la mejor decisión que he tomado en mi vida.

Agradecer también a Felipe, Paula, Enzo, Francisca, Natalie, Sebastián y Vicente, mi queridísimo grupo de amigos de la universidad, sin ellos, llegar hasta aquí hubiese sido mucho más difícil. Cada uno de ustedes hicieron que los días en esa universidad valieran la pena. Ese apañe que hubo como grupo creo que para todos fue fundamental y nos permitió llegar hasta último año sin reprobrar ningún ramo. Demás está decir que nuestra amistad no solo fue de estudio y se reflejó en muchas juntas, viajes y actividades entretenidas, los amo con mi vida. Quiero agradecer en especial a Felipe Muñoz que en este último tiempo ha sido un apoyo y compañía realmente importante.

Finalmente, mi familia. Quiero agradecer a mi hermano por su apoyo, y en especial a mis padres, Marisol y Alberto, los más importantes en esta lista, quienes han dado toda su vida por mí. Gracias por confiar en mí y darme todas las herramientas que han estado a su alcance para ser la mujer que soy. Me siento realmente afortunada de tener a unos padres como ustedes. Estaré eternamente agradecida de ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
MATERIALES	8
1. Reactivos	8
2. Buffers y soluciones	9
3. Anticuerpos	10
4. Kits comerciales	10
5. Equipos y Softwares	10
6. Otros	11
MÉTODOS	12
1. Sub-clonamiento	12
2. Sobre-expresión y purificación de JMJD1B-Flag	13
3. Ensayo SILAC	14
4. Ensayos de <i>pull down</i>	16

4.1 <i>Pull down</i> utilizando JMJD1B-Flag anclada a <i>beads</i> anti-Flag	17
4.1.1 Obtención del extracto citosólico de células HeLa (S100)	17
4.1.2 Cuantificación de proteínas	17
4.1.3 <i>Pull down</i> sobre extracto citosólico de células HeLa	18
4.2 <i>Pull down</i> utilizando <i>beads</i> de Níquel ancladas a tNASP-His	18
5. <i>Western blot</i>	19
RESULTADOS	21
1. Sub-clonamiento de JMJD1B-Flag en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21-DE3	21
2. Sobre-expresión y purificación de la proteína recombinante JMJD1B-Flag	27
3. Ensayos de <i>pull down</i>	28
4. Ensayo SILAC	30
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de $\text{Log}_2(\text{H/L})$ de reacción <i>Forward</i> (Valor Fw) y $\text{Log}_2(\text{L/H})$ de reacción <i>Reverse</i> (Valor Rv) para las proteínas interactuantes de JMJD1B	34
Tabla 2: Proteínas interactuantes de JMJD1B	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas.	3
Figura 2: Esquema lineal de los dominios de la desmetilasa JMJD1B humana y sus tres isoformas.	5
Figura 3: Mecanismo mediante el cual el dominio JmjC cataliza la desmetilación de una lisina.	5
Figura 4: Esquema que representa el ensayo de interactómica de JMJD1B.	15
Figura 5: Esquema ensayo de <i>pull down</i> .	19
Figura 6: Amplificación por PCR del fragmento JMJD1B-Flag.	22
Figura 7: Purificación del fragmento JMJD1B-Flag.	22
Figura 8: Digestión del plásmido pET28a con las enzimas XhoI y NcoI	23
Figura 9: Análisis del sub-clonamiento.	25
Figura 10: Blast de la secuencia de la colonia 1.	26
Figura 11: Inducción de la expresión de la proteína recombinante humana JMJD1B-Flag.	27
Figura 12: Inmunoprecipitación de JMJD1B-Flag.	28
Figura 13: Ensayo de <i>pull down</i> sobre extractos citosólicos de células HeLa.	29
Figura 14: Ensayo de <i>pull down</i> utilizando beads de Níquel.	30
Figura 15: Análisis ensayo SILAC.	32
Figura 16: Esquema resumen de la cantidad de proteínas encontradas.	33
Figura 17: Modelo propuesto del rol de JMJD1B en la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APS: Persulfato de amonio

BSA: Albúmina de suero bovino

DMEM: Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco

DTT: Ditioneitol

ECL: *Enhanced Chemi-Luminescence*

EDTA: Ácido etilen-di-amino-tetra-acético

FBS: Suero fetal bovino

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico

IP: Inmunoprecipitación

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: Luria Bertani

LS: *Low salt*

mA: miliamperio

min: minutos

NP-40: Sustituto de Nonidet P-40

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RIPA: *RadiolImmunoPrecipitation Assay Buffer*

s: segundos

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SILAC: *Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture*

TAE: Tris, Acetato y EDTA

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina

T-TBS: *Buffer* Tris Salino con Tween

Tween 20: Polisorbato 20

V: volts

RESUMEN

Las histonas, proteínas conocidas por compactar el ADN y formar la cromatina en células eucariontes, tienen además la función de regular procesos de expresión génica, debido a que son susceptibles a modificaciones post-traduccionales (PTMs) que regulan el nivel de interacción con el ADN y el reclutamiento de otros factores. Sin embargo, antes de ingresar al núcleo, y después de su síntesis, las histonas H3 y H4 son procesadas a través de una cascada de maduración citosólica. Dentro de este contexto, existe una desmetilasa de histonas, JMJD1B, cuyo rol en el citoplasma todavía no está claro, pero se ha observado que está relacionado con mantener una población de histonas solubles en el citoplasma listas para ser depositadas en la cromatina, y relacionado también con controlar los niveles citosólicos de una chaperona de histonas denominada tNASP. El *knockdown* de esta desmetilasa provoca la acumulación de H3 y tNASP en el citosol, además, la sobreexpresión de tNASP recapitula el fenotipo de la pérdida de función de JMJD1B. Pese a que el sustrato de esta enzima en el citoplasma sigue siendo desconocido, nosotros postulamos que podría ser tNASP. Para dilucidar esto, en este trabajo investigamos la interactómica de JMJD1B y estudiamos si existe una interacción física entre JMJD1B y tNASP.

Mediante ensayos de *pull down* analizados por *western blot*, comprobamos que JMJD1B interactúa con H3 y también encontramos una interacción con actina, pero no con tNASP. Mediante ensayos de *pull down* utilizando marcaje SILAC, analizados por espectrometría de masas, identificamos 9 proteínas interactuantes de JMJD1B, entre las que se encuentran chaperonas de proteínas varias y también chaperonas de histonas.

Futuros estudios debiesen enfocarse en investigar la interacción entre JMJD1B y Hsp90, debido a que esta última es una chaperona que estabiliza a tNASP y pudiese tener relación en controlar los niveles citosólicos de tNASP y en consecuencia de H3.

ABSTRACT

Histones are proteins known to compact DNA and participate in chromatin formation, but also, those proteins regulate gene expression processes because they are susceptible to post-translational modifications (PTMs) modifying the interaction with DNA and the recruitment of other factors. However, following their biosynthesis and before they go into the nucleus, histones H3 and H4 are processed through a cytosolic maturation cascade. In this context, the demethylase JMJD1B, whose cytoplasmic role is still unknown, maintains a soluble histone population in the cytoplasm for chromatin formation, and it also regulates the cytoplasmic levels of a chaperone called tNASP. The KD of this demethylase induces H3 and tNASP cytosolic accumulation. tNASP overexpression mimics the phenotype observed in the JMJD1B KD. Which are the substrates of this enzyme in cytoplasm is still unknown, we suggest that tNASP could be one of them.

In this work we investigated the JMJD1B interactome to identify potential substrates related to the newly synthesized histone H3 and H4 maturation cascade, and also we studied a physical interaction between JMJD1B and tNASP.

Using pull down assays followed by *western blot* analysis, we proved the interaction of JMJD1B with H3, and also found an interaction with actin, but not with tNASP. Using pull down assays coupled with SILAC labeling, followed by mass spectrometry analysis, we identified 9 proteins interacting with JMJD1B which included unspecific chaperones and histones chaperones.

Future studies should focus on JMJD1B and Hsp90 interaction, because this last one is a chaperone that stabilizes tNASP and may be involved in maintaining cytosolic levels of tNASP and H3.

INTRODUCCIÓN

En las células eucariontes el material genético está contenido en el núcleo, para lo cual se necesita su compactación. Aquí es donde cumplen un rol primordial las histonas, las cuales son proteínas que mediante interacciones electrostáticas no específicas, se unen al ADN (Luger y col., 1997), mediando su enrollamiento. A esta estructura, formada principalmente por ADN e histonas, pero que comprende además proteínas no-histónicas y otros factores, se le conoce como cromatina (Lee & Orr-Weaver, 2001). La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma, formado por 147 pares de bases de ADN que enrollan a un octámero de histonas constituido por dos copias de cada una de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4 (Ettig y col., 2011). Sin embargo, las histonas no sólo compactan el ADN, sino que también regulan procesos como replicación, reparación y expresión génica. Todo esto debido en parte a que son susceptibles a modificaciones post-traduccionales (PTMs, por sus siglas en inglés *Post-translational modifications*) (Chrun y col., 2017), tales como acetilación en residuos de lisinas, metilación en argininas y lisinas, y fosforilación de serinas y treoninas, entre otras (Kouzarides, 2007). Todas estas modificaciones son establecidas por enzimas específicas, por ejemplo, la enzima SetDB1 metila la lisina 9 de la histona H3 (Loyola y col., 2009), marca relacionada con la represión de la expresión génica, al ser reconocida por la proteína HP1, la cual se asocia a las histonas y contribuye a establecer dominios de cromatina altamente compactos, denominados dominios de heterocromatina, que son inaccesibles para la maquinaria transcripcional.

Si bien las PTMs de las histonas tienen una función bien estudiada cuando se encuentran ensambladas en la cromatina, conociéndose su dinámica de establecimiento y remoción, algunas de ellas no se establecen únicamente en un contexto nuclear, sino que también

en un contexto citosólico. Las histonas se sintetizan en el citoplasma durante la fase S del ciclo celular para garantizar el correcto suministro de nuevas histonas al ADN recientemente sintetizado. Estudios previos describieron una cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4 (Figura 1), que involucra 6 complejos: “Ia”, “Ib”, “II”, “III”, “IVa” y “IVb” (Campos y col., 2010; Álvarez y col., 2011). En concreto, antes de que la histona H3 se libere del ribosoma, la enzima SetDB1 metila la lisina 9 de esta (H3K9me1) (Rivera y col., 2015), marca que está presente en un 30% de histonas H3 solubles (Loyola y col., 2006). Inmediatamente después de su síntesis en ribosomas libres del citoplasma, las histonas H3 y H4 forman los complejos “Ia” y “Ib” respectivamente, interactuando con chaperonas de la familia *Heat Shock*. En el complejo “II”, las histonas H3 y H4 interactúan por primera vez entre sí en presencia de las chaperonas Hsp90 y tNASP, siendo esta última la isoforma testicular de la chaperona específica de histonas NASP (del inglés “Nuclear Autoantigenic Sperm Protein”). Luego, en el complejo “III” en presencia de Asf1a (del inglés Anti-Silencing Function 1, isoforma A) y sNASP (la isoforma somática de NASP) ocurre el establecimiento de la acetilación en los residuos de lisina 5 y 12 de la histona H4 (H4K5ac y H4K12ac, respectivamente), mediado por la enzima HAT1, marcas características de la histona H4 recientemente sintetizada (Sobel y col., 1995; Chang y col., 1997). Finalmente en los complejos IVa y IVb las histonas H3 y H4 se asocian con Importina-4 para ser translocadas al núcleo a través de los poros nucleares.

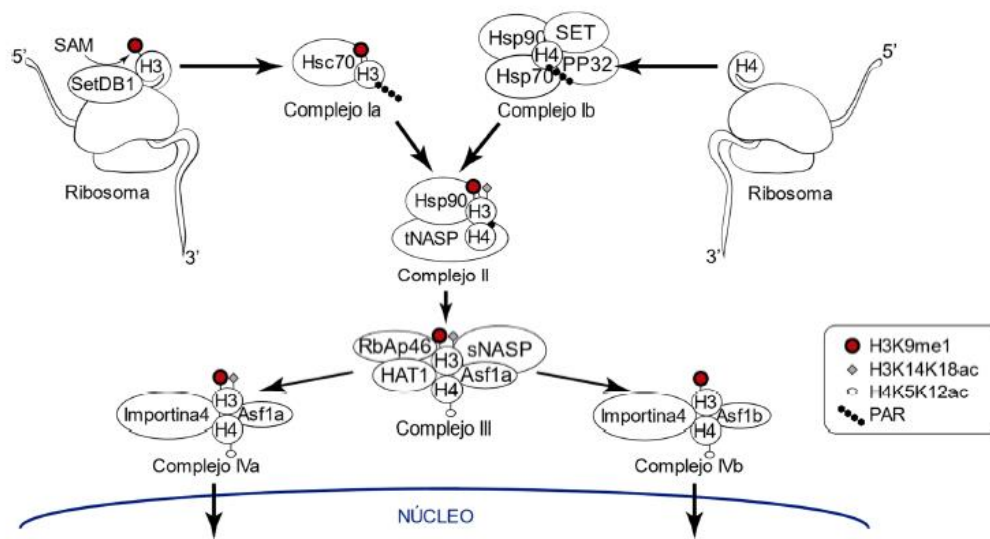


Figura 1: Esquema de la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas. Se observan los 6 complejos proteicos y las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Saavedra, 2018).

Si bien la cascada de maduración de las histonas H3 y H4 se encuentra bastante caracterizada, algunos aspectos de ella permanecen sin ser completamente entendidos. Por ejemplo, y tal como se mencionó previamente, aunque se sabe que la marca H3K9me1 se establece incluso antes de que la histona esté completamente sintetizada, no se conocen con certeza los mecanismos por los cuales sólo el 30% de la histona H3 citosólica, en cultivos celulares asincrónicos, la presentan. Una hipótesis es que alguna desmetilasa de histonas, aún desconocida, pudiera estar participando en algún punto de la cascada de maduración y regulando los niveles de la H3K9me1 tras su liberación de los ribosomas. Así, tras comenzar la evaluación de esta hipótesis, se logró observar que existe una población de la desmetilasa JMJD1B en el citosol, lo cual sugirió una posible función de esta en el procesamiento citosólico de las histonas.

JMJD1B es una desmetilasa de histonas que tiene actividad sobre la lisina 9 de la histona H3 mono y di-metilada (H3K9me1 y H3K9me2, respectivamente), además de una

recientemente descrita actividad sobre la di-metilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3me2s), (Li, y col., 2018). Esta enzima pertenece a la familia de proteínas que poseen un dominio JmjC, también denominado *Jumonji C*, lo cual da origen a su nombre. Este dominio cataliza la desmetilación de lisinas al poseer 2 histidinas que interactúan con Fe (II) (Cloos y col., 2008; Kim y col., 2012). Además cuenta con un motivo característico de factores transcripcionales y de proteínas que interactúan con receptores nucleares, compuesto por los residuos Leu-Xaa-Xaa-Leu-Leu (LXXLL) (Plevin y col., 2005). Otro motivo característico de esta desmetilasa es el dominio “*Zinc finger*” de tipo C4, el cual está presente en proteínas que interactúan con ADN (Schofield & Hausinger, 2015). Una última región característica de esta enzima es una rica en residuos de serina. (Figura 2).

Además de la isoforma 1 de esta proteína, que es la forma canónica, existen 2 isoformas más (Saraç y col., 2019). La isoforma 2 tiene truncada la región amino terminal, y presenta una variación en sus 5 primeros aminoácidos respecto a la forma canónica (aminoácidos 345 al 349), cambiando TFVPQ a MGAME (Figura 2). La isoforma 3 no posee los primeros 1002 aminoácidos, perdiendo la región rica en serina, pero conservando el dominio catalítico y el dominio “*Zinc finger*”, que son los dominios más importantes para la reacción de desmetilación (Saraç y col., 2019) (Figura 2).

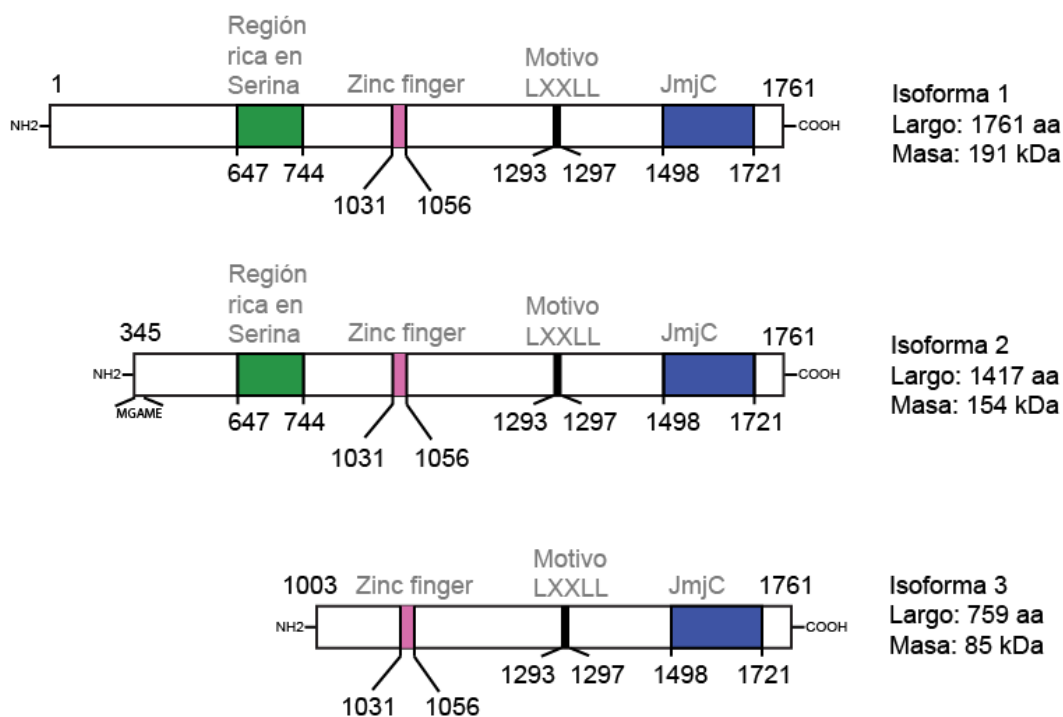


Figura 2: Esquema lineal de los dominios de la desmetilasa JMJD1B humana y sus tres isoformas.

El mecanismo por el cual esta enzima cataliza la reacción de desmetilación involucra los co-factores α -cetoglutarato y Fe (II) en una reacción de hidroxilación sobre el grupo metilo (Figura 3). De esta reacción se genera como intermediario una carbinolamina que espontáneamente se degrada al liberar formaldehído.

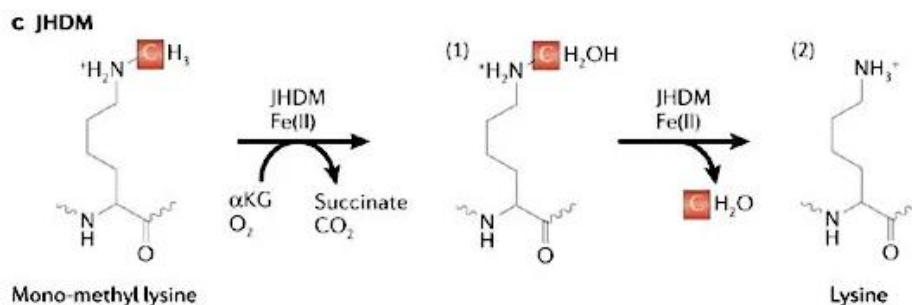


Figura 3: Mecanismo mediante el cual el dominio JmjC cataliza la desmetilación de una lisina. Se muestra el mecanismo químico de la reacción de desmetilación en donde una lisina mono-metilada, en presencia de una desmetilasa de tipo JmjC (JHDM) utilizando como co-factores Fe(II) y α -cetoglutarato (α KG), pierde la mono-metilación al liberar una molécula de formaldehído (Klose, 2006).

Tras evaluar los efectos de la pérdida de función de JMJD1B sobre el procesamiento de las histonas H3 y H4 citosólicas se observó que, contrario a lo esperado, los niveles de H3K9me1 no aumentaron, sino que disminuyeron, mientras que los niveles proteicos de H3 citosólica se elevaron (Saavedra y col., 2020). Estos resultados sugirieron que, si bien es probable que JMJD1B no tenga una actividad directa sobre la remoción de H3K9me1 en el citosol, existe una importancia en la función de JMJD1B para el correcto procesamiento de la histona H3 recientemente sintetizada. Interesantemente, otro efecto observado tras la pérdida de función de JMJD1B fue un incremento en los niveles de la chaperona tNASP, lo cual podría explicar en parte el incremento en los niveles de la histona H3 citosólica. Estudios anteriores han descrito que un aumento en los niveles citosólicos de la chaperona NASP produce la acumulación de los niveles proteicos de las histonas H3 y H4 debido a que las protege de la degradación proteica mediada por vías lisosomales. Así, se ha determinado que esta chaperona es la encargada de mantener una población de histonas solubles en el citoplasma listas para ser depositadas en la cromatina a medida que la célula las requiera. (Cook y col., 2011). Considerando que la pérdida de función de JMJD1B ocasiona la acumulación de tNASP y H3 en el citosol, que la sobreexpresión de tNASP por sí sola es suficiente para recapitular los efectos de la pérdida de función de JMJD1B (Cook y col., 2011; Saavedra y col., 2020), y que resultados preliminares no publicados del laboratorio de la Dra. Alejandra Loyola han sugerido que tNASP se encuentra metilada en determinados residuos de lisinas, ha surgido la hipótesis de la existencia de un eje de regulación JMJD1B-tNASP-H3 que pudiera estar determinando el procesamiento citosólico de la histona H3.

Dado todo lo anterior, en el presente trabajo estudiaremos la interactómica de JMJD1B y determinaremos si esta enzima tiene una interacción directa con tNASP, a modo de

aproximación para determinar si el eje JMJD1B-tNASP-H3 existe o si, de lo contrario, otras proteínas pudieran estar involucradas.

Hipótesis

- La desmetilasa JMJD1B cataliza la remoción de un grupo metilo de la chaperona de histonas tNASP y de esta forma regula la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4.

Objetivo General

- Determinar si la desmetilasa JMJD1B, interactúa físicamente con tNASP afectando su estado de metilación.

Objetivos Específicos

- Sub-clonar y purificar JMJD1B-Flag recombinante.
- Realizar ensayos de *pull down*, utilizando como sonda a JMJD1B-Flag, sobre extractos citosólicos de células HeLa, con un posterior análisis mediante *western blot*.
- Determinar la interactómica citosólica de JMJD1B-Flag a través de un *pull down* en extractos citosólicos de células HeLa con marcaje SILAC, con un posterior análisis mediante espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS.

MATERIALES

1. Reactivos

Acetato de Potasio (104820, Merck); Ácido Acético (AC-0030, Winkler); Acrilamida (A9099, Sigma Aldrich); Agarosa (50004, Lonza); APS (7727-54-0, Merck); Azul de bromofenol (AZ-0395, Winkler); Azul de Coomassie (BM-0270, Winkler); β -mercaptoetanol (444203, Calbiochem); *beads* de agarosa-proteína A (16-156, Merck); *beads* de agarosa anti-Flag (A2220, Sigma Aldrich); *beads* de agarosa conjugadas con Níquel (17-5268-01, GE Healthcare); Bis-acrilamida (15516024, Invitrogen); BSA liofilizada (A7906, Sigma Aldrich); Cloruro de Magnesio (105833, Merck); Cloruro de Potasio (104936, Merck); Cloruro de Sodio (106404, Sigma Aldrich); Desoxicolato de Sodio (D6750, Sigma-Aldrich); DTT (43815, Sigma-Aldrich); EDTA (15576-028, Invitrogen); Etanol (100983, Merck); Extracto de levadura (212750, BD Biosciences); Fosfato dipotásico (105104, Merck); Glicerol (BM-0800, Winkler); Glicina (104201 Sigma Aldrich); HEPES (54457, Sigma Aldrich); Imidazol (104716, Merck); IPTG (18500, US Biological); Leupeptina (1167, TOCRIS); Metanol (106009, Merck); NP-40 (BM-1225, Winkler); PMSF (36978, Thermo Scientific); Ponceau S (114275, Merck); Reactivo de Bradford (1856209, Thermo Scientific); SDS (sc-264510c, Santa Cruz); TCA (t9159, Sigma Aldrich); TEMED (110732, Merck); Triptona (211705, BD Biosciences); Tris base (108382, Merck); Tritón X-100 (9002-93-1, Sigma Aldrich); Tween 20 (BM-2031, Winkler).

2. Buffers y soluciones

Azul de Coomassie (0,2% Azul de Coomassie, 20% metanol, 5% Ácido Acético); BC50 (20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM Cloruro de Potasio, 10% Glicerol, 0,2 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoetanol, 0,2 mM PMSF); BC150 (20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM Cloruro de Potasio, 10% Glicerol, 0,2 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoetanol, 0,2 mM PMSF); *buffer* de corrida 10x (250 mM Tris base, 2 M Glicina, 1% SDS); *buffer* de elución (0,1 M Glicina (pH 2,5), 2 M Cloruro de Guanidinio); *buffer* de Laemmli 5x (0,3125 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 25% Glicerol, 0,01% Azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol); *buffer* de lavado (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM Cloruro de Sodio, 20 mM Imidazol, 0,01% NP-40, 0,2 mM PMSF, 15% glicerol); *buffer* de lisis bacteriana (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM Cloruro de Sodio, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100); *buffer* de lisis bacteriana 2 (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 500 mM Cloruro de Sodio, 20 mM Imidazol, 0,01% NP-40, 0,2 mM PMSF, 15% Glicerol); *buffer* de transferencia 1x (25 mM Tris base, 0,2 M Glicina, 0,1% SDS, 20% Metanol); *buffer* IP (50 mM Cloruro de Sodio, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0.05% Tritón X-100); *buffer* LS (20 mM HEPES-KOH (pH 7,8), 5 mM Acetato de Potasio, 0,5 mM Cloruro de Magnesio, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 μ g/ μ L Leupeptina); *buffer* para gel concentrador (0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS); *buffer* para gel separador (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS); *buffer* RIPA (20 mM Tris (pH 8), 150 mM Cloruro de Sodio, 1% NP-40 1% Desoxicolato de Sodio, 0,1% SDS, 1 mM EDTA); *buffer* TAE 1x (40 mM Tris base, 20 mM Ácido Acético, 1 mM EDTA); Medio DMEM suplementado (10% FBS, 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL Penicilina 100 μ g/mL Estreptomina); medio SOC (2% Triptona, 0,5% Extracto de levadura, 10 mM Cloruro de Sodio, 2,5 mM Cloruro de Potasio, 10 mM Cloruro de Magnesio, 20 mM Glucosa); placas de LB-agar (1% Cloruro de Sodio, 0,5% Extracto de levadura, 1% Triptona, 1,5%

Agar-agar); Rojo Ponceau (5% Ácido Acético, 0,1% Ponceau S); solución acrilamida-bis-acrilamida (30% Acrilamida, 0,8% Bis-acrilamida); solución de bloqueo (1% BSA liofilizada en T-TBS 1x); solución de desteñido (20% Metanol, 7.5% Ácido acético); Tripsina (0.025% en PBS 1x); T-TBS 10x (200 mM Tris H-Cl (pH 7,4), 1,5 M Cloruro de Sodio, 1% Tween 20).

3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Histona H3 (#Cat:ab7834, Abcam); anti- β -actina (#Cat:A5316, Sigma Aldrich); anti-NASP (#Cat:ab181169, Abcam); anti-JMJD1B (#Cat:2621S, Cell Signaling) y anti-Lisina monometilada (anti-Kme1)(#Cat:14679 Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano utilizados fueron: anti-rabbit IgG (#Cat:611-1302, Rockland Immunochemicals) y anti-mouse IgG (#Cat:610-1302, Rockland Immunochemicals). Estos se utilizaron en una dilución 1:5000 en T-TBS 1x.

4. Kits comerciales

E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit y E.Z.N.A.® Plasmid Midi Kit de Omega Bio-tek; sustrato de quimioluminiscencia para *western blot* Pierce® ECL (32106, Thermo Fisher Scientific) y SuperSignal® West Pico (34080, Thermo Fisher Scientific).

5. Equipos y Softwares

Dentro de los equipos utilizados se encuentran: *ChemiDoc Touch Imaging System* (BioRad); pH-metro; lector multi-modal Synergy H1; NanoDrop 2000; campana de flujo laminar LN-120 de Nüve; incubador de CO₂ con camisa de agua serie 8000 WJ, modelo 3429 (Thermo Scientific); transiluminador ECX-F20.M (Vilber); termociclador Rotor-Gene

Q 2plex HRM Platform (Qiagen); centrífuga Heraeus Fresco™ 17 Microcentrifuge W 75002420 (Thermo Scientific). Además se utilizaron los siguientes *softwares*: *Perseus* 1.6.6.0; Adobe Illustrator CC 2018; Adobe Photoshop CC 2017; Image J versión 1.51s y *Excel Microsoft Office 365 ProPlus* 2013.

6. Otros

10x buffer for T4 Ligase (B02025, BioLabs); 1 kb DNA Ladder (N3232S, BioLabs); DMEM (SH30081, GE Healthcare Life Science); Membrana PVDF (88518, Thermo Scientific); Membrana de nitrocelulosa (NBA085C001EA, Perkin Elmer); Homogenizador de vidrio con pistón *loose*; Jeringa hipodérmica estéril 5 mL (Medicaltek); Lipofectamina® 2000 (11668-019, Invitrogen); NEBuffer 3.1 (B72035, BioLabs); O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM1163, Thermo Scientific); Opti-MEM™ (11058021, Gibco); PBS 10x pH 7,4 (70011-044, Thermo Scientific); *T4 DNA Ligase* (M02025, BioLabs); Tripsina (SH30042, GE Healthcare).

MÉTODOS

1. Sub-clonamiento

El plásmido pET28a-JMJD1B-Flag, que codifica para la proteína humana JMJD1B unida al octapéptido Flag se obtuvo con ayuda del Dr. Rodrigo Villanueva sub-clonando la secuencia de nucleótidos de JMJD1B-Flag (2406 pb), contenida en el plásmido pcDNA3.1, al plásmido pET28a. Se amplificó esa secuencia mediante PCR de extensión durante 30 (Programa de PCR correspondiente a: Activación inicial de la polimerasa: 95°C x 2 min, Desnaturación: 95°C x 30 s, Alineamiento: 60°C x 30 s, Elongación: 72°C x 2 min 40 s y Elongación final: 72°C x 5 min), utilizando los partidores 5'-GAT CGA TCG ATC CCA TGG ACT ACA AAG ACC ATG ACG-3' y 5'-GAT CGA TCG ATC CTC GAG CTA GGA CCT TGC CAG TTT GGA-3'. Este producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción NcoI y XhoI a 37°C durante toda la noche junto con el plásmido pET28a (5369 pb), purificado desde la cepa Top10 de *E. coli* que contenía el inserto que codifica para la proteína H3 (415 pb), con las mismas enzimas y bajo las mismas condiciones. El producto de PCR y las digestiones se comprobaron corriendo un gel de agarosa al 0,7% en *buffer* TAE 1x. Posteriormente, desde un gel de agarosa *low melting* al 1%, el plásmido y el producto de PCR digeridos fueron purificados, y se procedió a la ligación de estos durante 16 horas a 4°C en presencia de la enzima T4 DNA ligasa, utilizando plásmido e inserto en distintas proporciones según su concentración: 1:0, 1:1, 1:3 y 1:5. Para crecer y purificar los plásmidos resultantes, bacterias de la cepa DH5 α se transformaron con los productos de ligación. La transformación se realizó descongelando 50 μ L de bacterias competentes e incubándolas durante 30 minutos en hielo con 20 pg del plásmido pET28a-JMJD1B-Flag. Posteriormente, se sometieron a un pulso de 42°C

durante 30 segundos y luego se dejaron en hielo por 3 minutos. Luego, los 50 μL de cada alícuota de bacterias transformadas se mezclaron con 250 μL de medio SOC y se incubaron, en agitación suave y a 37°C, durante 1 hora. Finalmente, los 300 μL de bacterias en medio SOC se plaquearon en placas de LB-agar, suplementadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina.

De las colonias obtenidas se seleccionaron algunas y se crecieron en 5 mL de medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina, dejándolas en agitación a 37°C toda la noche para alcanzar la saturación y así purificar los plásmidos. La inserción del inserto se verificó mediante PCR colonia y análisis de restricción utilizando las enzimas XhoI y NcoI, corriendo las muestras en geles de agarosa al 0,7% en *buffer* TAE 1x. Finalmente, se verificó la secuencia de JMJD1B-Flag a través de secuenciación.

La purificación de plásmidos desde las bacterias transformadas se realizó por mini-prep o midi-prep, usando los *kits* E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit o E.Z.N.A.® Plasmid Midi Kit de Omega Bio-tek, según las especificaciones del fabricante y su concentración se midió utilizando el equipo NanoDrop 2000.

2. Sobre-expresión y purificación de JMJD1B-Flag

Con el vector pET28a-JMJD1B-Flag se transformaron *E. coli* de la cepa BL21-DE3 en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina y posteriormente se crecieron en medio LB con Kanamicina suplementado con 2% glicerol y 30 mM Fosfato dipotásico. Se midió la absorbancia a 600 nm, y cuando se obtuvo una absorbancia cercana a 0,4, se adicionó IPTG a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se dejó en agitación a 20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 4.000 x g durante 20 minutos y el *pellet* se resuspendió en *buffer* de lisis bacteriana. Se adicionó lisozima a una concentración final de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se dejó a 4°C durante 30 minutos. Luego, se sonicó durante 1 minuto con ciclos de 20

segundos, para finalmente centrifugar a 13.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante del lisado de bacterias transformadas se recuperó para realizar la purificación y se incubaron 100 µL de *beads* de agarosa anti-Flag con 1 mL de este durante 1 hora en agitación a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con BC50 + 0,05% NP40. A las *beads* secas se les agregó BC50 + 0,05% NP-40 en proporción 1:1 y se guardaron a 4°C. Como control negativo se utilizó la cepa BL21-DE3 sin transformar, a la cual se le hizo el mismo proceso de inducción y purificación.

3. Ensayo SILAC

Extractos citosólicos de células HeLa asincrónicas (con un aprox. del 75% de las células en fase G1, 10% en fase S y 15% fase G2/M) crecidas en medio con aminoácidos Lisina y Arginina con isótopos pesados de carbono y nitrógeno (C¹³ y N¹⁵, extracto citosólico *heavy*), o en medio con aminoácidos de peso molecular normal (extracto citosólico *light*), estaban almacenados a -80°C en el laboratorio de la Dra. Loyola. Se realizaron dos reacciones: *Forward* y *Reverse*, como se ilustra en la Figura 4. La reacción *Forward* consistió en que 10 µL de *beads* anti-Flag, cargadas con JMJD1B-Flag como se detalla en el método anterior, se incubaron con 200 µg de extracto citosólico *heavy* y las *beads* que interactuaron con el lisado de bacterias no transformadas se incubaron con 200 µg de extracto *light*. La reacción *Reverse* fue exactamente lo contrario: 10 µL de *beads* anti-Flag cargadas con JMJD1B-Flag se incubaron con 200 µg del extracto citosólico *light*, y las *beads* que interactuaron con el lisado de bacterias no transformadas se incubaron con 200 µg de extracto *heavy*. Todas las *beads* se hicieron interactuar con su respectivo extracto citosólico durante 1 hora a 4°C con rotación constante, completando un volumen final de 500 µL con BC50 + 0,05% NP-40. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos a 4°C con rotación constante utilizando BC50 + 0,05% NP-40, centrifugando entre cada

lavado a 500 x g durante 1 minuto y descartando el sobrenadante. Al finalizar el segundo lavado, las *beads* del extracto *heavy* y *light* de cada reacción se juntaron entre sí, resuspendiendo las *beads* en 500 μ L de BC50 + 0,05% NP-40. Como cada reacción se hizo en duplicado, fueron 4 tubos en total: 2 con reacción *Forward* y 2 con reacción *Reverse*.

Estas reacciones se enviaron a Alemania para ser analizadas mediante espectrometría de masas en tándem, siendo procesadas por el Dr. Ignasi Forné, de la unidad de proteómica "Zentrallabor für Proteinanalytik" de la Universidad "Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)" de Munich. Esa unidad de análisis se encuentra asociada al laboratorio de Biología Molecular de dicha universidad, a cargo del Dr. Axel Imhof.

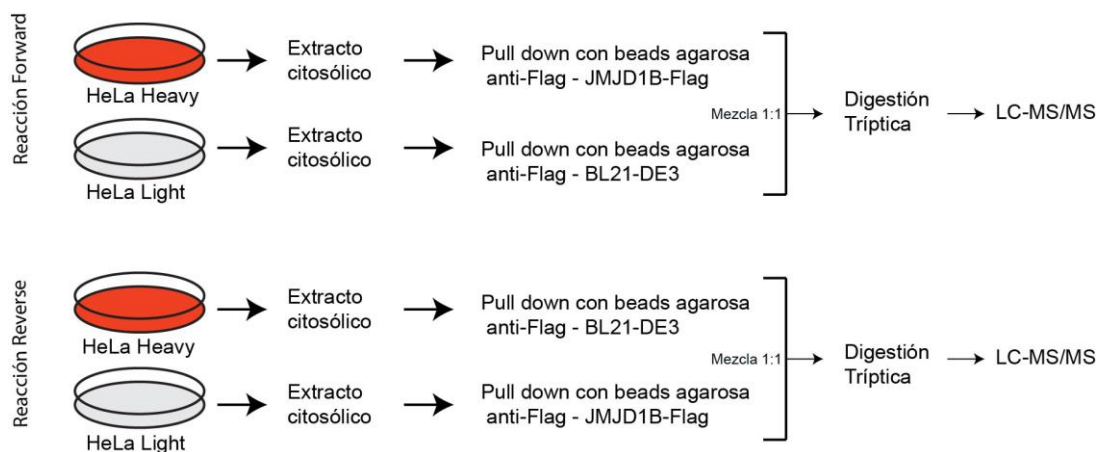


Figura 4: Esquema que representa el ensayo de interactómica de JMJD1B.

Los resultados recibidos se analizaron mediante el *software Perseus*, considerando que los péptidos derivados de extractos *heavy* presentan una diferencia de +8 ó +10 Da respecto de los péptidos derivados del extracto *light*, dependiendo si portan una lisina (+8 Da) o una arginina (+10 Da) pesada. Para determinar si una proteína interactuaba o no con JMJD1B, se utilizó el *iBAQ score* (del inglés *intensity-based absolute quantification*) que considera la intensidad absoluta de los espectros de todos los péptidos que derivan de cierta proteína, lo que permite descifrar si la proteína proviene

del extracto *heavy* o *light*. Por ejemplo, si en la reacción *Forward* cierta proteína presenta un iBAQ score más pesado que liviano, se deduce que esa proteína proviene del extracto *heavy* y, como en esta reacción el extracto *heavy* interactuó con JMJD1B, se desprende que esta proteína interactúa físicamente con JMJD1B. Pero si presenta un iBAQ score más liviano que pesado, la proteína proviene del extracto *light* y, por tanto, no es un interactuante específico de JMJD1B. Por último, si se encuentran valores similares entre ambos iBAQ scores, significa que la proteína está presente independiente de si se encuentre o no JMJD1B en el extracto, y, por lo tanto, tampoco se considera interactuante específica. Este mismo análisis se realizó para la reacción *Reverse*, pero considerando que el extracto *light* interactuó con JMJD1B, por lo que la relación entre iBAQ scores es inversa. Para facilitar el análisis al comparar iBAQ scores pesados (H) versus livianos (L) se hizo una razón: (H/L) para la reacción *Forward* y (L/H) para la reacción *Reverse*, además se aplicó logaritmo en base 2 a las razones, obteniendo así las veces de cambio entre iBAQ scores. De esta forma, para discriminar entre interactuantes específicos o no, se consideró una proteína como interactuante si esta tenía un valor superior a 1 para ambas reacciones (Fw y Rv).

4. Ensayos de *Pull down*

En general, el ensayo consiste en tener una proteína de interés anclada a *beads* y estas incubarlas con extractos citosólicos, o con otra proteína de interés durante cierto tiempo, para luego mediante *western blot*, investigar si existe una interacción física entre ambas.

4.1. *Pull down* utilizando JMJD1B-Flag anclada a *beads* anti-Flag

4.1.1 Obtención del extracto citosólico de células HeLa (S100)

Células HeLa crecidas en medio DMEM se lavaron dos veces con PBS 1x frío, para luego cubrir la placa con 10 mL de *buffer* LS frío, manteniéndola durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se descartó todo el *buffer* LS posible y con un rastrillo se despegaron las células hinchadas y se pasaron a un tubo. Después, con un homogenizador manual de tipo *Loose*, se bajó el pistón 10 veces. Las células se centrifugaron a 1.900 x g durante 3 minutos a 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 17.000 x g durante 60 minutos a 4°C, siendo este sobrenadante final, el extracto citosólico (S100).

4.1.2 Cuantificación de proteínas

Para poder medir la concentración de proteína presente en el extracto citosólico obtenido en el punto 4.1.1 se usó el método de Bradford, utilizando BSA para generar una curva estándar. En una placa de 96 pocillos con fondo plano, por triplicado, se pusieron concentraciones de 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA en solución de Bradford además de la muestra de extracto citosólico. Luego se midió la absorbancia a 595 nm en un lector multi-modal Synergy H1. Finalmente, se realizó un gráfico de dispersión de absorbancia versus concentración de proteína, obteniendo así la curva de BSA descrita por una función lineal, por lo que al reemplazar el valor de absorbancia de los extractos citosólicos en esta ecuación, se obtuvo la concentración de proteína de estos.

4.1.3 *Pull down* sobre extracto citosólico de células HeLa

Diez μL de *beads* anti-Flag cargadas con JMJD1B-Flag, que previamente se bloquearon durante 1 hora a 4°C con 1 mL de una solución al 2% de BSA en BC50, se incubaron con 1,74 mg de extracto citosólico de células HeLa (Figura 5A), obtenidos como se explica en el punto 4.1.1, durante 1 hora a 4°C con rotación constante. Posteriormente, se realizaron 5 lavados durante 5 minutos utilizando 1 mL de BC150 + 0,15% NP-40 a 4°C con agitación constante. La muestra final se analizó mediante *western blot*, utilizando los anticuerpos primarios anti-H3, anti-NASP, anti- β -actina y anti-JMJD1B.

4.2. *Pull down* utilizando *beads* de Níquel ancladas a tNASP-His

Se indujo la sobre-expresión de la proteína recombinante tNASP unida a una cola de histidina durante 2 horas desde la cepa BL21-DE3 de *E. coli*, transformada con pET30-tNASP-His, utilizando IPTG a una concentración final de 1 mM. La purificación de esta proteína se realizó lisando las bacterias con el *buffer* de lisis bacteriana 2 y sobre este lisado se adicionaron 10 μL de *beads* de agarosa conjugadas con Níquel e incubaron durante 1 hora a 4°C . Posteriormente, las *beads* se lavaron 5 veces con *buffer* de lavado durante 5 minutos. Las *beads* cargadas con tNASP-His se utilizaron para el ensayo de *pull down*, haciéndolas interactuar con el lisado de las bacterias que sobre-expresan JMJD1B-Flag durante 1 hora a 4°C . Luego, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con *buffer* de lavado. Como control se utilizaron bacterias sin transformar, y otras que expresaban sNASP-His (Figura 5B). Finalmente, se realizó un *western blot* utilizando el anticuerpo primario anti-JMJD1B.

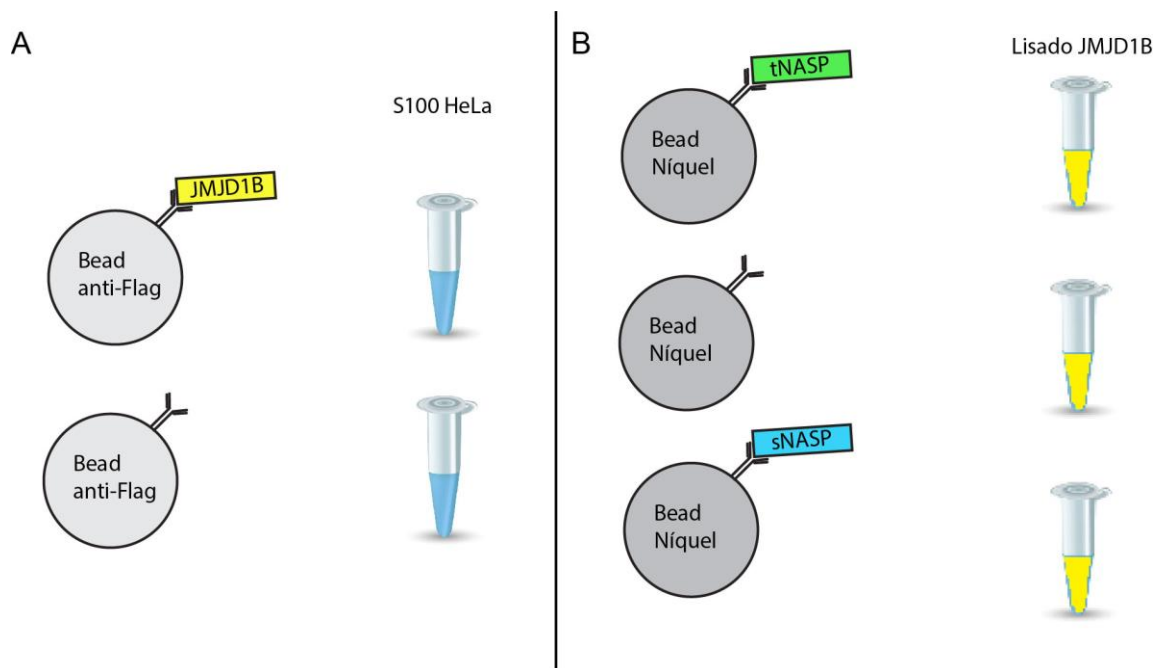


Figura 5: Esquema ensayo de pull down. (A) Se describe el ensayo de *pull down* en extractos citosólicos de células HeLa. **(B)** Se describe el ensayo de *pull down* utilizando *beads* de Níquel sobre lisado de bacterias que expresan JMJD1B.

5. Western blot

Todos los ensayos de *pull down* se comprobaron mediante la técnica de *western blot*. Las muestras se mezclaron con *buffer* de *Laemmli* 5x hasta quedar a una concentración final del *buffer* de 1x, completando un volumen final de 25 μ L. Luego, se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida para separar las proteínas mediante la técnica SDS-PAGE.

El gel está compuesto de dos fases: La primera comprendiendo un 80% del total del gel, denominado gel separador, y la segunda, a un 20%, dispuesto arriba, denominado gel concentrador, el cual contiene los pocillos para cargar las muestras. Para los gels separadores se utilizaron concentraciones fijas de acrilamida (8% o 12,5%) o en gradiente, desde el 6% en la parte superior al 20% en la parte inferior, manteniendo

siempre una proporción de acrilamida-bis-acrilamida de 30:0,8 y una concentración de 36,6 mM Tris-HCl (pH 8,8) y 0,1% SDS. Además se adicionó 0,02% APS y 0,24% TEMED para la polimerización. Por otra parte, los geles concentradores mantienen una concentración fija de 4% acrilamida, 0,1% bis-acrilamida, 12,2 mM Tris-HCl (pH 6,8) y 0,1% SDS, adicionando 0,05% APS y 0,5% TEMED para su polimerización.

Las muestras se corrieron durante 1 hora y 20 minutos a 120 V constantes en *buffer* de corrida 1x. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF a una corriente de 400 mA durante 90 minutos en *buffer* de transferencia 1x. Posteriormente, la membrana se tiñó con solución Rojo Ponceau durante 5 minutos y se destiñó con metanol 100%. Para bloquear la membrana se utilizó una solución de bloqueo de BSA 1% a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se incubó con anticuerpo primario diluido en T-TBS 1x toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó la membrana durante 5 minutos 3 veces con T-TBS 1x y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano en T-TBS 1x en proporción 1:5000 durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, luego de 3 lavados de 10 minutos cada uno con T-TBS 1x se reveló utilizando los *kits* de quimioluminiscencia en el equipo *ChemiDoc Touch Imaging System* (Biorad).

RESULTADOS

1. Sub-clonamiento de JMJD1B-Flag en bacterias *E. coli* de la cepa BL21-DE3

Como punto de partida era necesario tener grandes cantidades de la proteína JMJD1B, lo que se lograba sobre-expresándola en bacterias. Debido a que la secuencia de la isoforma 3 de esta proteína, que posee el dominio catalítico, se encontraba en un plásmido de expresión eucarionte (pcDNA3.1), fue necesario subclonar esa secuencia al plásmido de sobre-expresión en bacterias *E. coli* pET28a.

Se realizó una reacción de PCR de extensión sobre el plásmido pcDNA3.1 que tenía el inserto JMJD1B-Flag, y se utilizaron partidores con la secuencia de sitios reconocidos por las enzimas de restricción NcoI y XhoI para así amplificar el inserto de interés de 2406 pb con estos nuevos sitios de restricción en sus extremos. Terminada la reacción, se comprobó la amplificación del inserto al correr un gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1x y observar una banda cercana a los 2,5 kb (Figura 6). Como controles negativos se utilizó una reacción sin *primers*, en la que se observó una banda tenue cercana a los 5 kb correspondiente al plásmido pcDNA3.1-JMJD1B-Flag, y otra reacción sin el plásmido, en la que no se observó ninguna banda. Posteriormente, se realizó la purificación del amplificado, desde un gel de agarosa *low-melting*, coratndo la banda de interés y usando el kit de purificación por columnas de DNA “E.Z.N.A. ® Gel extraction Kit”, y se comprobó corriendo un gel de agarosa al 1% (Figura 7) donde se observa el fragmento de JMJD1B-Flag purificado.

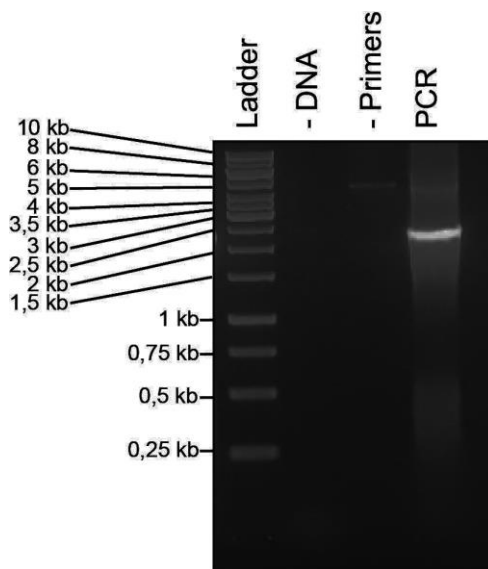


Figura 6: Amplificación por PCR del fragmento JMJD1B-Flag. Gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1x con tinción GelRed. Se cargaron 2 μ L de cada muestra. "-DNA": control al que no se le agregó el plásmido pcDNA3.1-JMJD1B-Flag. "-Primers": control al que no se le agregó ninguno de los *primers*. "PCR": reacción de amplificación del fragmento.

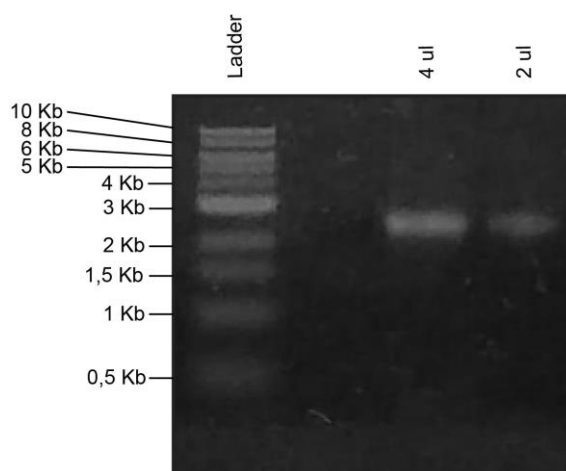


Figura 7: Purificación del fragmento JMJD1B-Flag. Gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1x con tinción GelRed. Se cargaron 2 y 4 μ L del producto PCR purificado.

El fragmento purificado se digirió con las enzimas de restricción anteriormente mencionadas, utilizando las mismas para digerir el vector de destino: el plásmido pET28a

de 5369 pb que tenía un inserto que codifica para la proteína H3.3 de 415 pb (Figura 8). Se observó que el plásmido sin digerir presentaba 2 bandas, la más liviana correspondiente a la super-enrollada y la más pesada la conformación circular relajada o lineal de longitud completa. Al realizar la digestión con una de las enzimas, tanto con XhoI como con NcoI se observa solo una banda del mismo peso molecular, lo que indicaría que efectivamente se realizó un solo corte en el plásmido. Finalmente, al realizar la doble digestión, esta banda es más liviana que los controles, observando la liberación del inserto de H3.3.

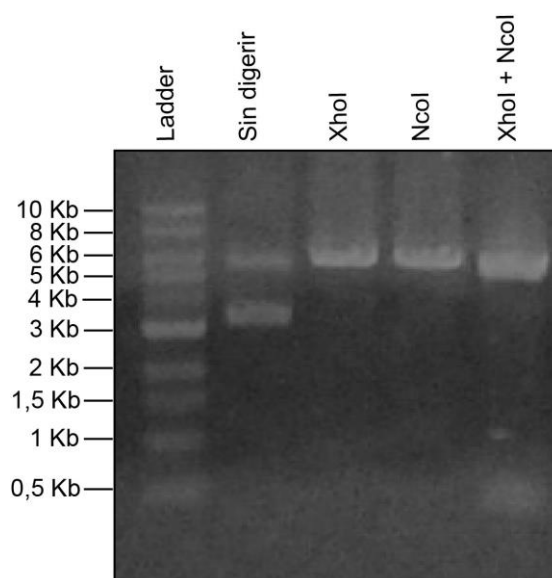


Figura 8: Digestión del plásmido pET28a con las enzimas XhoI y NcoI. Gel de agarosa al 0,7% en *buffer* TAE 1x con tinción GelRed. Se cargaron 2 μ L de cada muestra. De izquierda a derecha se cargó el plásmido pET28a sin digerir, el plásmido digerido solo con XhoI, el plásmido digerido sólo con NcoI y la doble digestión con XhoI + NcoI.

Ambos segmentos de ADN digeridos se ligaron con ayuda de la enzima T4 ligasa con distintas proporciones de plásmido e inserto: 1:0, 1:1, 1:3 y 1:5. Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α , las cuales se utilizan específicamente para clonamientos. Para comprobar que las colonias formadas contenían el plásmido

deseado, primero se realizó un PCR colonia utilizando los partidores mencionados anteriormente para amplificar el fragmento de JMJD1B-Flag, desde los cuales, al analizar mediante un gel de agarosa al 0,7% (Figura 9A), se observó una correcta amplificación sólo en las colonias en las que la reacción de ligación se realizó con la misma proporción de plásmido e inserto (primeras 4 colonias). Como control positivo se realizó la reacción utilizando el plásmido pcDNA3.1 que ya contenía el inserto de JMJD1B-Flag y como control negativo, se realizó la reacción de PCR sin *primers* y además sobre la reacción de auto-ligación (lig 1:0).

Posteriormente, se realizó un análisis de restricción, digiriendo el plásmido pET28a-JMJD1B-Flag de las colonias seleccionadas (colonias 1-4) con las enzimas XhoI y NcoI, analizándolo mediante un gel de agarosa al 0,7%, esperando encontrar una banda correspondiente a la liberación del inserto de JMJD1B-Flag de 2406 pb. Efectivamente se encontró una banda cercana a los 3 kb, pero sólo en las colonias 1 y 2 (Figura 9B).

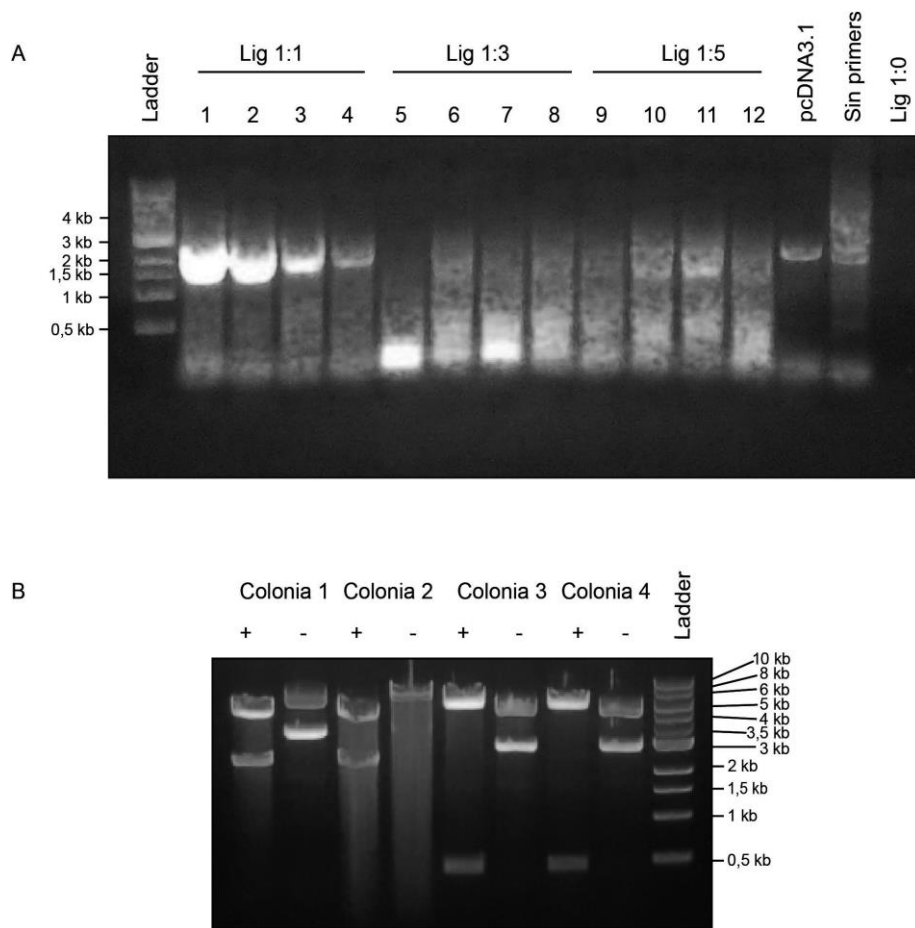


Figura 9: Análisis del sub-clonamiento. (A) Gel de agarosa al 0,7% en *buffer* TAE 1x con tinción GelRed. La figura muestra la amplificación mediante PCR de las colonias seleccionadas de las distintas reacciones de ligación. Se cargó la reacción de PCR completa de cada muestra (20 μ L). “Lig”: Reacción de ligación. “pcDNA3.1”: reacción de PCR sobre el plásmido pcDNA3.1 que contenía la secuencia de JMJD1B-Flag. “Sin primers”: reacción de PCR sin *primers*. **(B)** Gel de agarosa al 0,7% en *buffer* TAE 1x con tinción GelRed. La figura muestra el análisis de restricción. Se cargaron 10 μ L de cada reacción de digestión. “+”: con enzimas de restricción XhoI y NcoI, “-”: sin digerir.

Luego se decidió enviar a secuenciar el material genético de las colonias 1 y 2. Al analizar la secuencia de estas colonias mediante la realización de un BLAST contra la secuencia de la isoforma 3 de JMJD1B humana (Figura 10), se comprobó que la colonia 1 incorporó correctamente la secuencia y se escogió esta para realizar los siguientes experimentos.

A

JMJD1B protein [Homo sapiens]
Sequence ID: [AAH01202.1](#) Length: **759** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 318 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
602 bits(1553)	0.0	Compositional matrix adjust.	299/321(93%)	304/321(94%)	3/321(0%)	+1
Query 184	MSEKEAMMMVEPHQKVAWKRAVRGVREMCDCVETTLEFNIIHWCRKCGFVCLDCYRLRKS					363
Sbjct 1	MSEKEAMMMVEPHQKVAWKRAVRGVREMCDCVETTLEFNIIHWCRKCGFVCLDCYRLRKS					60
Query 364	RPRSETEEMGDEEVSWLKCAKGQSHEPENLMPQTIIIPGTALYINIGDMVHAARGKWIKA					543
Sbjct 61	RPRSETEEMGDEEVSWLKCAKGQSHEPENLMPQTIIIPGTALYINIGDMVHAARGKWIKA					120
Query 544	NCPCISRQNKSVLRPAVTNGMSQLPSINPSASSGNETTFSGGGGPAPVTTPEPDHVPKAD					723
Sbjct 121	NCPCISRQNKSVLRPAVTNGMSQLPSINPSASSGNETTFSGGGGPAPVTTPEPDHVPKAD					180
Query 724	STDIRSEEPKTDSSASNSSELKAIKPPCPDAPPSSALHWLADLATQKAKEETKEAGS					903
Sbjct 181	STDIRSEEPKTDSSASNSSELKAIKPPCPDAPPSSALHWLADLATQKAKEETKEAGS					240
Query 904	LRSVLNKESHSPFLGDSFNSTAKVSPLTPKLFNSLLGPTASNNKTRV*PFKTSFTPGP					1083
Sbjct 241	LRSVLNKESHSPFLGDSFNSTAKVSPLTPKLFNSLLGPTASNNK+ + GP					299
Query 1084	GKISSKPPWDTGLTLFPRVFS 1146					
Sbjct 300	GK+ + P DTG+ FP VFS 318					
Sbjct 300	GKL-PQTPLDTGIP-FPPVFS 318					

B

JMJD1B protein, partial [Homo sapiens]
Sequence ID: [AAH00539.2](#) Length: **1578** Number of Matches: **1**

Range 1: 1215 to 1578 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
660 bits(1702)	0.0	Compositional matrix adjust.	327/374(87%)	336/374(89%)	12/374(3%)	+2
Query 179	QKTNWERFFRGSVGKQRFSPVVGFRGVHKKASSLEVLETQKP--LGQEFGEPM*TLVKL					352
Sbjct 1215	K NW + FR ++ PV+ GVHKK S E KP QEFG+ + LV					1265
Query 353	QETVL*FSDVKVWDFWDFEIIICKRLRSEDGQPMVLKLDWPPGEDFRDMMPTRFEDLVE					532
Sbjct 1266	+ + SDVKV DFWDFEIIICKRLRSEDGQPMVLKLDWPPGEDFRDMMPTRFEDL+E					1324
Query 533	RNCAI-ISDVKVRDFWDFEIIICKRLRSEDGQPMVLKLDWPPGEDFRDMMPTRFEDLME					
Query 533	NLPLPEYTKRDGRNLASRLPSYFVRPDLGPKMYNAYGLITAEDRRVGTTLNHLDVSDAV					712
Sbjct 1325	NLPLPEYTKRDGRNLASRLPSYFVRPDLGPKMYNAYGLITAEDRRVGTTLNHLDVSDAV					1384
Query 713	NMVMYVGIPIGEGAHDDEVLKTIDEGDADEVTKQRIHDGKEKPGALWHIYAADAEKIRE					892
Sbjct 1385	NMVMYVGIPIGEGAHDDEVLKTIDEGDADEVTKQRIHDGKEKPGALWHIYAADAEKIRE					1444
Query 893	LLRKVGEEQEQENPPDHPIDHQSWYLDQTLRKRLYEEYGVQGWAIQVFLGDAVFIPAGA					1072
Sbjct 1445	LLRKVGEEQEQENPPDHPIDHQSWYLDQTLRKRLYEEYGVQGWAIQVFLGDAVFIPAGA					1504
Query 1073	PHQVHNLYSCIKVAEDFVSPHVKHCFRLTQEFRHLSNTHNTHEDKLVQKNIIYHAVKDA					1252
Sbjct 1505	PHQVHNLYSCIKVAEDFVSPHVKHCFRLTQEFRHLSNTHNTHEDKLVQKNIIYHAVKDA					1564
Query 1253	VGTLKAHESKLARS 1294					
Sbjct 1565	VGTLKAHESKLARS 1578					

Figura 10: Blast de la secuencia de la colonia 1. En **(A)** se observa el alineamiento de los primeros 318 aminoácidos de la secuencia de la colonia 1, los cuales tienen un 94% de cobertura de la secuencia total de la isoforma 3 de JMJD1B al ser el largo de la secuencia objetivo de 759 aa. En **(B)** se observan los últimos 364 aminoácidos que corresponden a un 89% de cobertura de la secuencia.

2. Sobre-expresión y purificación de la proteína recombinante JMJD1B-Flag

A partir de la colonia 1 sub-clonada JMJD1B-Flag, se extrajo el ADN plasmidial y con este se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21-DE3, las cuales se utilizan comúnmente para expresar proteínas. Luego de inducir la expresión con IPTG, se realizó un *western blot* contra JMJD1B, utilizando como controles una alícuota del cultivo bacteriano antes de adicionar IPTG (Pre IPTG), una alícuota luego de haber estado expuesto a IPTG toda la noche (Post IPTG), y el precipitado posterior a la lisis bacteriana (*pellet*). Gran parte de la proteína se obtuvo de forma insoluble, quedando en el *pellet*, mientras que sólo un pequeño porcentaje se obtuvo de forma soluble, observándose una banda cercana a los 100 kDa en el sobrenadante, que se condice con el tamaño de la isoforma 3 de JMJD1B, por lo que se confirma la sobre-expresión de esta proteína recombinante (Figura 11). Con este sobrenadante del lisado de bacterias se realizó una inmunoprecipitación utilizando *beads* de agarosa anti-Flag, la cual se analizó mediante un *western blot* contra JMJD1B (Figura 12), en la que se observa a la proteína de interés anclada a las *beads*. Como controles se cargó el 1% del *input* (el sobrenadante del lisado bacteriano), además del sobrenadante (lo que quedó del lisado luego de la incubación).

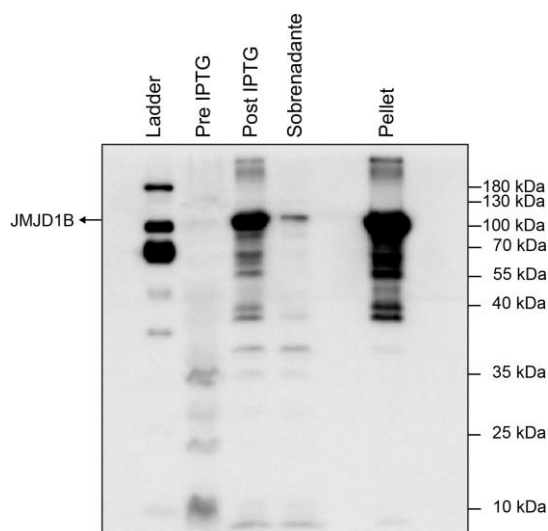


Figura 11: Inducción de la expresión de la proteína recombinante humana JMJD1B-Flag. *Western blot* contra JMJD1B. Se cargaron 20 μ L de cada muestra. “Pre-IPTG”: cultivo bacteriano antes de agregar IPTG. “Post IPTG”: cultivo luego de haber adicionado IPTG y dejarlo actuar toda la noche. “Sobrenadante”: sobrenadante de la lisis bacteriana. “Pellet”: lo que precipitó del lisado bacteriano.

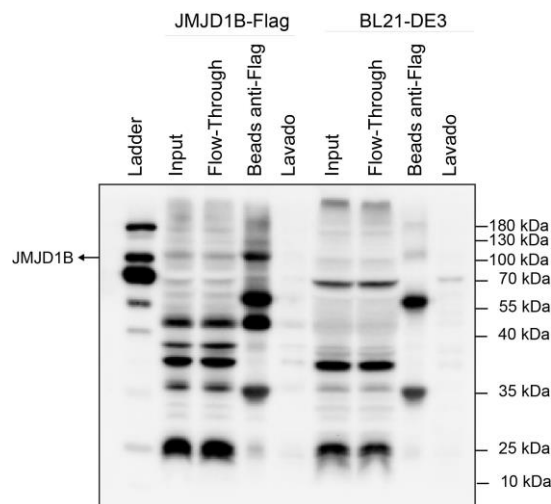


Figura 12: Inmunoprecipitación de JMJD1B-Flag. *Western blot* contra JMJD1B. La figura es una imagen representativa de 4 experimentos independientes. “JMJD1B-Flag” corresponde a la IP utilizando el lisado de las bacterias que sobre-expresaban esta proteína. “BL21-DE3” corresponde a la IP utilizando un lisado de bacterias no transformadas. Se cargaron 10 μ L de cada muestra. “Input” es el 1% de 1 mL de lisado con el que se incubaron las *beads*. “Flow-Through” es lo que se rescató del input que no se unió a las *beads*. “Beads anti-Flag” corresponden a las *beads* luego de finalizada la IP. “Lavado” es el primer lavado luego de incubar las *beads* con el respectivo lisado.

3. Ensayos de *pull down*

Para estudiar si JMJD1B interactúa con tNASP, se llevaron a cabo dos tipos de *pull down*. En el primero se utilizó JMJD1B-Flag anclada a *beads* anti-Flag sobre extractos citosólicos de células HeLa y mediante un *western blot* se analizaron potenciales

candidatos, tales como tNASP y H3, utilizando β -actina como control (Figura 13). Se observó una interacción preferente de JMJD1B con H3 y con β -actina, no así con tNASP. En el segundo ensayo, se utilizó la proteína tNASP-His anclada a *beads* de agarosa conjugadas a Níquel sobre el lisado de bacterias que expresaba JMJD1B-Flag, utilizando como controles *beads* ancladas a sNASP-His y *beads* que interactuaron con el lisado de bacterias no transformadas (BL21-DE3). Al analizar mediante *western blot*, se observa la misma banda correspondiente a JMJD1B en todas las condiciones, tanto en las que no tenían proteína anclada a las *beads*, como en las que tenían anclada a sNASP y a tNASP, por lo que la interacción no era específica (Figura 14). En base a estos resultados concluimos que, bajo estas condiciones, JMJD1B interacciona con H3 y con β -actina, pero no con tNASP.

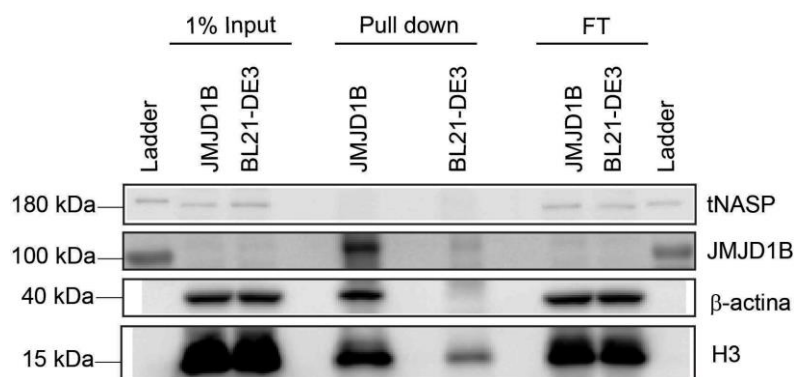


Figura 13: Ensayo de *pull down* sobre extractos citosólicos de células HeLa. *Western blot* contra posibles interactuantes de JMJD1B. La figura es una imagen representativa de 8 experimentos “JMJD1B” corresponde al ensayo de *pull down* utilizando *beads* cargadas con JMJD1B-Flag. “BL21-DE3” corresponde al ensayo de *pull down* utilizando *beads* que habían interactuado con bacterias que no expresaban JMJD1B (BL21-DE3). Se cargó “1% Input”, que es el 1% del extracto S100 con el que se incubaron las *beads*. “*Pull down*”, que corresponde a 10 μ L de las *beads* anti-Flag cargadas luego de interactuar con el extracto citosólico, “FT”: Flow-Through, que son 2 μ L de lo que se rescató del extracto S100 luego de la incubación.

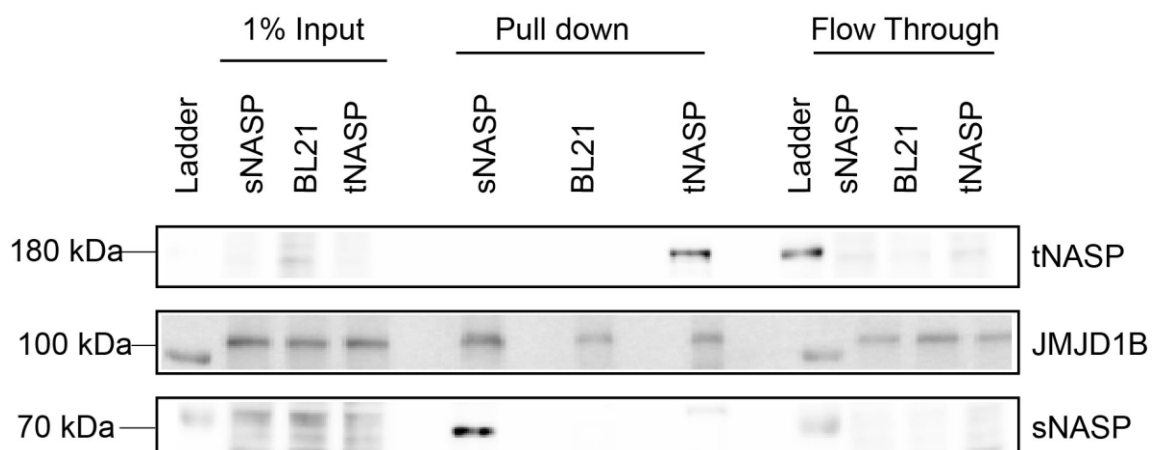


Figura 14: Ensayo de *pull down* utilizando *beads* de Níquel. *Western blot* contra JMJD1B y NASP. La figura es una imagen representativa de 9 experimentos. Se cargó “1% Input”, que es el 1% del sobrenadante del lisado de bacterias que sobre-expresan JMJD1B-Flag con el que se incubaron las *beads*. “*Pull down*”, que corresponde a 10 μ L de las *beads* de agarosa conjugadas a Níquel cargadas luego de interactuar con el extracto citosólico, “FT”: Flow-Through, que son 2 μ L de lo que quedó del input luego de la incubación.

4. Ensayo SILAC

Este ensayo consistió en realizar un *pull down* utilizando como sonda a JMJD1B-Flag sobre extractos citosólicos de células HeLa con marcaje SILAC, con un posterior análisis mediante espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS, detallado en materiales y métodos. (Figura 4).

Luego de realizar el análisis estadístico de los espectros obtenidos por LC-MS/MS, se obtuvo el *dot-plot* de la Figura 15, graficando en el eje de las abscisas el Log₂ promedio de la razón (H/L) de la reacción *Forward* (Valor *F_w*), y en el eje de las ordenadas el Log₂ promedio de la razón (L/H) de la reacción *Reverse* (Valor *R_v*). Considerando que el valor del Log₂(H/L) de una proteína refleja que tan enriquecida está en intensidad *Heavy* o *Light*, según sea el caso, se consideró que una proteína tiene una interacción preferencial con JMJD1B si es que el valor de tal parámetro es igual o mayor a 1 para

ambas reacciones (marcadas en color rojo) (Figura 15B). Como se esperaba, JMJD1B aparece en el cuadrante I del *dot-plot*, puesto que es la proteína recombinante en bacterias y, por lo tanto, todos los aminoácidos que la componen son livianos (Figura 15A). Con este análisis se obtuvo un total de 162 proteínas, de las cuales 9 son interactuantes específicas de JMJD1B, otras 9 proteínas se consideraron como no interactuantes, ya que se anclaron a las *beads* de agarosa utilizadas en el *pull down* cuando JMJD1B no estaba presente y las 144 proteínas restantes aparecieron en ambas condiciones, sin mostrar preferencia por JMJD1B. (Figura 16)

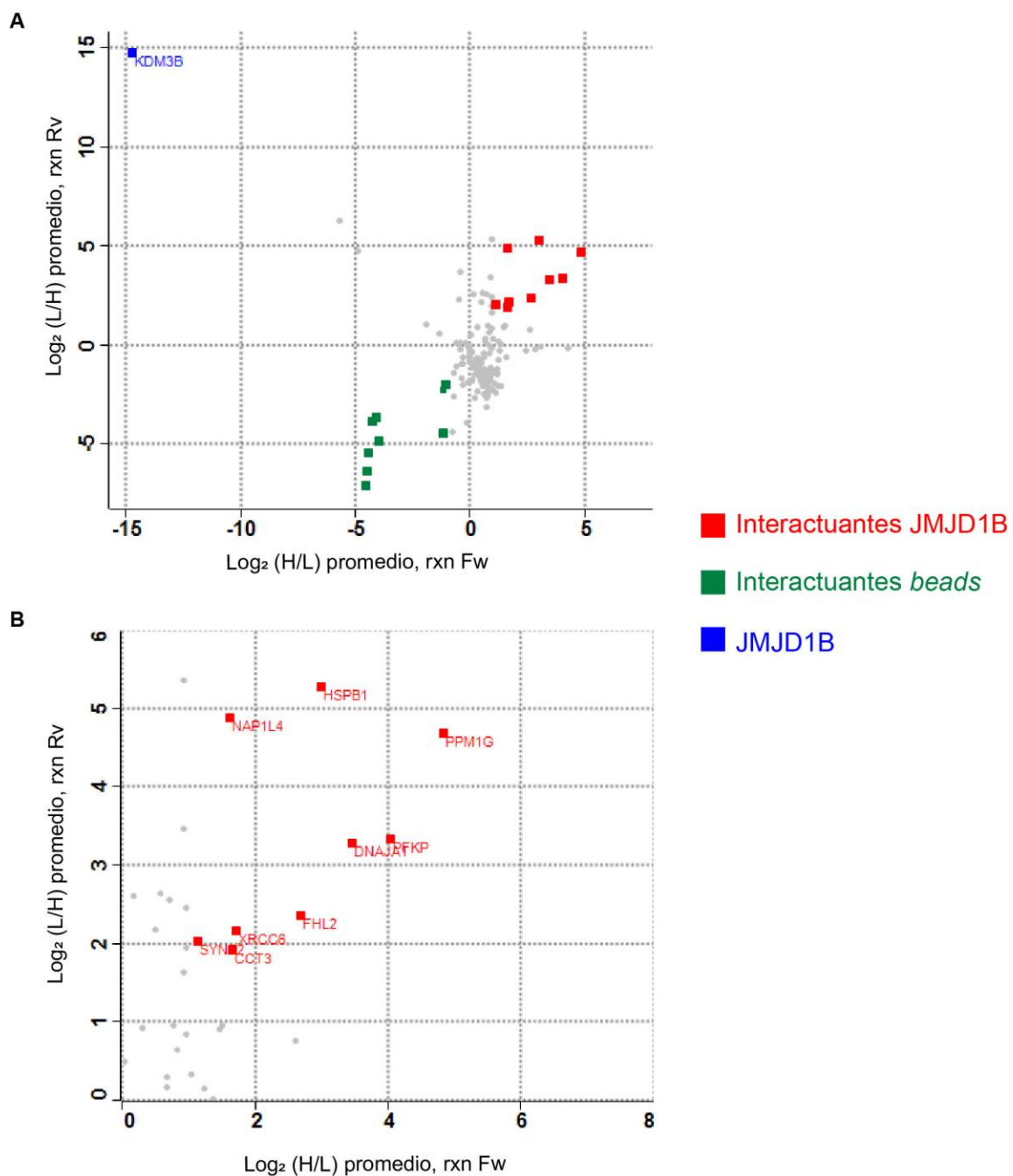


Figura 15: Análisis ensayo SILAC. (A) *Dot-plot* que muestra la distribución de todas las proteínas encontradas. En azul se observa JMJD1B en el cuadrante I (también denominada KDM3B), en verde las proteínas no interactuantes, y en rojo las interactuantes específicas de JMJD1B. **(B)** Zoom del *Dot-plot* en (A) que detalla sólo las proteínas interactuantes de JMJD1B en color rojo.

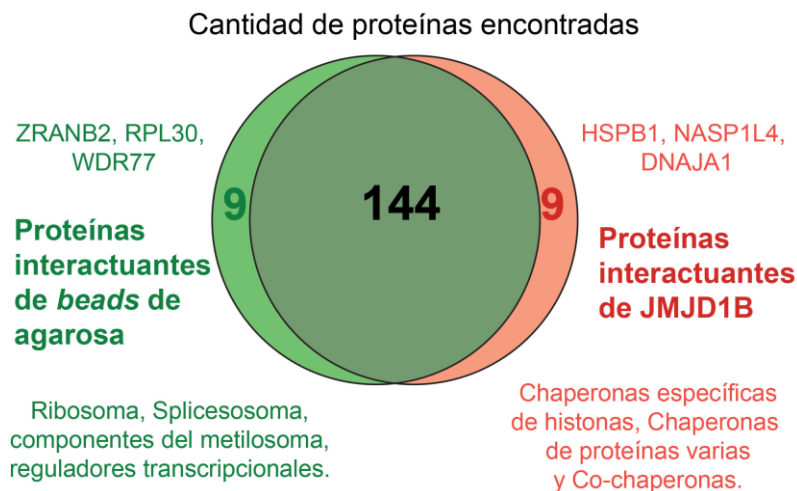


Figura 16: Esquema resumen de la cantidad de proteínas encontradas. Se muestra la cantidad de proteínas interactuantes de JMJD1B, detallando algunos ejemplos.

Las 9 proteínas encontradas como interactuantes de JMJD1B son: HSPB1, NAP1L4, PPM1G, PFKP, DNAJA1, FHL2, XRCC6, SYNE2 y CCT3, y su valor de Fw y Rv se especifica en la Tabla I. En la Tabla II se detallan las mono y di-metilaciones presentes en cada proteína junto con su función. Si bien es cierto que ninguna de las proteínas encontradas mediante este análisis está relacionada con las proteínas que hasta el momento han sido descritas como componentes de la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4, la mayor parte de estas son chaperonas o co-chaperonas. Otras proteínas encontradas, específicamente SYNE2 y CCT3, interactúan directamente con actina, consistente con nuestros resultados de *pull down* que mostraron interacción entre JMJD1B y β -actina (Figura 8). Además, a excepción de NAP1L4 y FHL2, las proteínas están mono o di-metiladas, lo que las posiciona como posibles sustratos de JMJD1B.

Tabla 1: Valores de Log₂(H/L) de reacción *Forward* (Valor Fw) y Log₂(L/H) de reacción *Reverse* (Valor Rv) para las proteínas interactuantes de JMJD1B. Valores mayores a 1 en ambas reacciones representan interactuantes de JMJD1B. En cambio las no interactuantes presentan valores menores a -1 en ambas reacciones.

Proteína	Valor Fw	Valor Rv
HSPB1	3,000	5,276
NAP1L4	1,630	4,886
PPM1G	4,834	4,689
PFKP	4,041	3,334
DNAJA1	3,453	3,277
FHL2	2,692	2,349
XRCC6	1,716	2,159
SYNE2	1,141	2,022
CCT3	1,669	1,917

Tabla 2: Proteínas interactuantes de JMJD1B. En la tabla se listan las 9 proteínas encontradas mediante el ensayo SILAC, sus funciones y sus modificaciones post-traduccionales (mono y di-metilaciones).

	Nombre	Función	Mono metilación	Di metilación
HSPB1	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1	Chaperona de proteínas varias	R5, R12, R20, R37, R56, R89	-
NAP1L4	Nucleosome Assembly Protein 1 Like 4	Chaperona de histonas	-	-
PPM1G	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent 1G	Ser/Thr fosfatasa. Regula ciclo celular	R22, K406	-
PFKP	Phosphofructokinase, Platelet	Isoforma de fosfofructokinasa	R310, R319	K109
DNAJA1	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A1	Heat shock protein 70 cochaperona	R253	-
FHL2	Four And A Half LIM Domains 2	Rol en el ensamblaje de membrana extracelular	-	-
XRCC6	X-Ray Repair Cross Complementing 6	Pertenece a un complejo de DNA kinasa. Interactúa con DNA	K92, R194, R230, R244, R301, R318, R474	-
SYNE2	Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein 2	Proteína de membrana nuclear. Interactúa con actina.	K676, R2345	R224
CCT3	Chaperonin Containing TCP1 Subunit 3	Chaperona que pertenece al complejo TCP1 con actina	R5, R216, R313, R377	-

DISCUSIÓN

Las metilaciones en las histonas pueden tener 5 principales implicancias funcionales en la célula: afectan su estabilidad, promueven o bloquean el establecimiento de otras modificaciones post traduccionales (PTMs), afectan la interacción con otras proteínas y con el DNA, y también determinan su ubicación sub-celular (Biggar & Li, 2015). Hace un tiempo se pensaba que estas modificaciones post-traduccionales eran definitivas, pero al descubrir enzimas capaces de catalizar la remoción del grupo metilo, denominadas desmetilasas, se demostró que estas PTMs son dinámicas (Lan & Shi, 2009). En el núcleo JMJD1B es una desmetilasa de H3K9me1 y H3K9me2 y H4R3me2s (Kim y col., 2012; Li y col., 2018), mientras que su rol en el citoplasma no está definido, por lo que estudiar la interactómica de esta proteína podría dar indicios de su función a nivel citoplasmático.

La interactómica de JMJD1B se estudió mediante 2 técnicas: ensayos de *pull down* analizados por *western blot* y ensayo de SILAC, que si bien también consistió en *un ensayo de pull down*, se analizó mediante espectrometría de masas en tándem. Ninguna permitió detectar interacción entre tNASP y JMJD1B, lo que definió que nuestra hipótesis inicial era incorrecta. Sin embargo, este resultado no permite descartar que tNASP sea sustrato de JMJD1B a través de una interacción transiente.

En este estudio se utilizó la isoforma 3 de JMJD1B, que contiene el dominio desmetilasa, pero no tiene los primeros 1002 aminoácidos del extremo amino terminal. Esto debido a que nuestro objetivo se concentró en la búsqueda de sustratos de desmetilación de JMJD1B, acotando la búsqueda a proteínas que interactúen con el sitio catalítico. Además, un estudio demostró que su actividad desmetilasa sobre la lisina 9 de la histona H3 sólo se logra si además del dominio JmjC, está presente el dominio “*Zinc finger*” (Kim

y col., 2012), y aunque ambos están presentes en la isoforma utilizada en este trabajo, esta tiene la desventaja de no tener dominios que podrían ser importantes en las interacciones proteína-proteína. Por lo tanto, sería interesante que estudios futuros investiguen la interactómica de la proteína JMJD1B completa.

El ensayo de *pull down* acoplado a *western blot* tiene la ventaja de ser una técnica simple de utilizar, pudiendo detectar cualquier proteína interactuante de una proteína de interés. Estos ensayos mostraron que JMJD1B interactúa con la histona H3, consistente con la capacidad de JMJD1B de desmetilar H3 (Kim y col., 2012). Un resultado no esperado fue encontrar β -actina como interactuante, proteína que fue utilizada como control negativo del *pull down*. Interesantemente, los ensayos de *pull down* desarrollados con SILAC determinaron que CCT3 interactúa con JMJD1B. CCT3 es una chaperona perteneciente al complejo TCP1 (del inglés "*T complex polypeptide 1*"), también denominado TRiC ("*TCP1 ring complex*"), complejo de chaperonas que se encargan del correcto plegamiento de proteínas recientemente sintetizadas, que Hsp90 y Hsp70 no logran procesar correctamente (McCallum y col., 2000; Freund y col., 2014). Este se compone de dos anillos idénticos, cada uno con 8 proteínas distintas, entre ellas CCT3, actina y tubulina, lo que explicaría la presencia de β -actina en los ensayos de *pull down* con extractos citosólicos. Estudios futuros podrían enfocarse en investigar si JMJD1B tiene alguna función en el complejo TCP1 y el plegamiento de las proteínas.

Estudiar la interactómica mediante el ensayo SILAC, tiene la ventaja de obtener en un solo experimento, todos los interactuantes de la proteína de interés, además de permitir comparar el control negativo en las mismas condiciones (Aebersold & Mann, 2003). En este caso, el ensayo permitió encontrar 9 proteínas nuevas, entre las cuales se encuentran CCT3, NAP1L4 (del inglés "*Nucleosome Assembly Protein 1 Like 4*") que es una chaperona específica de histonas H2A y H2B que interactúa tanto con las histonas

que están dentro del núcleo como en el citoplasma, dependiendo de la fase del ciclo celular (Rodríguez y col., 1997). HSPB1 (del inglés “*Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1*”) es otra chaperona que promueve el correcto plegamiento de proteínas frente a estrés celular, estando involucrada en procesos como apoptosis y dinámica del citoesqueleto (Almeida-Souza y col., 2010). Sin embargo, aún no se tiene certeza sobre el rol de esta proteína en procesos diferentes al estrés celular. Un estudio demostró que una deacetilasa de histonas, HDAC6, se pliega con la ayuda de HSPB1 (Gibert y col., 2012). Además HDAC6 regula la acetilación de Hsp90 (Kovacs y col., 2005), chaperona que participa directamente en la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4. Por esta razón se puede pensar que, de alguna manera, HSPB1 está conectada con la cascada de maduración de las histonas. Es importante recalcar que una limitación de la espectrometría de masas es que al ser utilizada con una muestra que fue expuesta a lisis celular, puede que detecte algunas interacciones no específicas con otros componentes celulares (Aebersold & Mann, 2003), por ello es importante verificar que las interactuantes de interés realmente lo sean, utilizando otras técnicas. Finalmente, que con esta técnica no se hayan detectado las interactuantes que se observaron mediante *western blot*, se explica porque este método de detección no se centra en una proteína en específico, sino que detecta los péptidos más abundantes en cada condición. Por lo tanto, H3 y β -actina pudieron ser enmascaradas por las 9 proteínas encontradas en mayor cantidad.

Un factor importante al estudiar interacciones proteína-proteína es la duración y la intensidad de esta interacción, puesto que las dos técnicas aquí utilizadas no permiten identificar proteínas que interactúen con JMJD1B de manera transiente o con baja afinidad, pues al realizar los lavados en los ensayos de *pull down*, muchos de estos interactuantes se pierden.

Como los resultados obtenidos sugieren que tNASP no es sustrato de JMJD1B, a continuación se propone un modelo en el cual JMJD1B estaría involucrada en la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas (Figura 17). Un estudio demostró que la metilación de las lisinas 531 y 574 de la chaperona Hsp90 produce la dimerización de sus dos isoformas, permitiéndole estar de forma activa en el citoplasma (Hamamoto y col., 2014). Por otro lado, el *knockdown* de JMJD1B aumenta los niveles proteicos de Hsp90 en el citoplasma junto con tNASP, H3 y H4 (Saavedra y col., 2020). Además Hsp90 estabiliza a tNASP (Cook y col., 2011), por lo que se propone un eje de regulación JMJD1B-Hsp90-tNASP-H3 en el que Hsp90 es sustrato de JMJD1B, lo cual regula la concentración de Hsp90 activa en el citoplasma y, de esta forma, la cantidad de tNASP y de histona H3. Dado todo lo anterior, trabajos futuros se podrían enfocar en estudiar la interacción entre JMJD1B y Hsp90 mediante otras técnicas más específicas que logren detectar interacciones transientes.

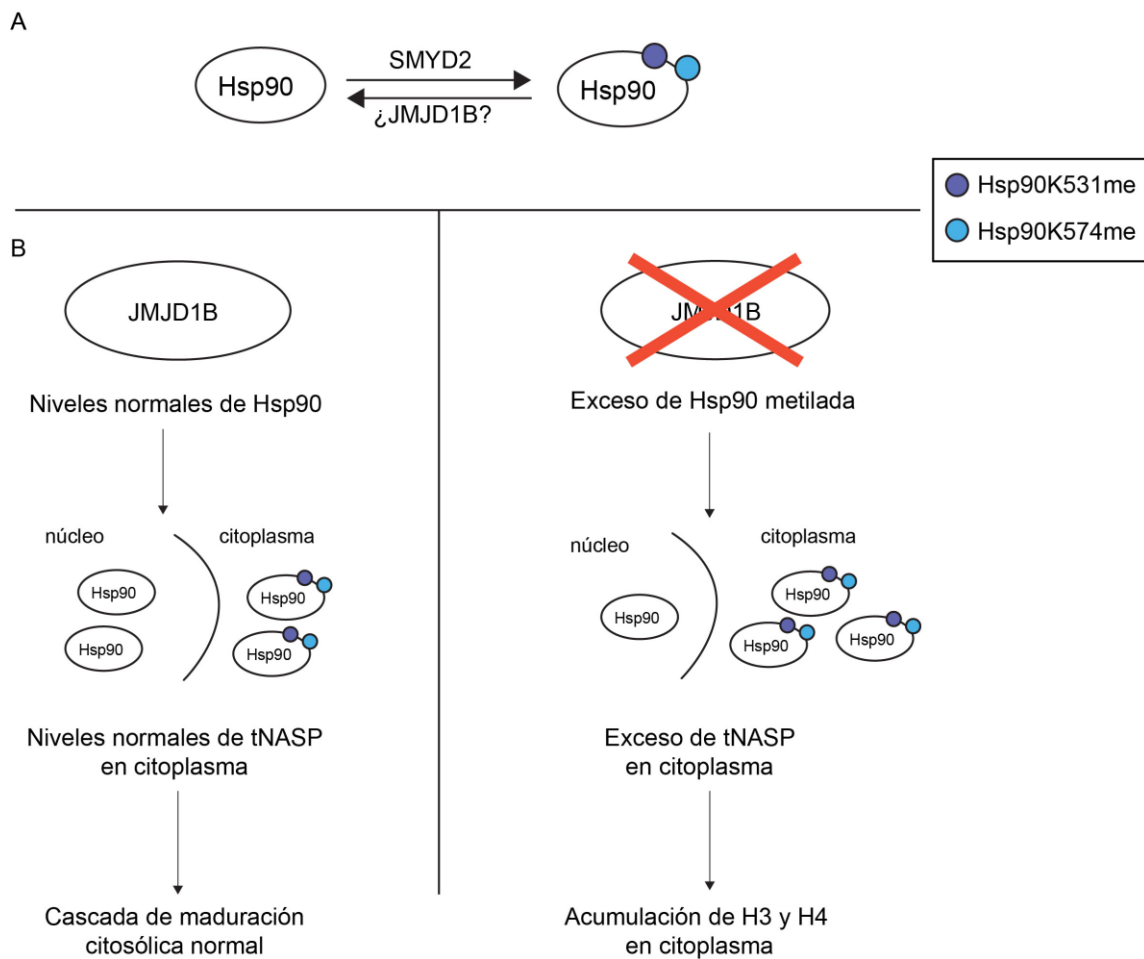


Figura 17: Modelo propuesto del rol de JMJD1B en la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas. (A) JMJD1B podría ayudar a mantener el equilibrio entre Hsp90 metilada y no metilada, regulando su función. **(B)** En ausencia de JMJD1B, Hsp90 se acumularía en el citoplasma, provocando un aumento en los niveles proteicos de tNASP, H3 y H4.

CONCLUSIONES

Tal como esta investigación lo ha demostrado, las dos técnicas utilizadas para determinar interacción entre proteínas sugieren que tNASP no es sustrato de JMJD1B.

Pese a lo anterior:

- Se confirmó que existe interacción entre JMJD1B y la histona H3.
- Se encontraron otras 9 proteínas como interactuantes específicas de JMJD1B.

Finalmente, considerando los antecedentes que se tienen sobre JMJD1B, se puede postular un eje de regulación JMJD1B-HSP90-tNASP en el que la remoción de la metilación de las lisinas 531 y 574 de Hsp90 controlaría sus niveles proteicos en el citoplasma y, de esa forma, regularía la concentración de tNASP y H3 presentes en el citoplasma.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebersold, R. & Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. **422**: 198-207.
- Almeida-Souza, L., Goethals, S., De Winter, V., Dierick, I., Gallardo, R., Van Durme, J., Irobi, J., Gettemans, J., Rosseau, F., Schymkowitz, J., Janssens, S. & Timmerman, V. 2010. Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Journal of biological chemistry*. **285**: 12778-12786.
- Alvarez, F., Muñoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G. & Loyola, A. 2011. Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J Biol Chem*. **286**: 17714-17721.
- Biggar, K.K. & Li, S.S.C. 2015. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. **16**: 5-17.
- Campos, E.I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W.H.W., Seepany, H., Gao, Z., Day, L.A., Greenblatt, J.F. & Reinberg, D. 2010. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nature Structural & Molecular Biology*. **17**: 1343-1351.
- Chang, L., Loranger, S.S., Mizzen, C., Ernst, S.G., Allis, C.D. & Annunziato, A.T. 1997. Histones in Transit: Cytosolic Histone Complexes and Diacetylation of H4 During Nucleosome Assembly in Human Cells. *Biochemistry*. **36**: 469–480.
- Chrun, E.S., Modolo, F. & Daniel, F.I. 2017. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathology - Research and Practice*. **213**: 1329–1339.
- Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K. & Helin, K. 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & development*. **22**: 1115-1140.
- Cook, A.J.L., Gurard-Levin, Z.A., Vassias, I. & Almouzni, G. 2011. A Specific Function for the Histone Chaperone NASP to Fine-Tune a Reservoir of Soluble H3-H4 in the Histone Supply Chain. *Molecular Cell*. **44**: 918–927.
- Ettig, R., Kepper, N., Stehr, R., Wedemann, G. & Rippe, K. 2011. Dissecting DNA-histone interactions in the nucleosome by molecular dynamics simulations of DNA unwrapping. *Biophysical journal*. **101**: 1999–2008.

Freund, A., Zhong, F.L., Venteicher, A.S., Meng, Z., Veenstra, T.D., Frydman, J. & Artandi, S.E. 2014. Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell*. **159**: 1389-1403.

Gibert, B., Eckel, B., Fasquelle, L., Moulin, M., Bouhallier, F., Gonin, V., Mellier, G., Simons, S., Kertz-Remy, C., Arrigo, A.P. & Diaz-Latoud, C. 2012. Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins. *PLoS One*. **7**:e29719. doi:10.1371/journal.pone.0029719

Hamamoto, R., Toyokawa, G., Nakakido, M., Ueda, K. & Nakamura, Y. 2014. SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation. *Cancer letters*. **351**: 126-133.

Kim, J.Y., Kim, K.B., Eom, G.H., Choe, N., Kee, H.J., Son, H.J., Oh, S.T., Kim, D.W., Pak, J.H., Baek, H.J., Hahn, Y., Chakravarti, D., Sei, S.B. & Kook, H. 2012. KDM3B is the H3K9 demethylase involved in transcriptional activation of *Imo2* in leukemia. *Molecular and cellular biology*. **32**: 2917-2933.

Klose, R.J., Kallin, E.M. & Zhang, Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature reviews genetics*. **7**: 715-727.

Kouzarides, T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. **128**: 693-705.

Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toff, D.O., Pratt, W.B. & Yao, T.P. 2005. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular cell*. **18**: 601-607.

Lan, F. & Shi, Y. 2009. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Science in China Series C: Life Sciences*. **52**: 311-322.

Lee, J. Y. & Orr-Weaver, T. L. 2001. Chromatin. En S. Brenner y J. Miller (eds.), *Encyclopedia of Genetics*. pp 340-343. Elsevier Science Inc, USA.

Li, S., Ali, S., Duan, X., Liu, S., Du, J., Liu, C., Dai, H., Zhou, M., Yang, L., Chu, P., Li, L., Bahatia, R., Schones, D. E., Wu, X., Xu, H., Hua, Y., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, L. & Shen, B. 2018. JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Rep*. **23**: 389-403.

Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A. & Almouzni, G. 2006. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular Cell*. **24**: 309–316.

Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. & Almounzni, G. 2009. The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3KA9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep.* **10**: 769-775.

Luger, K., Mäder, A., Richmond, R., Sargent, D. & Richmond, T. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389**: 251-260.

McCallum, C. D., Do, H., Johnson, A. E. & Frydman, J. 2000. The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. *The Journal of cell biology.* **149**: 591-602.

Plevin, M.J., Mills, M.M. & Ikura, M. 2005. The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences.* **30**: 66-69.

Rodriguez, P., Munroe, D., Prawitt, D., Chu, L. L., Bric, E., Kim, J., Reid, L. H., Davies, C., Nakagama, H., Loebbert, R., Winterpacht, A., Petrucci, M. J., Higgins, M. J., Nowak, N., Evans, G., Shows, T., Weissman, B. E., Zabel, B., Housman, D. E. & Pelletier, J. 1997. Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics.* **44**: 253-265.

Rivera, C., Saavedra, F., Alvarez, F., Díaz-Celis, C., Ugalde, V., Li, J., Forné, I., Guard-Levin, Z.A., Almounzni, G., Imhof, A. & Loyola, A. 2015. Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. *Nucleic Acids Research.* **43**: 9097–9106.

Saavedra, F. 2018. La desmetilasa JMJD1B es necesaria para el correcto procesamiento citosólico de las histonas H3 y H4 y para su suministro al interior del núcleo. Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Andrés Bello.

Saavedra, F., Gurard-Levin, Z.A., Rojas-Villalobos, C., Vassias, I., Quatrini, R., Almounzni, G. & Loyola, A. 2020. JMJD1B, a novel player in histone H3 and H4 processing to ensure genome stability. *Epigenetics & Chromatin.* **13**: 1-15.

Saraç, H., Morova, T., Pires, E., McCullagh, J., Kaplan, A., Cingöz, A., Bagci-Onder, T., Önder, T., Kawamura, A. & Lack, N. A. 2019. Systematic characterization of chromatin modifying enzymes identifies KDM3B as a critical regulator in castration resistant prostate cancer. *Oncogene.* **39**: 1-15.

Schofield, C. & Hausinger, R.P (eds.), 2015. The JMJD1 Family (also known as the KDM3 Family). En C.J. Schofield y R.P. Hausinger (eds.), *2-Oxoglutarate-dependent oxygenases.* pp 214-216. Royal Society of Chemistry, London.

Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T. & Allis, C.D. 1995. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92**: 1237-1241.