

UCH-FC  
Biotecnología  
S 112  
C. 2



FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR 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

Francisco Javier Saavedra Cantillana

Noviembre-2014

Santiago-Chile

Directora del seminario de Título:

Dra. Alejandra Loyola Pedevila



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. FRANCISCO JAVIER SAAVEDRA CANTILLANA

**"CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE LAS HISTONAS H3 Y H4"**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Dr(a)  
Director Seminario de Título

A. Alvarado

Comisión de Evaluación

Dr(a).  
Presidente Comisión

V. Guisasa

Dr(a).  
Evaluador

F. Ruiz

Santiago, .....



*"A mis mejores amigos: Mis padres, Mi hermano, a Sirius y Esmeralda, que me soportaron y apoyaron en esta travesía."*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres, nunca terminaré de agradecerles las noches en vela, el apoyo, el ánimo, la instrucción y, por sobre todo, la educación, gracias a ella soy quien soy. Gracias por los valores y principios que me entregaron. Agradezco también a mi hermano, quien ha sido mi "*partner*" desde que llegó a este mundo. Gracias por *hacerme tanto reír*.

Gracias a la gente del laboratorio y a la fundación Ciencia & Vida, en especial a la Dra. Alejandra Loyola, quien me aceptó en su laboratorio, me guió en este trabajo, confió en mis capacidades y me impulsó a ingresar al doctorado, la próxima gran aventura. Agradezco también a Francisca Alvarez, quien fuera casi mi co-tutora en esta tesis. Gracias a ambas por la paciencia para enseñarme y por la guía entregada.

Gracias a las colaboraciones internacionales. A los laboratorios de los Doctores Axel Imhof, en donde se realizaron las espectrometrías de masa, y Geneviève Almouzni, por donar el anticuerpo anti-Asf1.

Gracias a la Universidad de Chile, mi alma máter, y a sus profesores. Gracias por mi formación científica y académica y por un par de ojeras.

Gracias a mis amigos, en especial a quienes conocí en la Universidad y en el laboratorio. Agradezco a mis *compañeros de sufrimiento*, con quienes nos apoyamos no solo para terminar los ramos, y a mis *compañeros de batalla*.

Y gracias, especialmente, a quien difícilmente pudo estar a mi lado, pero que a la distancia me brindó su apoyo incondicional e incluso más. Gracias por brindarme todo aquello y alegrar mis días.

Gracias a todos, a algunos más que a otros... pero gracias de corazón.

## INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE CONTENIDO	IV
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Materiales y Reactivos	10
2.2. Soluciones y Buffer	12
2.3. Geles	13
2.4. Extractos citosólicos S100 de células HeLa	14
2.5. Medición de proteínas	15
2.6. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio	15
2.7. Diálisis	16
2.8. Cromatografía de Intercambio Iónico	16
2.9. Sedimentación al equilibrio en gradientes de glicerol	18
2.10. Western blot	19

2.11. Precipitación de proteínas con TCA	20
2.12. Espectrometría de masas MALDI-TOF	20
3. RESULTADOS	23
3.1. Aislamiento de los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4	23
3.1.1. Precipitación con sulfato de amonio y primera cromatografía de intercambio aniónico	23
3.1.2. Segunda cromatografía de intercambio aniónico	26
3.1.3. Tercera cromatografía de intercambio aniónico	28
3.1.4. Comparación de las fracciones enriquecidas en los Complejos IVa y IVb	30
3.1.5. Cromatografía de intercambio catiónico del complejo IVa	30
3.1.6. Cromatografía de intercambio catiónico del complejo IVb	33
3.1.7. Análisis del grado de purificación logrado para los complejos IVa y IVb	35
3.1.8. Primera sedimentación al equilibrio para el complejo IVa	35
3.1.9. Segunda sedimentación al equilibrio para el complejo IVa	38
3.1.10. Tercera sedimentación al equilibrio para el complejo IVa	38
3.1.11. Tablas de purificación	38
3.2. Análisis y caracterización de las proteínas asociadas al complejo IVa	43
3.2.1. Proteínas asociadas al complejo IVa	43
3.2.2. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVa	43

3.2.3. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVa	46
3.3. Análisis y caracterización de las proteínas asociadas al complejo IVb	48
3.3.1. Proteínas asociadas al complejo IVb	48
3.3.2. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVb	48
3.3.3. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVb	51
3.4. Análisis de las variantes de la histona H3, H3.1 y H3.3, asociadas a los complejos IVa y IVb	51
4. DISCUSIÓN	55
4.1. Aislamiento y purificación de los complejos IVa y IVb de translocación nuclear de las histonas H3 y H4	55
4.2. Identificación de las proteínas asociadas a los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4, análisis del patrón de modificaciones posttraduccionales de sus histonas y análisis de variantes	58
4.2.1. Complejo IVa	58
4.2.2. Complejo IVb	60
4.3. Implicancias de la existencia de los complejos IVa y IVb de translocación nuclear de las histonas H3 y H4	63
5. CONCLUSIONES	65
6. BIBLIOGRAFÍA	66

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de Purificación del complejo IVa	41
Tabla 2. Tabla de Purificación del complejo IVb	42

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de procesamiento posttraduccional de las histonas H3 y H4	6
Figura 2. Esquema de purificación de los complejos de translocación nuclear de las histonas citosólicas H3 y H4	24
Figura 3. Precipitación con sulfato de amonio y primera cromatografía de intercambio aniónico	25
Figura 4. Perfil de elución de la segunda columna DEAE-5PW	27
Figura 5. Perfil de elución de la tercera columna DEAE-5PW	29
Figura 6. Análisis de Western blot de las fracciones enriquecidas en los complejos IVa y IVb	31
Figura 7. Perfil de elución del complejo IVa en la columna CM-celulosa	32
Figura 8. Perfil de elución del complejo IVb en la columna CM-celulosa	34
Figura 9. Análisis del grado de purificación de los complejos IVa y IVb	36
Figura 10. Primera sedimentación al equilibrio de la fracción enriquecida en el complejo IVa	37
Figura 11. Segunda sedimentación al equilibrio del complejo IVa	39
Figura 12. Tercera sedimentación al equilibrio del complejo IVa	40
Figura 13. Proteínas presentes en la fracción enriquecida en el complejo IVa	44
Figura 14. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVa	45

Figura 15. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVa	47
Figura 16. Proteínas presentes en la fracción enriquecida en el complejo IVb	49
Figura 17. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVb	50
Figura 18. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVb	52
Figura 19. Análisis de variantes de la histona H3 presentes en cada complejo	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TCA	Acido tricloroacético
TFA	Acido trifluoroacético
BSA	Seroalbúmina bovina
DEAE	Dietil amino etil
CM	Carboximetil
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Hidrocloruro de Tris (hidroximetil) aminometano
T-TBS	<i>Buffer</i> Tween-Tris salino
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Nombre IUPAC: dodecilsulfato sódico)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
APS	Persulfato de amonio (Nombre IUPAC: persulfato amónico)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
DTT	Ditiotreitol
NP40	Sustituto de Nonidet P-40
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (Nombre IUPAC: poli-1,1-difluoroeteno)
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida, en condiciones denaturantes (con SDS)
v/v	Volumen/Volumen
p/v	Peso/Volumen

min	minuto
mS	milisiemens
cm	centímetro
mm	milímetro
nm	nanómetro
μm	micrómetro
M	molar
mM	milimolar
ml	mililitro
μl	microlitro
mg	miligramo
μg	microgramo
ng	nanogramo
mA	miliamperio
FPLC	Cromatografía líquida rápida para proteínas (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
PTMs	Modificaciones posttraduccionales (del inglés <i>Posttranslational Modifications</i> )
r.p.m.	Revoluciones <i>per</i> minuto
u.m.a.	Unidades de masa atómica
kDa	kilodalton

## RESUMEN

Las histonas H3 y H4 son proteínas básicas, de bajo peso molecular, cuya función es compactar el DNA en la cromatina. Un trabajo previo de nuestro laboratorio indicó que, una vez que los mRNA de las histonas H3 y H4 son traducidos, los polipéptidos entran en una "cascada de eventos de maduración" que involucra al menos cuatro complejos proteicos. En uno de estos complejos, en el denominado "complejo IV", las histonas se encuentran asociadas a Importina-4, la cual es la responsable de mediar su translocación nuclear. El objetivo de este trabajo es caracterizar este complejo proteico. Para esto, hemos purificado al complejo IV a través de múltiples pasos de purificación bioquímica, empleando extractos citosólicos S100 derivados de cultivos asincrónicos de células humanas HeLa. En cada paso de purificación, monitoreamos la presencia de la histona H3 por medio de Western blot. Aquí, presentaremos evidencias acerca de la existencia de dos tipos de complejo IV, ambos asociados a Importina-4, pero a diferentes isoformas de la chaperona específica de histonas Asf1. Además, mostraremos que la histona H3 presenta distintas modificaciones posttraduccionales dependiendo del tipo de complejo IV a la cual encuentre asociada.

## ABSTRACT

Histones H3 and H4 are basic proteins of low molecular weight whose function is to package the DNA into chromatin. Our previous work showed that once H3 and H4 mRNAs are translated, the histone polypeptides go through a successive "cascade of maturation events" that comprises at least four protein complexes. One of these complexes is the so called "complex IV", in which the histones H3 and H4 are associated to Importin-4, the protein that is the responsible of mediating the translocation of the histones H3 and H4 into the nucleus. The aim of this work is to characterize this protein complex. Toward this, we have purified the complex IV through multistep biochemical fractionation of S100 extracts derived from human HeLa cells in asynchronous cultures. We followed each of the purification steps by Western blot against histone H3. We will present evidences of the existence of two types of complex IV, both associated to Importin4, but to different isoforms of the histone chaperone Asf1. In addition, we will show that the histone H3 has different patterns of posttranslational modifications depending of the type of complex IV which is found associated.

## 1. INTRODUCCIÓN

La información genética de los organismos eucariontes está codificada en el DNA, el cual es un biopolímero de nucleótidos con una longitud que excede el diámetro celular. Debido a esto, el DNA se asocia a múltiples factores que le permiten ser empacado al interior del núcleo, originando la cromatina (Kornberg, 1977). La unidad básica estructural de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por dos copias de cada una de las histonas "core" (histonas H2A, H2B, H3 y H4), las que forman un octámero sobre el cual se enrollan, en 1,65 vueltas, 147 pares de bases de DNA (Luger y col., 1997; Andrews & Luger, 2011). Las histonas son proteínas de bajo peso molecular, entre 10 y 16 kDa, con una alta proporción de aminoácidos básicos, específicamente lisinas y argininas (Daly y col., 1951). Dada su composición, su punto isoeléctrico está entre 10,4 y 10,8 unidades de pH (Mirsky & Pollister, 1946), por lo que bajo condiciones fisiológicas poseen carga neta positiva.

Con la excepción de la histona H4, todas las histonas poseen isoformas no alélicas que se denominan "variantes de histonas" (Sarma & Reinberg, 2005). Estas, aunque poseen distintos grados de homología con la secuencia aminoacídica de las histonas canónicas (aquellas que son ensambladas en los nucleosomas durante la replicación del DNA (Kusch & Workman, 2007)), difieren tanto en la etapa del ciclo celular en la que se expresan como en el procesamiento de sus RNA mensajeros. Así, mientras que las histonas canónicas se expresan en altos niveles solo durante la fase S del ciclo celular y sus RNA mensajeros no poseen intrones ni son poli-adenilados,

las variantes de histonas se expresan a lo largo de todo el ciclo celular y sus mensajeros presentan tanto intrones como poli-adenilación (Marzluff y col., 2008). Las histonas canónicas y las variantes de histonas difieren en cuanto a su impacto en la regulación de la estructura y función de la cromatina (Sarma & Reinberg, 2005).

En el caso de la histona H3 de mamíferos, las proteínas H3.1, H3.2 y H3.3 han sido extensamente estudiadas. Mientras que H3.1 y H3.2 constituyen a las histonas canónicas, H3.3 es la variante y, como tal, se expresa a lo largo de todo el ciclo celular. H3.1 y H3.3 comparten un 96,3% de su secuencia aminoácídica, diferenciándose en tan solo 5 aminoácidos, sin embargo, difieren en muchos aspectos. Por ejemplo, H3.1 es suministrada a la cromatina a través de la chaperona CAF-1 (Del inglés "Chromatin Assembly Factor 1"), mientras que H3.3 es entregada a la cromatina por las chaperonas HIRA ("Histone Regulation A" (Tagami y col., 2004)) y Daxx ("Death-Associated protein" (Drane y col., 2010)). Además, H3.3 está enriquecida en los promotores y en el cuerpo de los genes transcripcionalmente activos, lo cual sugiere que posee una función relacionada con la activación de la transcripción (Chow y col., 2005; Jin y col., 2009). A pesar de esto, también se ha observado que Daxx deposita H3.3 en las regiones silentes del DNA, tales como la heterocromatina pericéntrica y los telómeros (Drane y col., 2010).

Además de la existencia de variantes, existe otro nivel de complejidad y regulación asociado a las histonas que está dado por la incorporación de numerosas modificaciones post-traduccionales (PTMs, del inglés Post-Translational Modifications). Las PTMs son de diversa naturaleza y comprenden, entre otras, acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones. En la cromatina, dependiendo de la histona, del residuo aminoácídico modificado, del grado de modificación (por ejemplo,

mono-, di- o tri- metilación) y de su naturaleza química, las PTMs impactan tanto en la estructura de la cromatina como en la expresión genética (Peterson & Laniel, 2004). Consistente con la observación de que H3.3 está enriquecida en los genes transcripcionalmente activos, análisis de sus PTMs han demostrado que está enriquecida en aquellas asociadas a la activación de la transcripción (Loyola y col., 2006; Loyola y col, 2007).

No todas las histonas presentes en la célula forman parte de la cromatina. En efecto, las histonas son traducidas en los ribosomas libres del citoplasma, motivo por el cual deben ser translocadas al interior del núcleo antes de cumplir con la función de compactar al DNA. La translocación nuclear no es un proceso trivial, pues la mayoría de las macromoléculas, incluyendo proteínas y distintos tipos de RNA, no pueden difundir pasivamente a través del poro nuclear. Para realizar este transporte activo se requiere de la presencia de carioferinas (Freitas & Cunha, 2009), las cuales son proteínas que están especializadas en mediar la translocación de distintas macromoléculas hacia el interior del núcleo, hacia fuera de este o en ambos sentidos (Mingot y col., 2001; Fiserova & Goldberg, 2010). El proceso mayoritariamente descrito para la translocación de proteínas hacia el interior del núcleo está dado por un sistema dependiente de las carioferinas "Importina  $\alpha$ " e "Importina  $\beta$ ", en donde Importina  $\alpha$  reconoce a la proteína a translocar (o proteína "carga") a través de una secuencia de aminoácidos conocida como NLS (por sus siglas en inglés "Nuclear Localization Signal"), la cual está compuesta por una secuencia de aminoácidos del tipo K-K/R-X-K/R (donde X puede ser cualquier aminoácido) o bien puede consistir en dos regiones de aminoácidos básicos unidas por un péptido "linker" (Lange y col., 2007). Una vez que Importina  $\alpha$  reconoce a la proteína carga, Importina  $\beta$  se une a Importina  $\alpha$  para

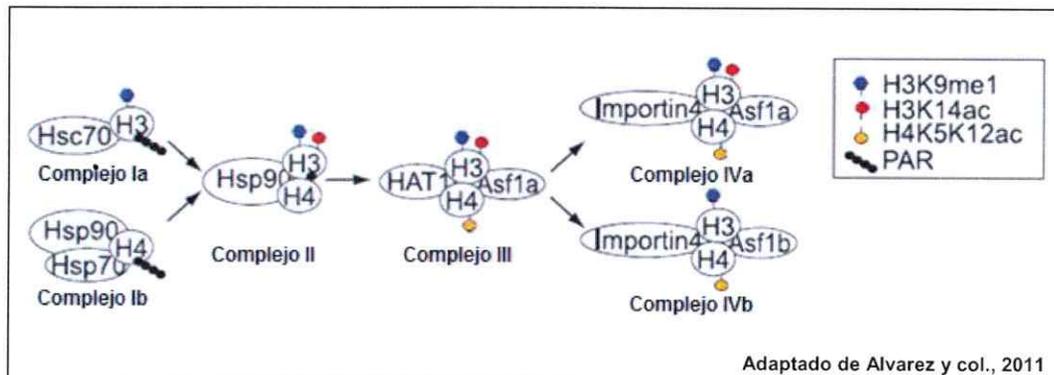
formar un trímero que será translocado al interior del núcleo celular (Görlich y col., 1995). La translocación nuclear de las histonas H3 y H4 está a cargo de Importina-4, la cual pertenece a un grupo de carioferinas relacionadas con la familia de las Importinas  $\beta$ , pero con la capacidad de unirse directamente a la secuencia NLS de las proteínas sin necesidad de un adaptador (Pradeepa y col., 2008). La secuencia NLS de las histonas se encuentra en su extremo amino-terminal.

Dado que las histonas son sintetizadas en los ribosomas libres del citoplasma y que primero deben ser incorporadas al interior del núcleo antes de ser depositadas en la cromatina, es posible identificar tres poblaciones de histonas conforme a su distribución sub-celular. Por medio de técnicas bioquímicas de fraccionamiento sub-celular, basadas en lisis hipotónica y ruptura mecánica (Dignam y col., 1983), es posible estudiar estas tres poblaciones de histonas: las histonas nucleosomales, que representan alrededor del 99% del total de las histonas y se encuentran en la cromatina; las histonas nucleares no-nucleosomales, que representan al 0,6% del total de las histonas y se encuentran en los extractos nucleares; y las histonas citosólicas, que representan cerca del 0,4% del total de las histonas y se encuentran en los extractos citosólicos (Loyola y col., 2006). Cabe destacar que se habla de "extractos citosólicos" o "citosol" y no de "citoplasma" porque el citoplasma es un compartimento sub-celular con una composición bioquímica distinta a la del extracto soluble conocido como citosol, en el cual es posible encontrar algunos de los componentes nucleares solubles como consecuencia de la metodología empleada durante el proceso de extracción. En su conjunto, las histonas citosólicas y nucleares no-nucleosomales se conocen como histonas solubles (Gunjan & Verreault, 2003) y corresponden tanto a las histonas recientemente sintetizadas, que están en tránsito

para ser depositadas en la cromatina, como a las removidas de ella durante los procesos que tienen lugar en el DNA, como la reparación, la replicación y la transcripción. Una particularidad de las histonas solubles es que poseen solo unas pocas modificaciones, a diferencia de las histonas nucleosomales que presentan una amplia gama de PTMs. Actualmente, uno de los desafíos que existen en torno al estudio de las histonas solubles es comprender cuál es la función de sus PTMs y si éstas tienen influencia en el establecimiento de las PTMs de las histonas nucleosomales y/o en el tráfico de las histonas desde que son sintetizadas hasta que se incorporan a la cromatina. Respecto a esto, por ejemplo, se ha descrito que la PTM más abundante de la histona H3 citosólica, la monometilación de la lisina 9 (H3K9me1) (Loyola y col., 2006), promueve la trimetilación en la misma lisina (H3K9me3) una vez que la histona es depositada en los nucleosomas (Loyola y col., 2006; Loyola y col., 2009). Asimismo, se ha descrito que la marca de acetilación en las lisinas 5 y 12 de la histona H4 promueve la translocación nuclear (Álvarez y col., 2011).

Debido a su carga neta positiva, las histonas pueden interactuar inespecíficamente con moléculas cargadas negativamente, tales como ácidos nucleicos y otras proteínas (Maya y col., 2011), impidiendo el correcto funcionamiento celular. Estas interacciones inespecíficas se evitan gracias a la acción de las chaperonas de histonas, las cuales son proteínas que se asocian a las histonas para asistirles en su camino desde que se sintetizan hasta que se incorporan a la cromatina, velando por su correcta entrega en los puntos de ensamblaje de los nucleosomas y evitando la formación de agregados inespecíficos (Loyola & Almouzni, 2004). Así, histonas y chaperonas de histonas dan lugar a distintos complejos proteicos.

Uno de los primeros trabajos desarrollados en el estudio de las histonas citosólicas, en células humanas HeLa, describió un único complejo que contenía a las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas (Perry y col., 1993). Un trabajo posterior, realizado también con extractos citosólicos de células HeLa, identificó nuevamente un complejo de las histonas H3 y H4 señalando, además, a la holoenzima HAT-B (del inglés "histone acetyl transferase type B") como la responsable de acetilar a la histona H4 en su patrón de PTMs clásico de pre-incorporación a la cromatina (lisinas 5 y 12 acetiladas) (Chang y col., 1997). Sin embargo, dos estudios posteriores, realizados independientemente y con distintas metodologías, postularon la existencia de una cascada de maduración de las histonas H3 y H4 citosólicas (Campos y col., 2010; Alvarez y col, 2011), la cual ocurriría a través del paso secuencial de las histonas a través de distintos complejos proteicos (Figura 1).



**Figura 1. Cascada de procesamiento posttraduccional de las histonas H3 y H4.**

En la figura, H3K9me1 = monometilación de la lisina 9 de la histona H3, H3K14ac = acetilación de la lisina 14 de la histona H3, H4K5K12ac = acetilación en lisinas 5 y 12 de la histona H4 y PAR = poli-ADP-ribosilación. Adaptado de Alvarez y col., 2011.

En una primera instancia, las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas se encuentran en complejos proteicos distintos, en donde la histona H3 se encuentra asociada a la chaperona HSC70 (complejo Ia), mientras que la histona H4 se asocia con las chaperonas HSP70 y HSP90 (complejo Ib). En el segundo paso de procesamiento (complejo II), la histona H3 se asociaría con las chaperonas tNASP y HSP90 y aquí, por primera vez, se encuentra con la histona H4. Interesantemente, en este complejo ya es posible observar la acetilación de la histona H3 (H3K14ac). En el tercer paso de procesamiento (complejo III), las histonas H3 y H4 forman un complejo que involucra a la chaperona sNASP y a la holoenzima HAT-B (HAT1 + RbAP46), junto con la isoforma B de la chaperona específica de histonas Asf1 (del inglés "Anti-Silencing Function 1"), siendo aquí en donde la histona H4 citosólica adquiere la acetilación de las lisinas 5 y 12. Finalmente, las histonas H3 y H4 interactúan con Importina-4 y con Asf1, formando un nuevo complejo que es el responsable de mediar su translocación nuclear (complejo IV). Esta cascada de maduración está conservada en levaduras (Campos y col., 2010). Todos los complejos detectados tienen un peso molecular cercano a los 250 kDa y en todos ellos se observó la marca H3K9me1. Interesantemente, el trabajo de Alvarez (Alvarez y col., 2011) sugirió la existencia de dos tipos de complejo IV, en donde el primero de ellos (complejo IVa) estaría formado por Importina-4, las histonas H3 y H4 y la isoforma A de la chaperona Asf1 (Asf1a), mientras que el segundo estaría formado por Importina-4, las histonas H3 y H4 y por Asf1b (complejo IVb). Además, los distintos complejos IV poseerían distintas PTMs en la histona H3, en donde el complejo IVa estaría enriquecido en las marcas H3K14ac y H3K9me1, y el complejo IVb estaría enriquecido en la marca H3K9me1. La posible existencia de dos tipos de complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4, asociados a distintas chaperonas y a distintas PTMs, podría implicar la existencia de

dos vías de suministro de histonas al interior del núcleo, cada una con distintos impactos en la estructura de la cromatina y en la expresión genética. Así, el objetivo del presente trabajo es recopilar evidencias que corroboren la existencia de estos dos complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4, realizando la purificación de estos complejos desde extractos citosólicos de células HeLa.

### **Hipótesis**

- Existen diferentes complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4 (complejos IVa y IVb), los cuales se diferencian entre sí en las chaperonas asociadas y en los patrones de modificaciones posttraduccionales en la histona H3.

### **Objetivo general**

- Aislar los complejos IVa y IVb para su caracterización bioquímica, determinando las chaperonas asociadas, las modificaciones posttraduccionales de la histona H3 y la proporción de las variantes de la histona H3 (H3.1 y H3.3) presente en cada uno de ellos.

### **Objetivos Específicos**

1. Purificar los complejos IVa y IVb de translocación nuclear de las histonas H3 y H4 desde extractos citosólicos S100 provenientes de cultivos asincrónicos de células HeLa.
2. Analizar, caracterizar y comparar los complejos IVa y IVb en cuanto a:
  - A. Composición proteica.
  - B. Modificaciones posttraduccionales presentes en la histona H3.
  - C. Variantes de la histona H3 (H3.1 y H3.3) asociadas a cada complejo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales y Reactivos.

Los reactivos Tris, Tris-HCl, SDS, EDTA, acrilamida y bis-acrilamida se adquirieron en Invitrogen (Estados Unidos). El cloruro de sodio y los compuestos de grado analítico Azul de Bromofenol, ácido acético, etanol, isopropanol, ácido clorhídrico fumante (37%), acetona y metanol se adquirieron en Merck (Estados Unidos). El cloruro de potasio, el sulfato de amonio, la seroalbúmina bovina en polvo liofilizado, el ácido tricloroacético y el Azul de Coomassie "Brilliant Blue G-250" se adquirieron en Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Los compuestos Rojo Ponceau S, Tween 20, NP40,  $\beta$ -mercaptoetanol y TEMED se adquirieron en Winkler (México). El glicerol de grado analítico se adquirió en Calbiochem (Alemania). Los reactivos PMSF y APS se adquirieron en AppliChem (Alemania).

Para la realización de las cromatografías se empleó un equipo ÄKTA Explorer 100 FPLC de GE Healthcare, Amersham (Estados Unidos). Las columnas de cromatografía de intercambio iónico DEAE-5PW y CM-celulosa se adquirieron en Tosoh Bioscience (Japón) y GE Healthcare (Estados Unidos), respectivamente. Las membranas de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y el estándar de peso molecular para SDS-PAGE "PageRuler™ Prestained Protein Ladder" se adquirieron en Thermo Scientific (Estados Unidos). Las membranas de diálisis "Spectra/Por" se adquirieron en Thomas Scientific (Estados Unidos) y los filtros "S-Pak", tamaño de poro 0,22  $\mu\text{m}$  con superficie

cuadriculada y 47 mm de diámetro (Número de catálogo: GSWG047S6) se adquirieron en Millipore (Estados Unidos).

Los anticuerpos primarios anti Importina-4 (N° de catálogo: ab28387), anti Histona H3 (N° de catálogo: ab1791), anti Histona H4 (N° de catálogo: ab10158) y anti HAT1 (N° de catálogo: ab12164) se adquirieron en Abcam (Estados Unidos). Los anticuerpos anti H3K9me1 (N° de catálogo: 07-450) y anti H3K9K14ac (N° de catálogo: 06-599) se adquirieron en Upstate, Millipore (Estados Unidos). El anticuerpo anti Asf1a/b se facilitó por la Dra. Geneviève Almouzni del Instituto Curie (Francia). El anticuerpo secundario anti rabbit IgG acoplado a peroxidasa de rábano (N° de catálogo: 611-7302) se adquirió en Rockland (Estados Unidos).

Los kits de quimio-luminiscencia "SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate", "SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate" y "SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate" se adquirieron en Thermo Scientific (Estados Unidos). Las soluciones de revelado y fijación, así como las películas radiográficas, se adquirieron en AGFA (Argentina).

La proteína estándar seroalbúmina bovina, a concentración 2,0 mg/ml, y el reactivo de Bradford "Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent" se adquirieron en Thermo Scientific (Estados Unidos).

Los geles de poliacrilamida en gradiente, desde el 4% al 15%, en Tris-HCl "Ready Gel® Precast Gels" (N° de catálogo: 161-1122), empleados en el SDS-PAGE de las proteínas con destino a espectrometría de masas, se adquirieron en BIO-RAD (Estados Unidos).

Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C en una centrifuga "Heraeus Fresco™ 17 Microcentrifuge W", modelo 75002420 de Thermo Scientific (Estados Unidos) o en una Ultracentrifuga "Beckman Óptima™ XL-100K Ultra centrifuge" de Beckman-Coulter (Estados Unidos), empleando el rotor SW 41 del mismo fabricante.

## 2.2. Soluciones y *Buffer*.

Todas las soluciones con concentraciones en porcentaje (p/v) o (v/v) se prepararon completando el volumen final con agua destilada.

Los *Buffer* "BC", empleados para la elución de las proteínas en las columnas cromatográficas y las diálisis, se prepararon a la concentración final de: 20 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10% (v/v) glicerol, 0,2 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol y 0,2 mM PMSF. La concentración de KCl presente en cada *Buffer* BC es variable y determina el número que acompaña a "BC" en su nomenclatura (Ej.: *Buffer* "BC 50" corresponde a un *Buffer* BC cuya concentración final de KCl es de 50 mM, mientras que un *Buffer* "BC 500" corresponde a un *Buffer* BC con 500 mM de KCl). Tanto el β-mercaptoetanol como el PMSF se incorporaron al momento de su uso, previo a la filtración del *Buffer*.

El *Buffer* de Laemmli 5X se preparó con una concentración final de 10% (p/v) SDS, 25% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol y 312,5 mM Tris-HCl, agregando 50 mg/ml de Azul de Bromofenol para colorear. Para la preparación de las muestras destinadas a SDS-PAGE, se diluyó este *Buffer* en la muestra hasta una concentración 1X.

Para realizar el SDS-PAGE se utilizó *Buffer* de corrida 10X (con concentraciones de 250 mM Tris, 2 M Glicina y 1% (p/v) SDS), diluido 10 veces en agua destilada. El *Buffer* de transferencia, empleado para la transferencia de las proteínas desde los geles de poliacrilamida hacia las membranas de PVDF, se preparó con *Buffer* de corrida 10X, metanol y agua destilada en proporciones 1:2:7, respectivamente.

La solución de Bloqueo, empleada para el bloqueo de las membranas de PVDF una vez terminada la transferencia, se preparó con leche descremada al 5% (p/v) o BSA liofilizada al 1% (p/v) en T-TBS 1X, formulado con concentraciones de 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl y 0.1% (v/v) Tween-20.

Para la tinción de los geles de poliacrilamida con Azul de Coomassie, se empleó una solución compuesta por 0,2% (p/v) Azul de Coomassie, 20% (v/v) metanol y 5% (v/v) ácido acético. La solución empleada para el destefido de los geles tuvo una composición de 20% (v/v) metanol y 7,5% (v/v) ácido acético.

La tinción de las membranas de PVDF se realizó con una solución de 0,1% (p/v) Rojo Ponceau y 5% (v/v) ácido acético.

### 2.3. Geles.

Los geles separadores de poliacrilamida empleados en SDS-PAGE se prepararon a la concentración requerida de acrilamida, con una proporción de acrilamida-bisacrilamida de 30:0,8. Cada gel tuvo una concentración final de 36,6 mM



Tris (pH 8,8) y 0,1% (p/v) SDS. Para su polimerización, se añadieron APS y TEMED a concentraciones finales de 0,07% (p/v) y 0,24% (v/v), respectivamente.

Los geles concentradores empleados en SDS-PAGE se prepararon a la concentración final de 4% (p/v) acrilamida, con una proporción de acrilamida-bisacrilamida de 30:0,8. Cada gel tuvo concentraciones finales de 12,2 mM Tris-HCl (pH 6,8) y 0,1% (p/v) SDS. Para su polimerización, se añadieron APS y TEMED a concentraciones finales de 0,12% (p/v) y 0,5% (v/v), respectivamente.

#### **2.4. Extractos citosólicos S100 de células HeLa.**

Los extractos citosólicos S100, utilizados para la purificación de los complejos citosólicos de las histonas H3 y H4, se facilitaron por el laboratorio del Dr. Danny Reinberg (NYU, Estados Unidos) y se prepararon en base al protocolo descrito por Dignam (Dignam y cols, 1983), almacenándose a -80°C hasta el momento de su uso.

Brevemente, se cultivaron en suspensión células HeLa, se removió el medio de cultivo (centrifugando a 3000 r.p.m. durante 8 min) y el *pellet* de células se lavó dos veces con PBS, resuspendiendo en este *Buffer*. Se tomó una alícuota de la suspensión celular, se añadió un volumen de Azul de Tripán 2X (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se realizó el conteo celular.

Luego, las células se centrifugaron por 10 minutos a 3000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 5 volúmenes de *Buffer A* (*Buffer* hipotónico, con concentraciones finales de 10 mM Tris (pH 7,9), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT y 0,2 mM PMSF), dejándolas reposar por 10 min a 4°C. Se

centrifugaron las células durante 10 minutos, a 10000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se añadieron 2 volúmenes de *Buffer A*, para luego homogenizar las células con un homogenizador de vidrio con mano de mortero B, a 4°C. Se centrifugó el homogenizado por 10 minutos, a 10000 r.p.m., se recuperó el sobrenadante y se añadieron 0,1 volúmenes de *Buffer B 10x* (*Buffer* de extracción citoplasmática, formulado con concentraciones de 300 mM Tris (pH 7,9), 1,4 M KCl y 30 mM MgCl<sub>2</sub>), mezclando vigorosamente. Se centrifugó durante 1 hora, a 30000 r.p.m. (100000 x g), y se recuperó el sobrenadante (que corresponde al extracto S100) para realizar su diálisis contra 4 L de *Buffer BC 50* durante 4 horas, a 4°C. Se centrifugó el dializado por 20 minutos, a 12000 r.p.m., para eliminar materiales precipitados y se recuperó el sobrenadante, midiéndose la concentración de proteínas.

## **2.5. Medición de proteínas.**

Todas las mediciones de proteínas se realizaron por medio del método de Bradford.

## **2.6. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.**

La precipitación de proteínas con sulfato de amonio se realizó por el Dr. César Díaz, en nuestro laboratorio. Brevemente, se descongelaron 720 ml de los extractos citosólicos S100 y se centrifugaron a 20000 x g durante 25 minutos, rescatándose el sobrenadante y descartándose el *pellet*. Al sobrenadante recuperado, se le añadieron poco a poco y en constante agitación 78,48 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para alcanzar un 20% de

saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , luego, se dejó agitando durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . Se centrifugó la mezcla a  $20000 \times g$ , durante 25 min, y se recuperó el sobrenadante, en el cual se encontraron las histonas citosólicas conforme a los resultados de los ensayos de Western blot realizados. A este sobrenadante, se les añadieron lentamente 86,75 g adicionales de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , también en constante agitación, hasta alcanzar un 40% de saturación. Se agitó la mezcla durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  y luego se centrifugó por 25 min a  $20000 \times g$ , recuperándose el sobrenadante, en el cual se encontró a las histonas citosólicas, conforme a los resultados obtenidos a través de Western blot.

## 2.7. Diálisis

Las diálisis se realizaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 4 horas contra *Buffer* BC, a la concentración de KCl y glicerol requerida.

## 2.8. Cromatografía de Intercambio Iónico.

Se realizaron tres pasos de cromatografía de intercambio aniónico empleando la columna DEAE-5PW de 20 ml, cuya capacidad máxima de unión a proteínas, según las especificaciones del fabricante, es igual a 600 mg de BSA.

Durante el primer paso de cromatografía de intercambio aniónico se purificaron 980 mg de proteína, equilibrando previamente la columna con 3 volúmenes de *Buffer* BC 50. Cabe destacar que este proceso se repitió 7 veces debido a la capacidad máxima de la columna. La elusión se realizó con *Buffer* BC en una gradiente salina lineal de 200 ml, desde los 50 mM hasta los 500 mM de KCl. Se recolectaron

fracciones de 3,5 ml y el *peak* de elusión de las histonas se determinó a través de Western blot. A partir de estos resultados, se juntaron las fracciones correspondientes a los *peaks* de H3 y se formó un "*pool*" de proteínas, las cuales se dializaron contra *Buffer* BC 50. Con ellas, se continuó la purificación en un segundo paso de cromatografía de intercambio aniónico.

La segunda cromatografía de intercambio aniónico se realizó de manera similar a la primera, equilibrando la columna DEAE-5PW con 3 volúmenes de *Buffer* BC 50 antes de ser cargada con los 406 mg de proteínas recuperadas en el paso anterior. Cabe destacar que este proceso se repitió 3 veces debido a la capacidad máxima de la columna. Se realizó la elusión de las proteínas con *Buffer* BC, en una gradiente salina lineal de 200 ml desde los 50 mM hasta los 350 mM de KCl y se recolectaron fracciones de 3,5 ml, determinando el *peak* de elusión de las histonas por medio de Western blot. Una vez determinado el *peak*, se juntaron las fracciones correspondientes para formar un nuevo *pool* de proteínas, dializarlas contra *Buffer* BC 50 y continuar su purificación en un nuevo paso de cromatografía de intercambio aniónico.

El tercer paso de cromatografía de intercambio aniónico se realizó nuevamente en la columna DEAE-5PW, siguiendo la misma metodología antes señalada. En esta oportunidad, la columna se equilibró con *Buffer* BC 110 antes de cargar en ella 140 mg de proteínas. La elusión de la columna se realizó con 180 ml de *Buffer* BC en una gradiente salina lineal de 110 mM hasta 250 mM de KCl. Se recolectaron fracciones de 3,5 ml y el *peak* de elusión de las histonas se determinó mediante Western blot, para luego formar el *pool* de proteínas correspondiente y continuar su purificación a través de cromatografía de intercambio catiónico

La cromatografía de intercambio catiónico se realizó empleando dos columnas CM-celulosa conectadas en serie, cada una con un volumen de 1 ml y una capacidad máxima de unión a proteínas equivalente a 50 mg de Ribonucleasa A, según las especificaciones del fabricante. Para la purificación del complejo IVa, se cargaron en las columnas 21,6 mg de las proteínas recuperadas desde el último paso de cromatografía de intercambio aniónico. Para la purificación del complejo IVb, se cargaron en las columnas 22,1 mg de proteínas. Previo a la carga de las proteínas, en ambos casos, las columnas se equilibraron con 3 volúmenes de *Buffer* BC 50. La elución de los complejos IVa y IVb se realizó con 5 ml de *Buffer* BC en una gradiente salina lineal desde los 50 mM hasta los 600 mM de KCl y se recolectaron fracciones de 0,1 ml. El *peak* de elución de las histonas se determinó mediante Western blot.

### **2.9. Sedimentación al equilibrio en gradientes de glicerol.**

Se preparó una primera gradiente lineal de glicerol desde el 5% hasta el 30% (v/v). Para la confección de esta gradiente, se prepararon 6 soluciones con concentraciones finales de 10 mM Tris (pH 7,5), 0,4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,01% (v/v) NP40, 0,2 mM PMSF y 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. Las concentraciones de glicerol en cada solución fueron de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% y 30% (v/v). De cada una de las soluciones preparadas, se tomaron 1,6 ml y se dispusieron por capas en un tubo apto para ultracentrifugación (Beckman-Coulter, Estados Unidos) de forma tal que la capa inferior tuviera la mayor concentración de glicerol y las subsecuentes superiores tuvieran concentraciones decrecientes. Una vez formada la gradiente, se dejó reposar durante 4 horas a 4°C. Dado que las proteínas a cargar en esta primera gradiente de

glicerol provenían de la columna CM-celulosa eluída con *Buffer* BC al 10% (v/v) glicerol, la muestra se diluyó en *Buffer* BC 50 0% (v/v) glicerol. Una vez dispuesta la muestra sobre la gradiente, la centrifugación se realizó a 27000 r.p.m. durante 16 hrs, a 4°C. Luego, se procedió a cortar las gradientes tomando sucesivamente, y desde la superficie, 300 µl que se dispusieron en distintos tubos.

Para los siguientes dos pasos de purificación en gradiente de glicerol, las gradientes se confeccionaron con rangos de concentración desde el 0% al 20% (v/v) y desde el 0% al 8% (v/v). Las condiciones de centrifugación y corte para estas dos gradientes se realizaron como la primera gradiente.

#### **2.10. Western blot.**

Luego de transferir las proteínas desde los geles de poliacrilamida a las membranas de PVDF, a una corriente de 300 mA por 80 min, éstas se tiñeron usando la solución de Rojo Ponceau, durante 5 min, y se destiñeron con metanol al 100%. El bloqueo de las membranas se realizó utilizando la solución de bloqueo descrita, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las membranas con anticuerpo primario a la dilución requerida, durante 16 horas, a 4°C. Los anticuerpos primarios se prepararon en solución de bloqueo 1X. Luego de la incubación con anticuerpo primario, se lavaron las membranas 3 veces con T-TBS 1X, durante 5 min cada vez, y se incubaron las membranas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano, durante 45 min, a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se preparó en T-TBS 1X en proporción de 1:5000. Posteriormente, las membranas se lavaron 3

veces con T-TBS 1X, durante 5 min cada vez, y se revelaron utilizando los distintos reactivos de quimioluminiscencia.

### **2.11. Precipitación de proteínas con TCA.**

Para la precipitación de proteínas con TCA, éste se agregó a las muestras hasta alcanzar una concentración de 10% (v/v), mezclando vigorosamente. Las muestras se dejaron reposar durante toda la noche, a 4°C, y finalizado este lapso se centrifugaron a 12000 r.p.m., durante 15 min, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* dos veces con acetona a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 15 min, a 4°C, y se eliminó la acetona. El *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente, durante 15 min, y las proteínas se resuspendieron en *Buffer* Laemmli 1X.

### **2.12. Espectrometría de masas MALDI-TOF.**

Una vez purificados los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4, las proteínas se sometieron a SDS-PAGE, los geles de poliacrilamida se tiñeron con la tinción de Azul de Coomasie descrita y se cortaron los trozos de gel que contenían las bandas, las cuales se enviaron al laboratorio del Dr. Axel Imhof (LMU, Munich), para la identificación de proteínas y análisis de PTMs de las histonas a través de espectrometría de masas.

Brevemente, los trozos de gel se destiñieron, lavándolos con 200 µl de agua grado HPLC y agitándolos por 1 minuto a 37°C, para luego eliminar el sobrenadante y

agregar una mezcla de 50% (v/v) acetonitrilo y 50 mM bicarbonato de amonio. Los trozos de gel se agitaron a 37°C, durante 30 min, hasta que la tinción desapareció. Posteriormente, se lavaron con 200 µl de agua grado HPLC y se removió el sobrenadante. Para la identificación de las proteínas presentes en cada banda, los trozos de gel se trataron con 200 ng de tripsina grado secuenciación (Promega, Estados Unidos) y la digestión se llevó a cabo durante toda la noche, a 37°C. Los productos de digestión se colectaron desde el sobrenadante y los péptidos remanentes en los trozos de gel se extrajeron por medio de tratamiento ácido, añadiendo primero 25 mM bicarbonato de amonio y luego 5% (v/v) ácido fórmico. Los péptidos colectados del sobrenadante y los extraídos desde los geles se concentraron, utilizando una *Speed Vac*, resuspendiéndolos en 0,1% (v/v) TFA. Las muestras se desalinizaron, empleando puntas de pipeta ZipTip µC18 (Millipore, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se eluyeron directamente en la placa blanco del espectrómetro de masas (modelo Voyager DE STR de Applied Biosystems, Estados Unidos) empleando una solución saturada de ácido α-cinámico en 0,3% (v/v) TFA y 50% (v/v) Acetonitrilo. Los péptidos obtenidos se identificaron por medio del método "*Peptide Mass Fingerprint*", comparándolos con la información presente en la base de datos NCBI nr del NCBI (Por sus siglas, en Inglés, de National Center for Biotechnology Information) y que compila las secuencias aminoacídicas no-redundantes de las proteínas ingresadas en las bases de datos SWISS-PROT, GenBank, EMBL, DDBJ, PIR, PRF y PDB. Para tal comparación, se usó el software "*Mascot™*" de Matrix Science. Para los análisis de las PTMs presentes en los extremos amino-terminales de las histonas, los trozos de gel que las contenían se destiñeron bajo el mismo procedimiento antes mencionado, pero se sometieron a un tratamiento con 2 µl de anhídrido propiónico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 48 µl

de 1M bicarbonato de amonio, para bloquear los residuos de lisina que se encuentren mono-metilados o sin PTMs. Luego de 1 hora, los trozos de gel con las histonas bloqueadas se lavaron con agua grado HPLC y se digirieron con 200 ng de tripsina, a 37°C, durante toda la noche. Las histonas con los residuos de lisina bloqueados solo son proteolizadas en residuos de arginina, generándose péptidos aptos para su caracterización por medio de espectrometría de masas bajo los mismos procedimientos descritos en el párrafo anterior. Todas las modificaciones que ocurren en los extremos amino-terminales de las histonas se cuantificaron utilizando el software "Manuelito", desarrollado por el Departamento de Biología Molecular del Instituto Adolf-Butenandt (LMU, Munich), integrándose el área bajo la curva de la señal obtenida en el espectrómetro de masas y realizando la razón entre este valor y el de la señal obtenida para un péptido "R10", los cuales corresponden a péptidos de histonas con toda la gama de PTMs conocidas y que están marcados con "argininas pesadas", lo que les confiere un peso molecular de 10 Da mayor al de los péptidos no marcados. La incorporación de los péptidos R10 se realiza al momento de la digestión con tripsina, consolidándose, además, como un control interno de digestión. Una vez realizadas las cuantificaciones, los gráficos se realizaron en el programa Excel.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento de los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4.

Para realizar el aislamiento de los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4 se emplearon distintos pasos de purificación bioquímica, los cuales se presentan en el esquema de purificación de la Figura 2.

##### 3.1.1. Precipitación con sulfato de amonio y primera cromatografía de intercambio aniónico.

La purificación comenzó con 8,0 g de proteína total, provenientes de extractos citosólicos S100 derivados de células HeLa crecidas asincrónicamente, de acuerdo al protocolo descrito por Dignam (Dignam y col., 1983). Se realizó un primer fraccionamiento de los extractos S100 por medio de precipitación con sulfato de amonio, al 20% de saturación, originándose 2 fracciones: la fracción "sobrenadante", con las proteínas que a esta concentración de sal se mantuvieron solubles, y la fracción "*pellet*", con las proteínas precipitadas. Por medio de Western blot (Figura 3A), se determinó que la histona H3 se encontraba en la fracción sobrenadante, desde la cual se recuperaron los 8,0 g de proteína. Entonces, las proteínas se sometieron a una segunda precipitación con sulfato de amonio, al 40% de saturación. A través del



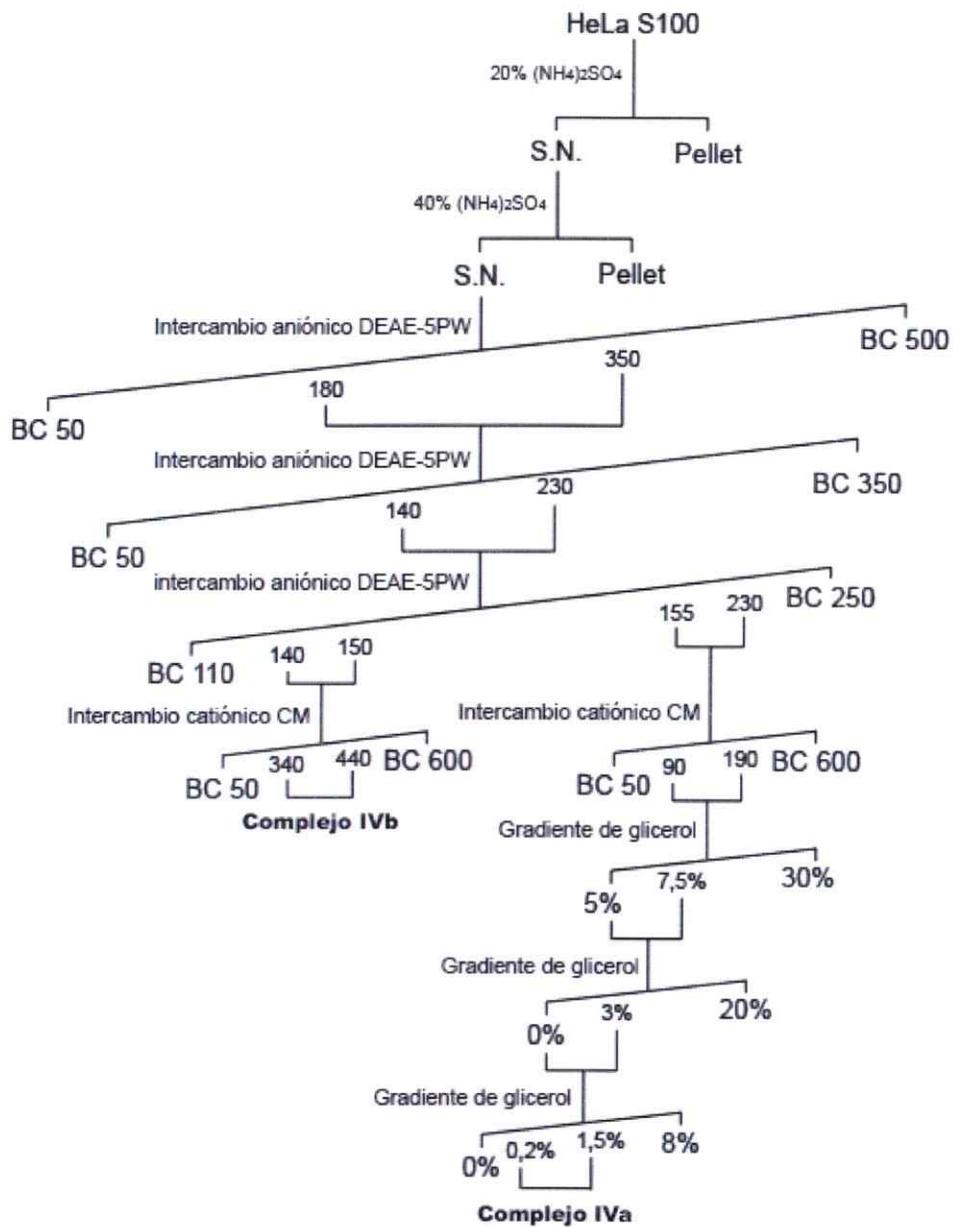
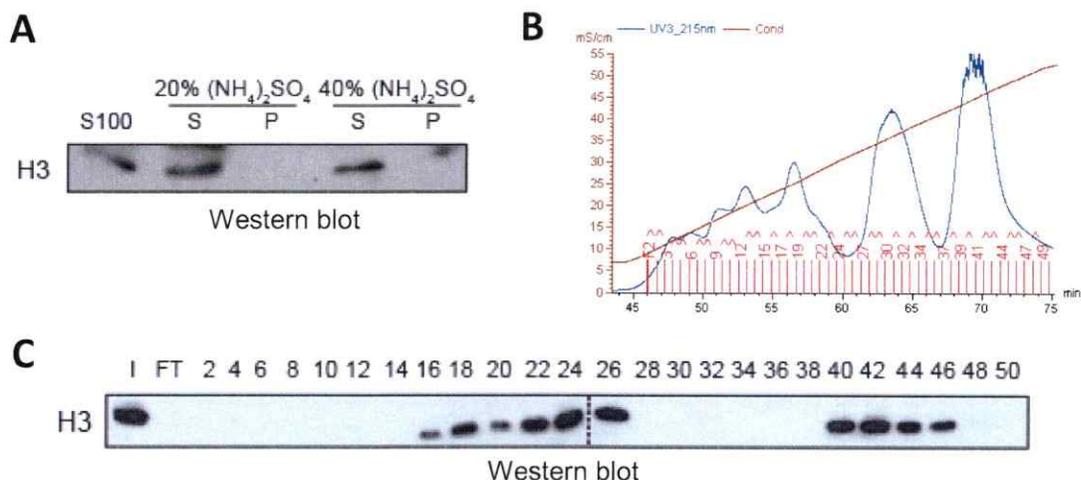


Figura 2. Esquema de purificación de los complejos de translocación nuclear de las histonas citosólicas H3 y H4. S.N.= Sobrenadante

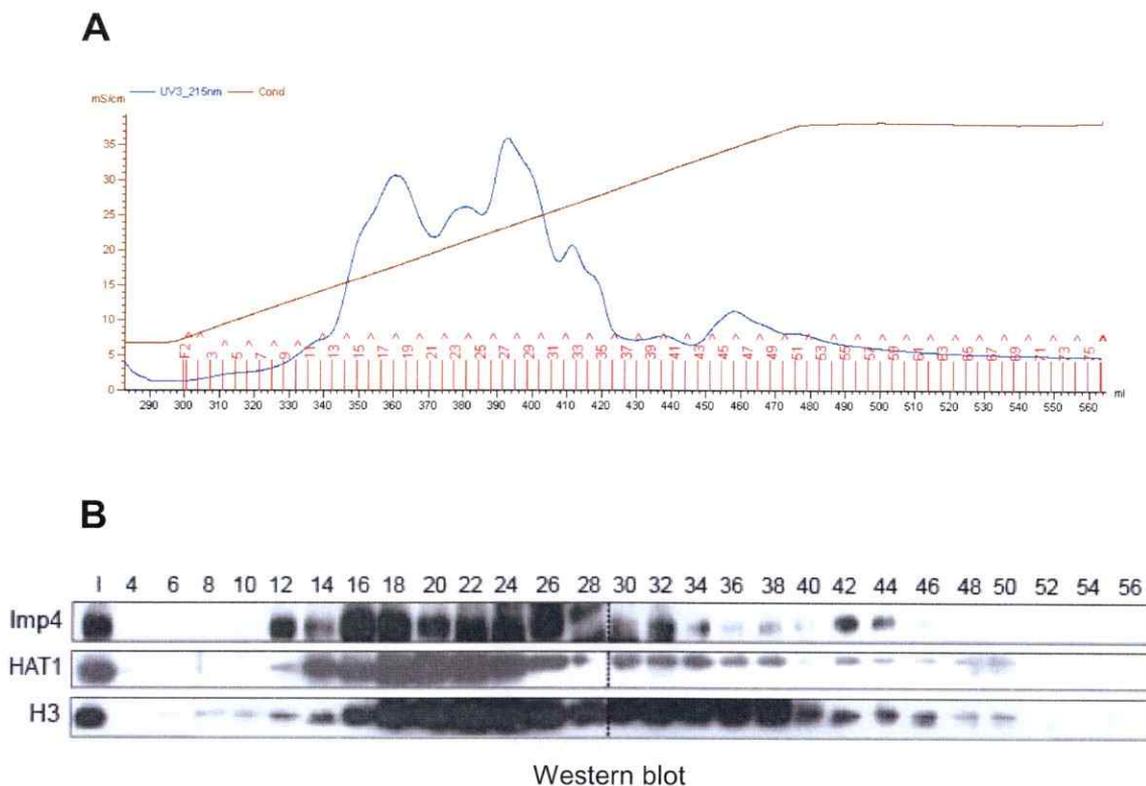


**Figura 3. Precipitación con sulfato de amonio y primera cromatografía de intercambio aniónico. (A) Análisis de Western blot.** Se analizaron 40  $\mu\text{g}$  de las fracciones "sobrenadante" y "pellet" de las precipitaciones realizadas con 20% y 40% de saturación de sulfato de amonio, tal como se indica. S100=Extractos S100, S=Sobrenadante, P=Pellet. **(B) Cromatograma de elución de la primera columna DEAE-5PW.** La línea azul corresponde a la absorbancia de las eluciones, medida a una longitud de onda de 215 nm. La línea café corresponde a la conductividad de las eluciones. Las líneas rojas verticales presentes en el eje horizontal representan las fracciones colectadas. La imagen corresponde a un cromatograma representativo de las siete columnas corridas con el sobrenadante de la precipitación al 40% de saturación de sulfato de amonio. **(C) Análisis de Western blot.** En los geles de acrilamida se cargaron alícuotas de igual volumen de la muestra "Input" (carril 1), correspondiente al sobrenadante de la precipitación al 40% de saturación de sulfato de amonio, y de las fracciones pares colectadas en la columna DEAE-5PW.

Western blot, se determinó que la histona H3 se encontraba en la fracción sobrenadante, recuperándose 5,2 g de proteína total. De las proteínas recuperadas, 980 mg se cargaron en la columna DEAE-5PW, la cual se eluyó con un gradiente de sal de 50 mM a 500 mM de KCl obteniéndose los distintos *peaks* de proteínas que se muestran en el cromatograma de la Figura 3B. Por medio de Western blot, se observaron distintos *peaks* de elución de la histona H3, correspondientes a las fracciones 18, 24 y 42 (Figura 3C). Según resultados previos del laboratorio (Alvarez y col., 2011), bajo estas condiciones de elución de la columna DEAE-5PW, el *peak* de la histona H3 que se observa en la fracción 18 correspondería a los complejos de translocación nuclear IVa y IVb, el *peak* de la fracción 24 correspondería al complejo III y finalmente, el *peak* de la fracción 42 correspondería al complejo II. Así, se reunieron las fracciones de la 12 a la 27, formándose un *pool* de proteínas en el que se recuperaron 406 mg.

### 3.1.2. Segunda cromatografía de intercambio aniónico.

Se continuó la purificación de los complejos en una segunda cromatografía, empleando la columna DEAE-5PW. La elución se realizó con un gradiente salino lineal de 50 mM hasta 350 mM de KCl. La Figura 4A muestra el cromatograma obtenido, en donde se aprecian los distintos *peaks* de proteínas. Los análisis de Western blot sobre las fracciones colectadas, presentados en la Figura 4B, muestran la presencia de Importina-4, con *peaks* en las fracciones 16, 26 y 42. Al analizar la presencia de HAT1, se observó un *peak* en la fracción 20. Con respecto a H3, se observaron *peaks* en las fracciones 18 y 22, así como un *peak* tardío en la fracción 38. Con esto y en base a los resultados previos de nuestro laboratorio, se determinó que

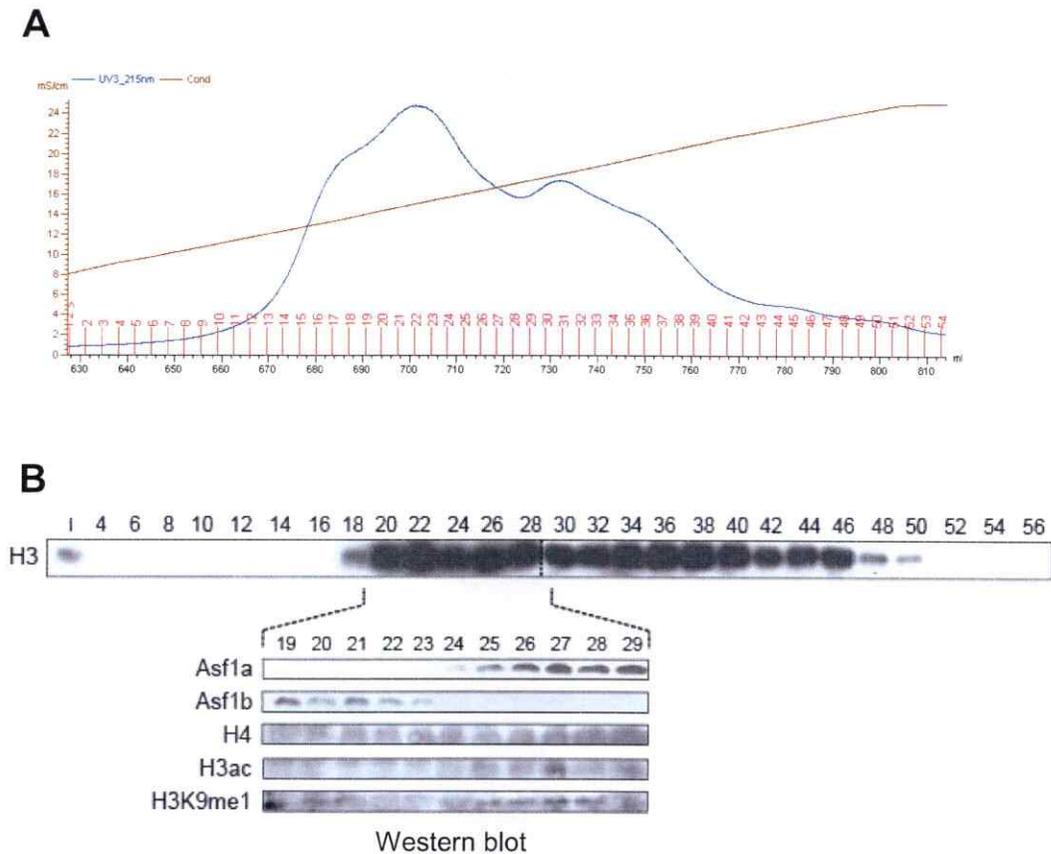


**Figura 4. Perfil de elución de la segunda columna DEAE-5PW. (A) Cromatograma de elución.** La línea azul corresponde a la absorbancia de las eluciones, medida a una longitud de onda de 215 nm. La línea café corresponde a la conductividad de las eluciones. Las líneas verticales de color rojo, presentes en el eje horizontal, indican las fracciones colectadas. La Figura corresponde a un cromatograma representativo de las tres columnas corridas. **(B) Análisis de Western blot.** En los geles de acrilamida se cargaron alícuotas de igual volumen de la muestra "Input" (carril "1") y de las fracciones pares colectadas. Se analizó la presencia de Importina-4, HAT1 y H3, como se indica.

los complejos IVa y IVb estaban entre las fracciones 18 y 28, en donde también está el complejo III según la presencia de HAT1. Se formó entonces un *pool* con estas fracciones y se recuperó un total de 140 mg de proteína total.

### 3.1.3. Tercera cromatografía de intercambio aniónico.

Se continuó la separación de los complejos IVa y IVb por medio de una tercera cromatografía en la columna DEAE-5PW, empleando una gradiente salina lineal de 110 mM a 250 mM de KCl. En la Figura 5A se presenta el cromatograma obtenido, en donde se aprecian los distintos *peaks* de proteínas. Para monitorear la presencia de los complejos IVa y IVb en la elución de la columna se analizaron, por medio de Western blot, las fracciones pares colectadas (Figura 5B). Los resultados indicaron la presencia de *peaks* de histona H3 en las fracciones 22, 26 y 38. Para analizar en mayor detalle los dos primeros *peaks* de histona H3 que corresponderían a los complejos de translocación nuclear, se analizaron las fracciones 19 a la 29. En ellas, se observó la presencia de Asf1b en las fracciones 19 a la 23, mientras que Asf1a se observó en las fracciones 25 a la 29. H4 se observó en todas las fracciones. La marca de H3K9me1 se detectó en las fracciones 19 a la 21 y 24 a la 29, con un *peak* en la fracción 27. Por otra parte, se observó un *peak* de H3ac en la fracción 27. Por lo tanto, el complejo IVa se encontró enriquecido en las fracciones 25 a la 28, mientras que el complejo IVb se encontró en las fracciones 19 a la 22. En consecuencia, se formaron los *pools* de proteínas IVa y IVb correspondientes, recuperándose 21,6 mg de proteína en el *pool* IVa y 22,1 mg en el *pool* IVb.



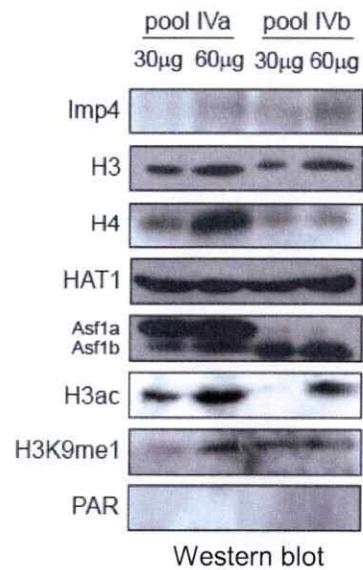
**Figura 5. Perfil de elución de la tercera columna DEAE-5PW. (A) Cromatograma de elución.** La línea azul corresponde a la absorbancia de las eluciones, medida a la longitud de onda de 215 nm. La línea café corresponde a la conductividad de cada volumen de elución. Las líneas verticales de color rojo indican las fracciones colectadas. **(B) Análisis de Western blot.** En los geles de acrilamida se cargaron alícuotas de la muestra Input (carril "I"), y de las fracciones colectadas de la columna. Se monitoreó la presencia de la histona H3, Asf1a/b, histona H4, H3ac y H3K9me1, como se indica.

#### 3.1.4. Comparación de las fracciones enriquecidas en los complejos IVa y IVb.

Una vez separados los complejos IVa y IVb, se realizó un Western blot con alícuotas derivadas de los respectivos *pools*. En la Figura 6 se muestra que tanto el *pool* IVa como el *pool* IVb contienen Importina-4, histona H3, histona H4 y HAT1. Como se esperaba, al analizar la chaperona Asf1 se observó que el *pool* IVa estaba enriquecido en la isoforma A, mientras que el *pool* IVb en la isoforma B. Al analizar las modificaciones posttraduccionales de la histona H3, se observó el complejo IVa estaba enriquecido en H3ac, mientras que el complejo IVb estaba enriquecido en H3K9me1. Curiosamente, las bandas correspondientes a las histonas del complejo IVb presentaron un peso molecular aparentemente mayor al de las bandas de las histonas del complejo IVa.

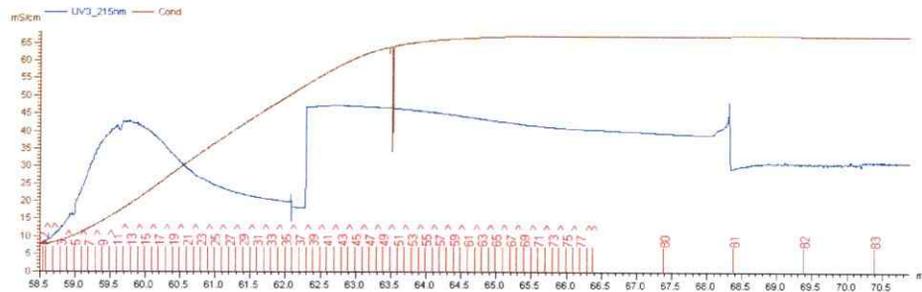
#### 3.1.5. Cromatografía de intercambio catiónico del complejo IVa.

Para lograr una mayor purificación del complejo IVa, se continuó con una cromatografía de intercambio catiónico. El *pool* IVa de proteínas se cargó en la columna CM-celulosa y se eluyó con una gradiente salina de 50 mM a 600 mM de KCl. En la Figura 7A se muestra el cromatograma obtenido, en donde se aprecia la elución de las proteínas de acuerdo a la concentración de sal. Las fracciones pares colectadas se analizaron por medio de Western blot, el cual se presenta en la Figura 7B. Se observó que la histona H3 eluyó en las fracciones 16 a la 30, con un *peak* de elución en la fracción 20. Concordantemente, en esta fracción se observó el *peak* de elución de Importina-4. Respecto a Asf1, se observó que la isoforma a se distribuyó en todas las fracciones colectadas de la columna, con un *peak* de elución en las fracciones 18 a

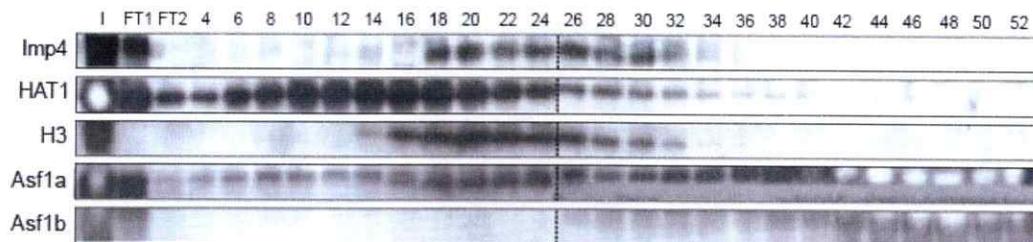


**Figura 6. Análisis de Western blot de las fracciones enriquecidas en los complejos IVa y IVb.** Los dos primeros carriles corresponden a la fracción de proteínas enriquecidas en el complejo IVa (*pool IVa*), mientras que los dos últimos carriles corresponden a la fracción de proteínas enriquecidas en el complejo IVb (*pool IVb*), como se indica.

A



B



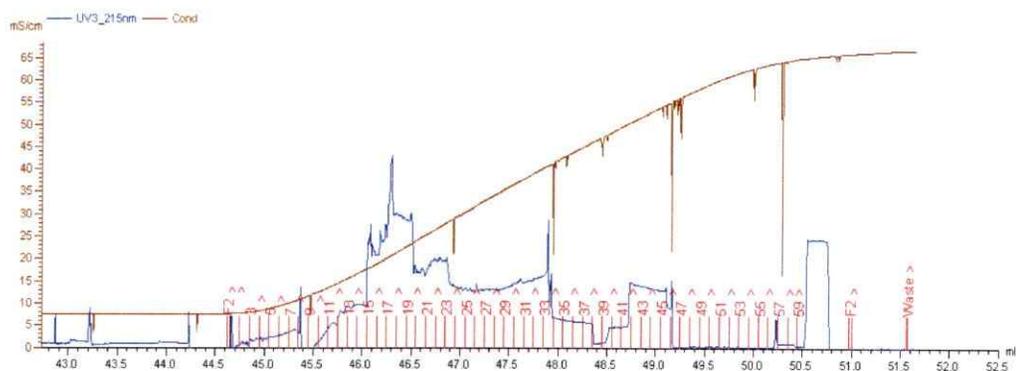
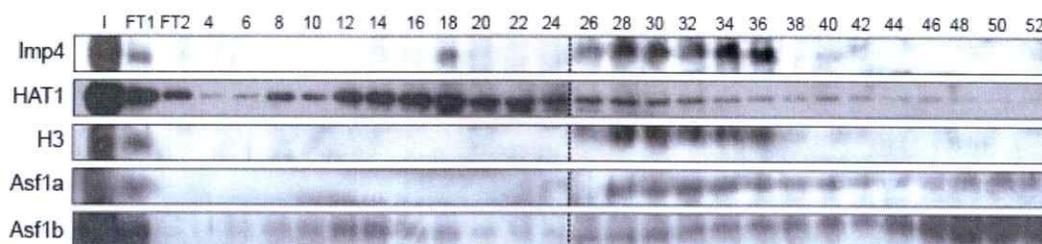
Western blot

**Figura 7. Perfil de elución del complejo IVa en la columna CM-celulosa. (A) Cromatograma de elución.** La línea azul corresponde a la absorbancia de las eluciones, medida a la longitud de onda de 215 nm. La línea café corresponde a la conductividad de cada volumen de elución. Las líneas verticales de color rojo indican las distintas fracciones colectadas. Los quiebres que se observan en las curvas de conductividad y de absorbancia se deben a la presencia de burbujas en la columna. **(B) Análisis de Western blot.** En los geles de acrilamida se cargaron alícuotas de la muestra "Input" (carril "I"), de las fracciones de proteínas no retenidas en la columna (carriles "FT1" y "FT2") y de las fracciones pares colectadas, tal como se indica.

la 24. La isoforma b, en tanto, tuvo su *peak* de elución en las fracciones 42 a la 52. Finalmente, se encontró que HAT1 eluyó en las fracciones 4 a la 32, con un *peak* entre las fracciones 10 a la 16. Con estos resultados, se decidió formar un nuevo *pool* de proteínas con las fracciones 18 a la 28, recuperándose un total de 1,78 mg de proteína.

### 3.1.6. Cromatografía de intercambio catiónico del complejo IVb.

Para lograr una mayor pureza del complejo IVb, se continuó con la purificación a través de una cromatografía de intercambio catiónico. El *pool* IVb de proteínas se cargó en la columna CM-celulosa y se eluyó con una gradiente salina de 50 mM a 600 mM de KCl. La Figura 8A muestra el cromatograma obtenido con los distintos *peaks* de proteínas eluidas de acuerdo a la concentración de sal. Las fracciones pares colectadas se analizaron por medio de Western blot, el cual se presenta en la Figura 8B. Se observó la elución de la histona H3 entre las fracciones 28 y 36, con un *peak* en las fracciones 28 a la 30. Concordantemente, Importina-4 se detectó en las fracciones 26 a la 36 y presentó un *peak* de elución en las fracciones 28 a la 30. Asf1b se detectó en varias fracciones, con *peaks* en las fracciones 12 a la 14 y 48 a la 52. Asf1a se encontró entre las fracciones de la 28 a la 52, con *peaks* en las fracciones 30 a la 32 y 50. Al analizar HAT1, ésta se observó distribuida en todas las fracciones colectadas de la columna, con *peaks* en las fracciones 8, 12 y 18. Con estos resultados, se determinó que el complejo IVb eluyó entre las fracciones 28 a la 36 y, luego de formar el *pool* de proteínas correspondiente, se recuperaron 0,22 mg de proteína total.

**A****B**

Western blot

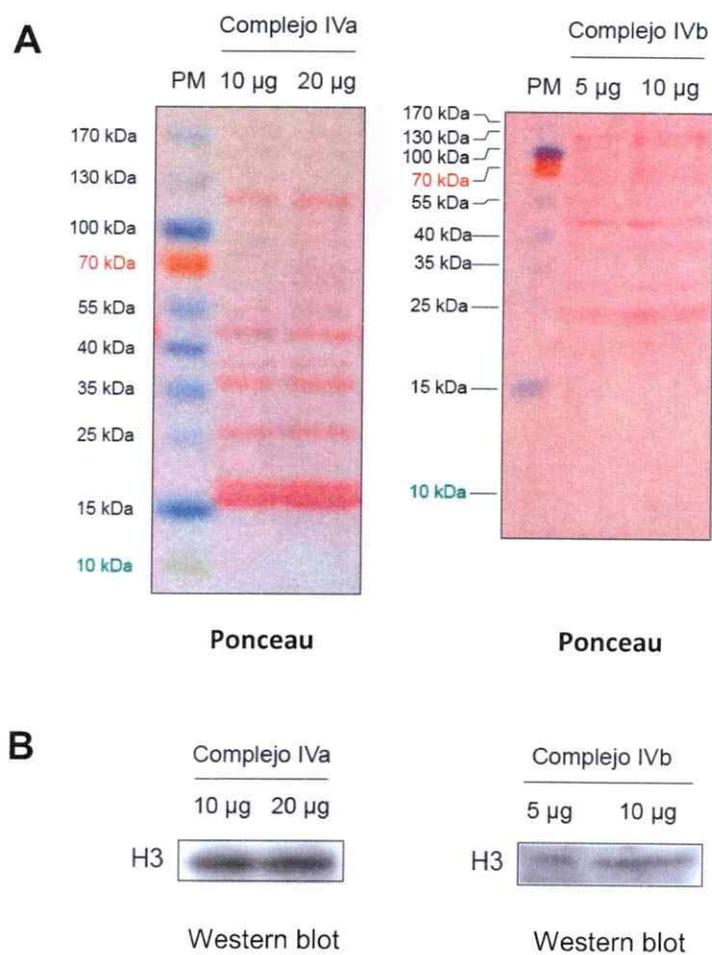
**Figura 8. Perfil de elución del complejo IVb en la columna CM-celulosa. (A) Cromatograma de elución.** La línea azul corresponde a la absorbancia de las eluciones, medida a la longitud de onda de 215 nm. La línea café corresponde a la conductividad de cada volumen de elución. Las líneas verticales en color rojo indican las fracciones colectadas. Los quiebres que se observan en las curvas de absorbancia y conductividad se deben a la presencia de burbujas en la columna. **(B) Análisis de Western blot.** En los geles de acrilamida se cargaron alícuotas de la muestra "Input" (carril "I"), de las fracciones de proteína no retenida en la columna (carriles "FT1" y "FT2") y de las fracciones pares colectadas, tal como se indica.

### 3.1.7. Análisis del grado de purificación logrado para los complejos IVa y IVb.

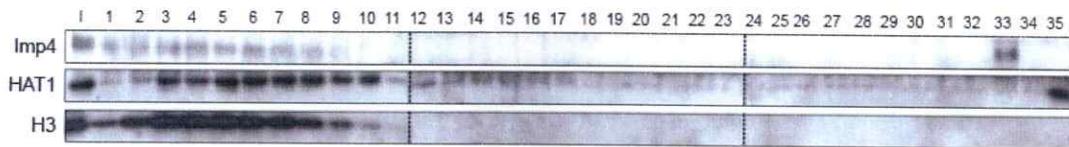
Para comprobar el grado de purificación logrado sobre ambos complejos tras finalizar las etapas de cromatografía, se realizó una tinción con Rojo Ponceau de las proteínas purificadas. Para ello, se cargaron alícuotas de las fracciones enriquecidas en los complejos en los geles de acrilamida, detectándose bandas con distintos pesos moleculares en ambos complejos (Figura 9A). Los análisis de Western blot (Figura 9B), corroboraron la presencia de la histona H3 en ambos complejos. En base a estos resultados, se decidió continuar la purificación del complejo IVa, debido a la presencia abundante de una proteína de un tamaño molecular similar al de la histona H3, que podría afectar los análisis de espectrometría de masas.

### 3.1.8. Primera sedimentación al equilibrio para el complejo IVa.

Para continuar la purificación del complejo IVa, se emplearon tres sedimentaciones al equilibrio en gradientes de glicerol. La primera gradiente se realizó con un rango de concentraciones de 5% al 30% (v/v). Una vez cortada, las fracciones obtenidas se analizaron a través de Western blot, el cual se presenta en la Figura 10. Los análisis realizados señalaron que la histona H3 llegó al equilibrio con un *peak* entre las fracciones 3 a la 6. Dicho *peak* concordó con el *peak* de Importina-4. Por su parte, el *peak* de HAT1 se encontró entre las fracciones 5 a la 8, ligeramente desplazado del *peak* de H3. Con estos resultados, se determinó que la histona H3 logró el equilibrio dentro de la gradiente en una concentración de glicerol estimada de entre 5% y 7,3% (v/v). En consecuencia, se tomaron las fracciones 3 a la 6 y se formó un nuevo *pool* de proteínas, en el cual se recuperaron 0,48 mg de proteína total.



**Figura 9. Análisis del grado de purificación de los complejos IVa y IVb. (A) Tinción con Rojo Ponceau.** En los geles de acrilamida se cargaron 10  $\mu$ g y 20  $\mu$ g de la fracción enriquecida en complejo IVa, y 5  $\mu$ g y 10  $\mu$ g de la fracción enriquecida en complejo IVb, tal como se indica. PM=Marcador de peso molecular. **(B) Análisis de Western blot.** La misma membrana empleada en la tinción con Rojo Ponceau se incubó con el anticuerpo anti histona H3.



Western blot

**Figura 10. Primera sedimentación al equilibrio de la fracción enriquecida en el complejo IVa.** Se analizaron, por medio de Western blot, alícuotas tanto de la fracción "Input" (carril "I"), como de cada una de las fracciones obtenidas al finalizar la gradiente, tal como se indica.

### 3.1.9. Segunda sedimentación al equilibrio para el complejo IVa.

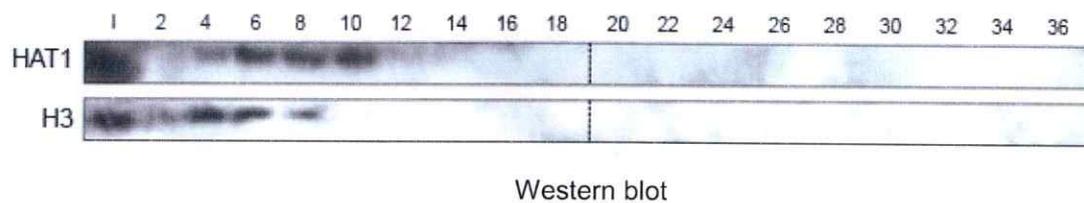
La segunda gradiente de glicerol se realizó con un rango de concentraciones más acotado, de 0% al 20% (v/v). Una vez cargadas las proteínas, se centrifugó bajo el mismo protocolo que para la primera gradiente. Una vez cortada y recuperadas las fracciones, éstas se analizaron a través de Western blot, el cual se presenta en la Figura 11. Al realizar los análisis, la histona H3 se encontró entre las fracciones 2 y 8, con un *peak* en las fracciones 4 a la 6. Por su parte, el *peak* de HAT1 se encontró en la fracción 8. No se detectó Importina-4 en las fracciones. Con estos resultados, se determinó que la histona H3 logró el equilibrio entre 0% y 3,0% (v/v) de glicerol. En consecuencia, se tomaron las fracciones 2 a la 8 y se formó un nuevo *pool* de proteínas, en el cual se recuperaron 0,14 mg.

### 3.1.10. Tercera sedimentación al equilibrio para el complejo IVa.

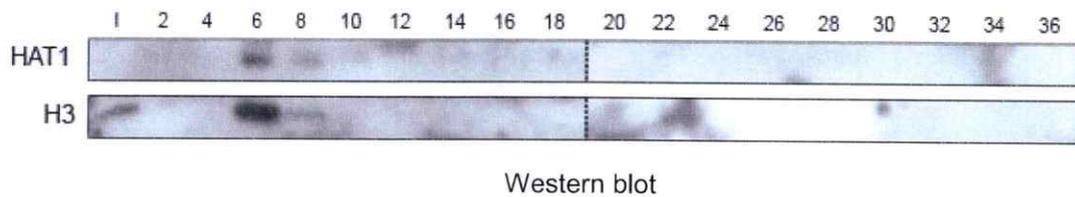
La tercera gradiente de glicerol se confeccionó con un rango de concentraciones de 0% al 8% (v/v) y, una vez terminada la centrifugación, se analizó por medio de Western blot, el cual se presenta en la Figura 12. Al realizar el análisis, se observó que la histona H3 encontró el equilibrio en la fracción 6, junto con HAT1, en una concentración de glicerol estimada de entre 0,2% y 1,5% (v/v). En consecuencia, se tomaron las fracciones 4 a la 8 y se formó un nuevo *pool* de proteínas, en el cual se recuperaron 0,09 mg.

### 3.1.11. Tablas de purificación.

Se confeccionaron las tablas de purificación para los complejos IVa (Tabla 1) y IVb (Tabla 2). El rendimiento se calculó en base a la cantidad de proteína total cargada en la primera columna DEAE-5PW.



**Figura 11. Segunda sedimentación al equilibrio del complejo IVa.** Se analizaron, por medio de Western blot, alícuotas tanto de la fracción "Input" (carril "I"), como de cada una de las fracciones pares obtenidas al finalizar la gradiente, tal como se indica.



**Figura 12. Tercera sedimentación al equilibrio del complejo IVa.** Se analizaron, por medio de Western blot, alícuotas tanto de la fracción "Input" (carril "1"), como de cada una de las fracciones pares obtenidas al finalizar la gradiente, tal como se indica.

Paso de Purificación	Volumen (ml)	[Proteína] (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
S100	720,00	11,11	8000,00	1,0	-
S.N. 20% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	750,00	10,67	8000,00	1,0	-
S.N. 40% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	770,00	6,70	5159,00	1,6	-
Pool 1 <sup>era</sup> DEAE-5PW	290,00	1,40	406,00	19,7	41,43
Pool 2 <sup>da</sup> DEAE-5PW	140,00	1,00	140,00	57,1	14,29
Pool 3 <sup>era</sup> DEAE-5PW	13,50	1,60	21,60	370,4	2,20
Pool CM	1,00	1,78	1,78	4494,4	0,18
1 <sup>era</sup> Gradiente de Glicerol	2,66	0,18	0,48	16708,4	0,05
2 <sup>da</sup> Gradiente de Glicerol	4,00	0,04	0,14	57142,9	0,01
3 <sup>era</sup> Gradiente de Glicerol	6,00	0,02	0,09	88888,9	0,01

**Tabla 1. Tabla de Purificación del complejo IVa.** Se presentan los distintos pasos de purificación empleados en la purificación del complejo IVa y los volúmenes, concentraciones de proteína, proteína total, veces de purificación y rendimientos logrados en cada uno de ellos. El rendimiento se calculó en base a la cantidad de proteína total cargada en la primera columna DEAE-5PW (980 mg).

Paso de Purificación	Volumen (ml)	[Proteína] (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
S100	720,00	11,11	8000,00	1,0	-
S.N. 20%	750,00	10,67	8000,00	1,0	-
S.N. 40%	770,00	6,70	5159,00	1,6	-
Pool 1 <sup>era</sup> DEAE-5PW	290,00	1,40	406,00	19,7	41,43
Pool 2 <sup>da</sup> DEAE-5PW	140,00	1,00	140,00	57,1	14,29
Pool 3 <sup>era</sup> DEAE-5PW	13,00	1,70	22,10	362,0	2,26
Pool CM	0,90	0,24	0,22	37037,0	0,02

**Tabla 2. Tabla de Purificación del complejo IVb.** Se presentan los distintos pasos de purificación empleados en el complejo IVb y los volúmenes, concentraciones de proteína, proteína total, veces de purificación y rendimientos logrados en cada uno de ellos. El rendimiento se calculó en base a la cantidad de proteína total cargada en la primera columna DEAE-5PW (980 mg).

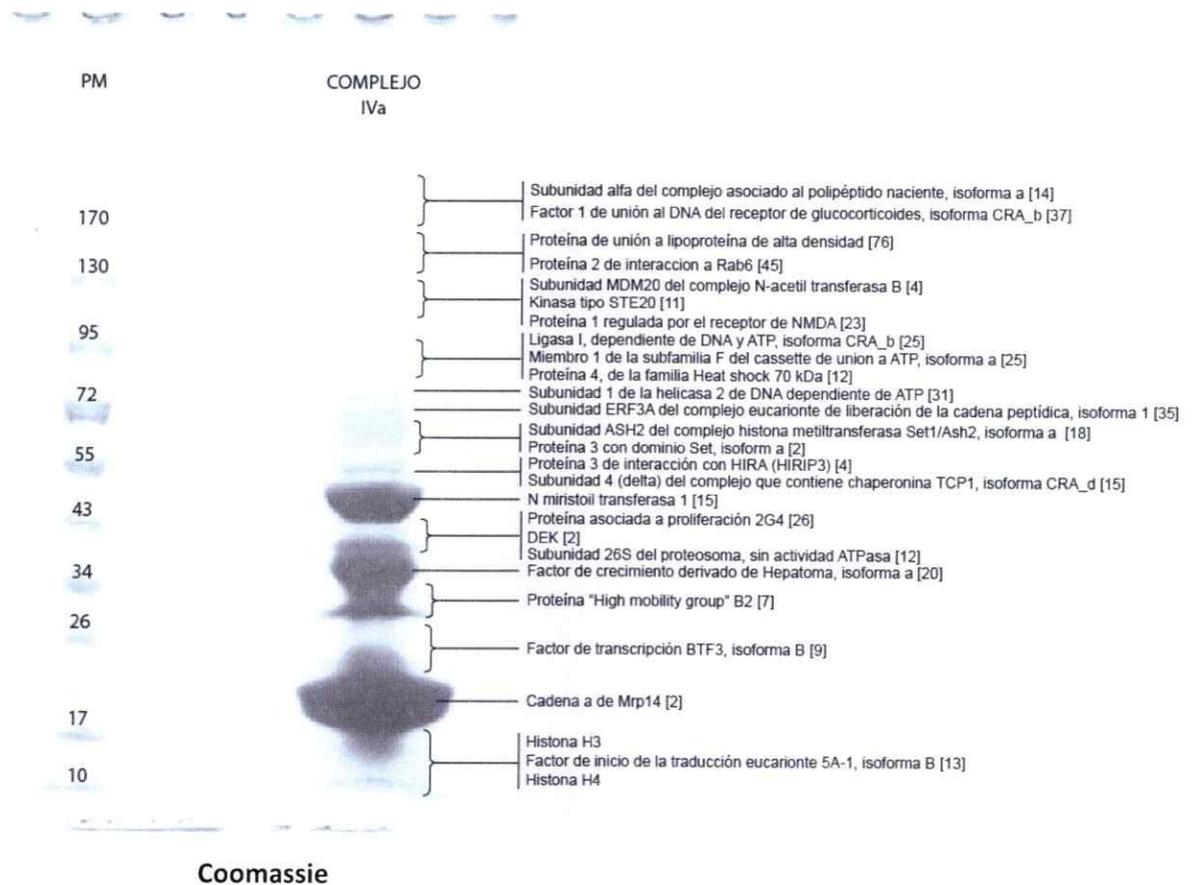
### **3.2. Análisis y caracterización de las proteínas asociadas al complejo IVa.**

#### **3.2.1. Proteínas asociadas al complejo IVa.**

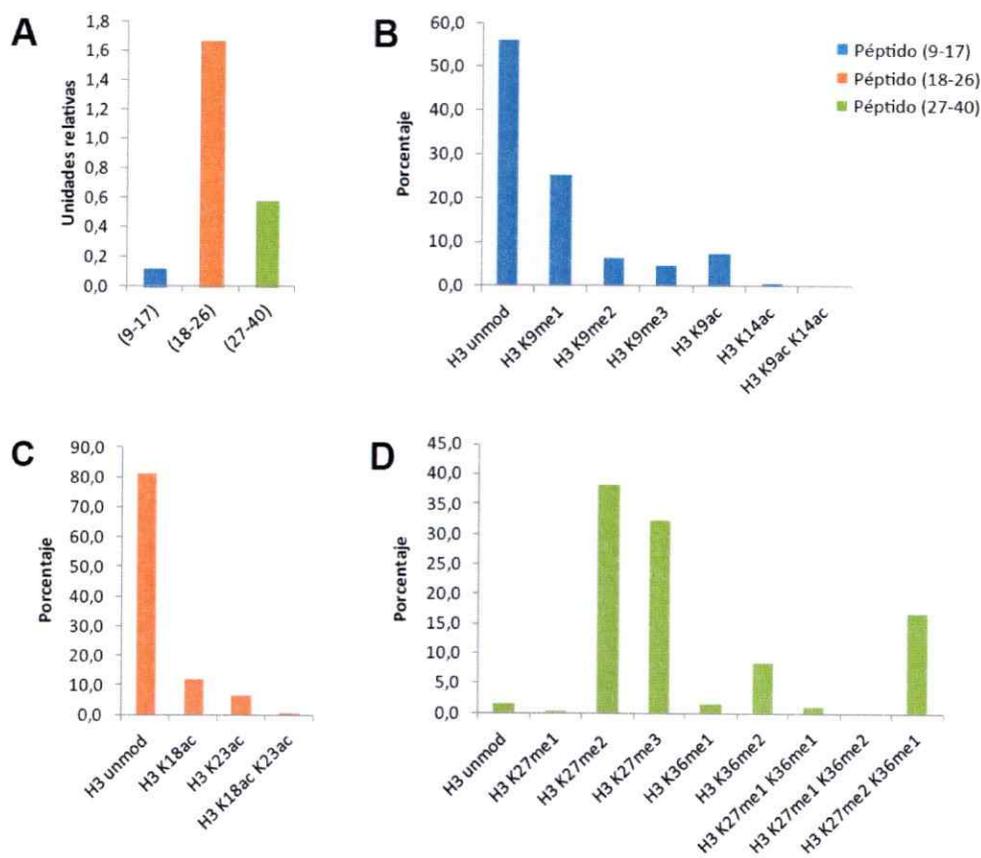
Para identificar las proteínas asociadas al complejo IVa y para caracterizar las PTMs de las histonas H3 y H4, la fracción enriquecida en este complejo se sometió a un análisis de espectrometría de masas. La Figura 13 muestra el gel de acrilamida teñido con Azul de Coomasie, desde el cual se realizaron los análisis. Se identificaron alrededor de 120 proteínas, incluyendo a las histonas H3 y H4. Con estos datos, se realizó una selección bajo los criterios de número de péptidos únicos detectados, porcentaje de cobertura y/o función descrita. Dicha selección de proteínas se presenta rotulada en la Figura 13.

#### **3.2.2. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVa.**

Las PTMs del extremo amino-terminal de la histona H3 de la fracción enriquecida se caracterizaron analizando los péptidos (9-17), (18-26) y (27-40), generados por digestión con tripsina, según lo descrito en materiales y métodos. Los análisis se enfocaron en metilaciones y acetilaciones en residuos de lisina. La Figura 14 muestra la abundancia relativa de los péptidos y los porcentajes que presentaron PTMs. Como se aprecia en la Figura 13A, los 3 péptidos presentaron abundancias relativas diferentes entre sí, siendo el péptido (18-26) el más abundante, seguido por el (27-40) y finalmente por el (9-17). Las PTMs analizadas se muestran en las Figuras 14B, 14C y 14D.



**Figura 13. Proteínas presentes en la fracción enriquecida en el complejo IVa.** Gel de acrilamida, teñido con Azul de Coomassie, de la fracción de proteínas enriquecidas en el complejo IVa. A la izquierda, se indica el marcador de peso molecular, a la derecha, se señala una selección de las proteínas identificadas por espectrometría de masas. El número de péptidos únicos detectados para cada proteína se indica entre paréntesis cuadrado.

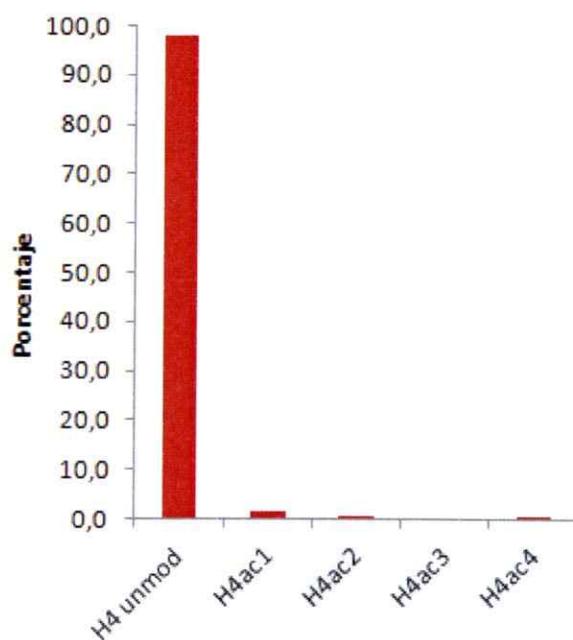


**Figura 14. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVa.** (A) Abundancia relativa de los péptidos estudiados por espectrometría de masas, tal como se indica. La abundancia relativa se determinó como la intensidad de la señal dada por cada péptido, normalizada contra la señal dada por un péptido estándar "R10", empleado como referencia externa. (B) Análisis de PTMs por espectrometría de masas del péptido (9-17) de la histona H3. (C) Análisis de PTMs por espectrometría de masas del péptido (18-26) de la histona H3. (D) Análisis de PTMs por espectrometría de masas del péptido (27-40) de la histona H3.

De los péptidos (9-17), el 55,9% se encontró sin PTMs, el 25,2% presentó H3K9me1, el 6,3% presentó H3K9me2 y el 4,7% presentó H3K9me3. Se detectaron también acetilaciones en las lisinas 9 y 14, en donde el 7,5% de los péptidos mostró H3K9ac y el 0,5% H3K14ac. No se observaron acetilaciones simultáneas de las lisinas 9 y 14. De los péptidos (18-26), el 81,1% no presentó PTMs, mientras que el 12,0% presentó la marca H3K18ac, el 6,4% presentó H3K23ac y el 0,5% presentó H3K18acK23ac. De los péptidos (27-40), solo el 1,5% no presentó PTMs. La modificación más abundante correspondió a H3K27me2, con un 38,2%, seguida por la H3K27me3 con un 32,3%. La H3K27me1 solo se presentó en un 0,3%. Otras modificaciones comprendieron a H3K36me1, con un 1,5%, H3K36me2, con un 8,5%, H3K27me1K36me1, con un 1,1% y H3K27me2K36me1, con un 16,7%. La tri metilación de la lisina 36 no se estudió, y la marca de H3K27me1K36me2 no se detectó.

### 3.2.3. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVa.

Las PTMs del extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo purificado se caracterizaron por espectrometría de masas. Se analizó el péptido (4-17), el cual contiene cuatro lisinas acetilables (Lisinas 5, 8, 12 y 16). Los análisis se enfocaron en los distintos grados de acetilación de este péptido, sin discriminar el sitio de la modificación. La Figura 15 muestra los porcentajes de los péptidos. Como se observa, el 98,1% de los péptidos no tuvo PTMs. El 1,6% de los péptidos presentó acetilación simple y el 0,2% de los péptidos presentó di acetilación. La tetra acetilación se presentó en el 0,1% de los casos y no se detectó tri acetilación.



**Figura 15. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVa.** Se analizó el grado de acetilación del péptido (4-17) de la histona H4, tal como se indica. Se consideró al total de péptidos (4-17), modificados y sin PTMs, como el 100%.

### 3.3. Análisis y caracterización de las proteínas asociadas al complejo IVb.

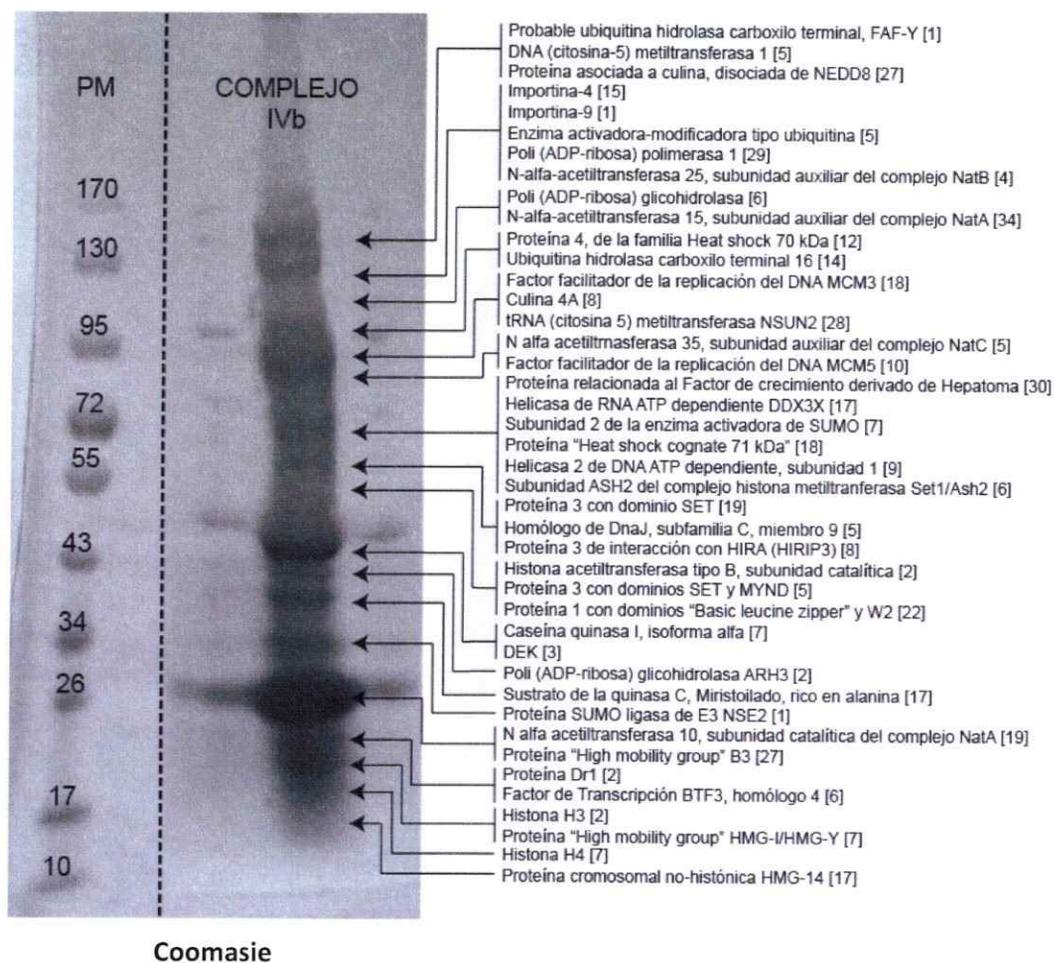
#### 3.3.1. Proteínas asociadas al complejo IVb.

Para identificar las proteínas asociadas al complejo IVb y las PTMs de las histonas H3 y H4, se realizó un análisis de espectrometría de masas. La Figura 16 muestra el gel de acrilamida de la muestra analizada, teñido con Azul de Coomassie. Se identificaron alrededor de 600 proteínas, incluyendo a Importina-4 y a las histonas H3 y H4. Se realizó una selección de las mismas bajo los criterios de número de péptidos únicos detectados, porcentaje de cobertura y/o función descrita. Dicha selección de proteínas se presenta rotulada en la Figura 16.

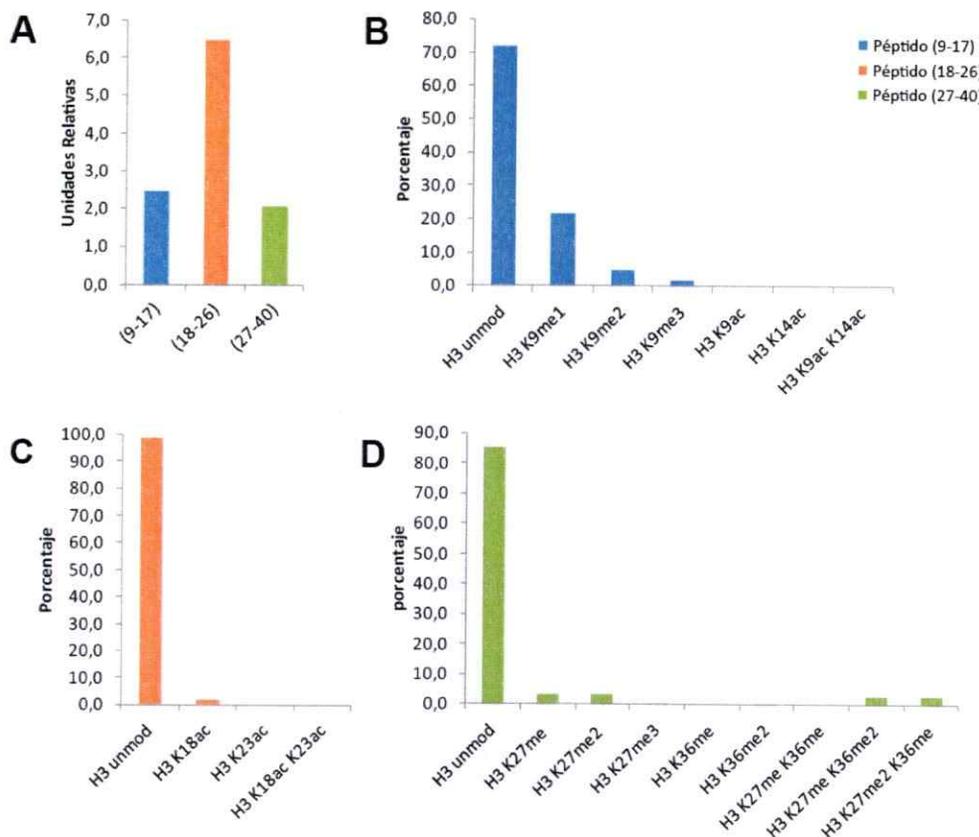
#### 3.3.2. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVb.

Las PTMs del extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo purificado se caracterizaron por espectrometría de masas, analizando los péptidos (9-17), (18-26) y (27-40), generados por digestión con tripsina según lo descrito en materiales y métodos. Los análisis se enfocaron en metilaciones y acetilaciones en los residuos de lisinas. La Figura 17 muestra la abundancia relativa de los péptidos y los porcentajes de PTMs. Como se aprecia en la Figura 17A, los 3 péptidos presentaron abundancias relativas diferentes entre sí, siendo el péptido (18-26) más abundante, seguido por el (9-17) y finalmente por el (27-40). Las PTMs analizadas se muestran en las Figuras 17B, 17C y 17D. De los péptidos (9-17), el 71,8% se encontró sin PTMs, el 21,5% presentó la marca de H3K9me1, el 5,0% presentó H3K9me2 y el 1,8% presentó H3K9me3. No se observaron acetilaciones en ninguno de los residuos. De los péptidos (18-26), el 98,4% no presentó PTMs, mientras que el 1,6% presentó la marca





**Figura 16. Proteínas presentes en la fracción enriquecida en el complejo IVb.** Gel de acrilamida, teñido con Azul de Coomasie, de la fracción de proteínas enriquecidas en el complejo IVb. A la izquierda, se indica el marcador de peso molecular, a la derecha, se señala una selección de algunas de las proteínas identificadas por espectrometría de masas. El número de péptidos únicos detectados para cada proteína se indica entre paréntesis cuadrado.



**Figura 17. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H3 del complejo IVb.** (A) Abundancia relativa de los péptidos estudiados por espectrometría de masas, tal como se indica. La abundancia relativa se determinó como la intensidad de la señal dada por cada péptido, normalizada contra la señal dada por un péptido estándar "R10", empleado como referencia externa. (B) Análisis de PTMs por espectrometría de masas del péptido (9-17) de la histona H3. (C) Análisis de PTMs por espectrometría de masas del péptido (18-26) de la histona H3. (D) Análisis de PTMs por espectrometría de masas del péptido (27-40) de la histona H3.

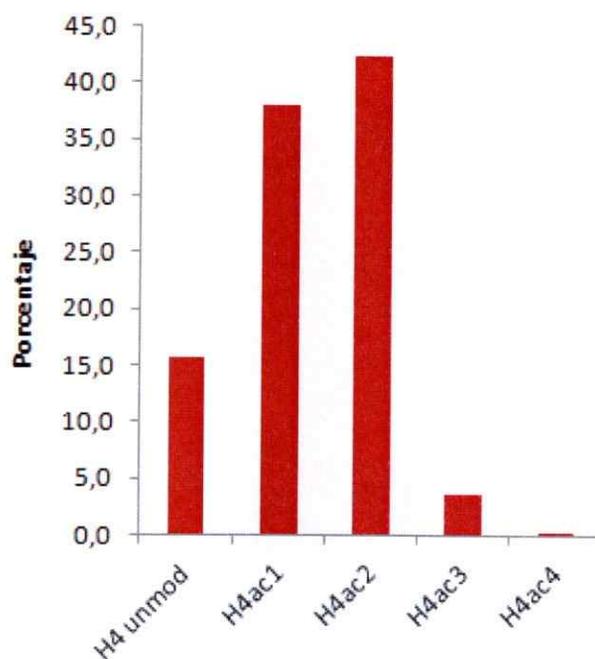
de H3K18ac. De los péptidos (27-40), el 85,2% no presentó PTMs. El resto de estos péptidos presentó H3K27me1, en un 3,4%, H3K27me2, en un 3,2%, H3K27me3, en un 0,5%, H3K36me2, en un 0,5%, H3K27me1K36me2, en un 2,5% y H3K27me2K36me1 en un 2,9%. No se observó H3K36me1 ni H3K27me1K36me1. H3K36me3 no se estudió.

### 3.3.3. PTMs en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVb.

Las PTMs sobre el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo purificado se caracterizaron por espectrometría de masas, bajo el mismo método empleado para determinar las PTMs de la histona H4 del complejo IVa. Se analizó el péptido (4-17), el cual contiene cuatro lisinas acetilables (lisinas 5, 8, 12 y 16), y se determinó el grado de acetilación de los péptidos, no así la posición de la acetilación sobre los mismos. La Figura 18 muestra los porcentajes de acetilación del péptido, respecto del total de péptidos (4-17) de la histona H4. Como se observa, tan solo el 15,7% de los péptidos no se presentó modificado. El péptido más abundante que se detectó consistió en el di acetilado, con un 42,4%. El 38,0% de los péptidos se encontró mono acetilado, mientras que la tri acetilación se encontró en el 3,7% de los casos. La tetra acetilación se observó solo en el 0,2% de los péptidos.

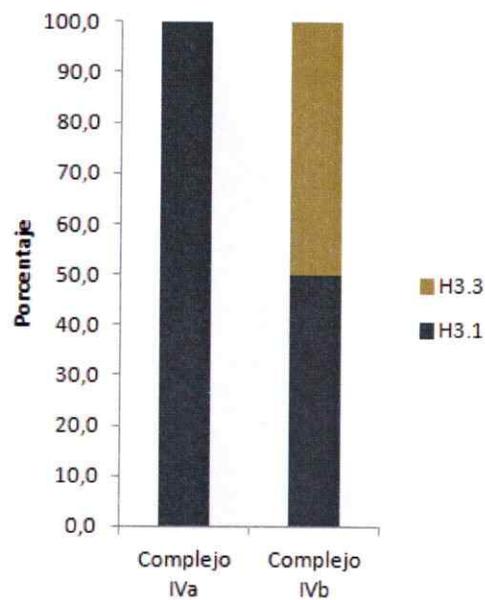
### 3.4. **Análisis de las variantes de la histona H3, H3.1 y H3.3, asociadas a los complejos IVa y IVb.**

Se empleó espectrometría de masas para identificar la proporción de las variantes de la histona H3 asociadas a cada complejo. En humanos, la secuencia de



**Figura 18. PTMs presentes en el extremo amino-terminal de la histona H4 del complejo IVb.** Se analizó el grado de acetilación del péptido (4-17) de la histona H4, tal como se indica. Se consideró al total de péptidos (4-17), modificados y sin PTMs, como el 100%.

aminoácidos de la variante H3.3 posee una serina en la posición 31, la cual está sustituida por una alanina en la variante H3.1. Esta sustitución se traduce en una diferencia de 16 Da entre H3.1 y H3.3 en el péptido (27-40), generado luego de la digestión con tripsina descrita para histonas en materiales y métodos (1601,95 u.m.a. para el péptido correspondiente a H3.1 y 1617,83 u.m.a. para el péptido correspondiente a H3.3). Los análisis realizados, presentados en la Figura 19, indicaron que el 100% de los péptidos (27-40) de la histona H3 asociada al complejo IVa correspondían a la variante H3.1. En cuanto a la histona H3 asociada al complejo IVb, el 50% de los péptidos (27-40) correspondió a la variante H3.1 y el 50% restante a H3.3.



**Figura 19. Análisis de variantes de la histona H3 presentes en cada complejo.** Se analizó al péptido (27-40) de la histona H3 de los complejos IVa y IVb y se determinó, por su diferencia de masas, la proporción de las variantes H3.1 y H3.3 presente en ellos.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Aislamiento y purificación de los complejos IVa y IVb de translocación nuclear de las histonas H3 y H4.

Para aislar los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4 se empleó como estrategia la purificación, a través de distintas técnicas bioquímicas, de extractos citosólicos S100 derivados de células HeLa cultivadas asincrónicamente. De las técnicas empleadas, el uso de la columna de intercambio aniónico DEAE-5PW nos permitió separar los distintos complejos citosólicos de la histona H3, tal como se había logrado en trabajos previos del laboratorio (Alvarez y col., 2011).

Durante el proceso de purificación, la separación de los complejos IVa y IVb se logró en el tercer paso de cromatografía de intercambio aniónico, en donde se obtuvieron tres *peaks* de histona H3 que eluyeron a distintas conductividades (Figura 5). Basados en los resultados previos del laboratorio y en el análisis de Western blot realizado, se determinó que los dos primeros *peaks* de la histona H3 correspondían a los complejos IV, mientras que el tercero correspondía al complejo III. De los dos *peaks* correspondientes a los complejos IV, el primero se encontró asociado a Importina-4, a la histona H4, a la isoforma B de la chaperona específica de histonas Asf1 y a la PTM H3K9me1, mientras que el segundo estaba asociado a Importina-4, a la histona H4, a la isoforma A de la chaperona Asf1 y a las PTMs H3K9me1 y H3ac (H3K14ac) (Figura 6). Estos resultados son consistentes con las descripciones previas de los complejos IVb y IVa, respectivamente, que se publicaron por nuestro laboratorio

(Alvarez y col, 2011), corroborándose la existencia de los complejos IVa y IVb, esta vez a través de una purificación realizada a gran escala (empleando altas cantidades de proteína proveniente de extractos citosólicos S100).

Aunque por medio de cromatografía de intercambio aniónico se logró separar a los complejos IVa y IVb, se determinó que las fracciones proteicas que los contenían eran más complejas que lo conveniente para un correcto análisis de espectrometría de masas. Una vez terminadas las nuevas purificaciones, el complejo IVb se analizó por espectrometría de masas, pero no así el complejo IVa, ya que presentaba una abundante proteína "contaminante", de identidad desconocida, que en SDS-PAGE tenía una movilidad electroforética similar a la de la histona H3 (Figura 9). Debido a su abundancia, el espectro de la proteína contaminante podría haber sido más intenso que el de la histona, enmascarando a esta última y dificultando su análisis. Luego de tres pasos de purificación en gradientes de glicerol, la proteína contaminante no pudo ser eliminada, motivo por el cual se decidió continuar con el análisis por espectrometría de masas. Luego del análisis, se determinó que la proteína contaminante correspondía a Mrp-14, una proteína de unión a calcio y zinc involucrada en procesos inflamatorios y de respuesta inmune (Koike y col., 2012). Hasta la fecha, su interacción con las histonas H3 y H4 o con algunas de sus chaperonas no ha sido reportada, lo cual sugiere que no está asociada al complejo IVa.

En todos los pasos de purificación, las proteínas Importina-4, Asf1a/b y H3 presentaron *peaks* que co-eluyeron entre sí, lo cual es indicativo de que están formando parte de un complejo proteico. A pesar de esta evidencia, experimentos adicionales, como ensayos tipo *pull-down*, serán necesarios para confirmar los resultados.

Interesantemente, aunque en las distintas cromatografías no se observó que un *peak* de HAT1 co-eluyera con los *peaks* de los complejos IV, siempre se observaron remanentes de esta enzima en esas fracciones. Se ha descrito que Importina-4 es un componente abundante de los complejos que contienen HAT1 (Tagami y col., 2004; Jasencakiva y col., 2010) y también se ha descrito que, en *S. cerevisiae*, HAT-B (la holoenzima que acetila a la histona H4 citosólica en levaduras) forma un complejo con las proteínas Asf1p (homólogo de Asf1a/b), Kap123p (homólogo de Importina-4) y las histonas H3 y H4 (Blackwell y col., 2007). A pesar de esto, la evidencia recopilada en el presente trabajo no es suficiente para respaldar la presencia de HAT1 en los complejos que contienen Importina, lo cual es consistente con los trabajos de Campos y Alvarez (Campos y col., 2010; Alvarez y col, 2011). Una posible explicación a esta discrepancia entre lo descrito en la literatura y los resultados de este trabajo está en la metodología empleada, pues en los trabajos que describieron una asociación entre Importina-4 y HAT se empleó como estrategia la inmunoprecipitación de la histona H3 desde los extractos citosólicos y se analizó todo aquello que co-inmunoprecipitara, obteniéndose una mezcla de todos los complejos citosólicos de la histona.

Al realizar la comparación de las fracciones enriquecidas en los complejos IVa y IVb, por medio de Western blot (Figura 6), se observó una diferencia en la migración electroforética de la histona H3, en donde la del complejo IVb presentó un retardo en comparación a la del complejo IVa. Este resultado, observado en 6 ensayos de Western blot distintos (lo cual descarta un problema técnico asociado a la electroforesis de la muestra), sugiere que la histona H3 asociada al complejo IVb tiene un peso molecular ligeramente mayor que en el complejo IVa. Una posible explicación podría radicar en las PTMs presentes en las histonas, pues se ha reportado que algunas

PTMs, como poli-ADP-ribosilación, pueden afectar la migración de las proteínas citosólicas en un SDS-PAGE (Shi y col., 2012). Será interesante investigar si existe alguna PTM fuera de la región amino-terminal que pueda causar este fenómeno.

## **4.2. Identificación de las proteínas asociadas a los complejos de translocación nuclear de las histonas H3 y H4, análisis del patrón de modificaciones posttraduccionales de sus histonas y análisis de variantes.**

### **4.2.1. Complejo IVa.**

Se detectaron alrededor de 120 proteínas, lo cual es esperado dada la complejidad de la muestra y la alta sensibilidad de la técnica. Respecto a esto, un único péptido es suficiente para la identificación de una proteína por medio de espectrometría de masas, aún cuando su concentración bordee los niveles attomolares (Valaskovic y col., 1995). Para muestras de alta complejidad, como las analizadas en este trabajo, un péptido puede ser identificado aún cuando su concentración sea picomolar.

Entre las proteínas detectadas que podrían tener alguna función relacionada con este complejo, se identificó a la chaperona nuclear de histonas DEK, capaz de depositar histonas en las secuencias reguladoras del DNA (Sawatsubashi y col., 2010), y HIRIP3, que interactúa con la chaperona HIRA y las histonas H3 y H4 (Lorain y col., 1998). También se encontró MCM3, una proteína nuclear esencial para la replicación del DNA y que forma parte del complejo helicasa MCM2-7 (Young & Tye, 1997), el cual entrega las histonas removidas de los nucleosomas a la chaperona Asf1 (isoformas A y B) durante los procesos de replicación, reparación y transcripción del

DNA (Groth y col., 2007). Sin embargo, no fue posible detectar Asf1a, lo cual es inconsistente con los análisis de Western blot que indicaron que esta proteína es constituyente del complejo (Figura 6). Tampoco pudo observarse Importina-4, componente esencial de los complejos de translocación nuclear.

Tanto DEK como HIRA depositan la variante H3.3 de la histona H3 en el DNA, lo cual podría haber tenido alguna correlación con las características del complejo IVa. Nuestra hipótesis es que este complejo podría estar enriquecido en la variante H3.3, pues se ha descrito que H3.3 está enriquecida en la marca de acetilación (Loyola y col., 2006) y que Asf1a tiene preferencia por entregar histonas H3 a HIRA (Abascal y col., 2013). Para realizar el análisis de las variantes, nos valimos del hecho de que H3.1 y H3.3 son diferenciables entre sí a través del péptido (27-40), ya que H3.1 posee una alanina en la posición 31 que en H3.3 está reemplazada por una serina. Así, entre los péptidos (27-40) de ambas variantes existe una diferencia de peso molecular de 16 Da, siendo el péptido (27-40) de la histona H3.3 el más pesado. Interesantemente, el 100% de los péptidos (27-40) de la histona H3 asociada al complejo IVa correspondieron a la variante H3.1 (Figura 19), lo cual no era lo esperado.

A pesar del inesperado resultado del análisis de las variantes de H3 asociadas al complejo IVa, el hecho de haber observado únicamente a H3.1 es congruente con el patrón de PTMs detectado (Figura 14) Se ha descrito que H3.1 está asociado mayoritariamente, pero no exclusivamente, a marcas de represión de la transcripción tales como H3K27me2 (Loyola y col, 2006), la cual se detectó en el 38,2% del total de péptidos analizados. Asimismo, se observó un 25% de monometilación en la lisina 9, junto con un 40% de dimetilación en la lisina 9 y un 33% de trimetilación en la lisina 27.

Estas dos últimas marcas son propias de las histonas nucleosomales (Justin y col., 2010). Al analizar las modificaciones de la histona H4 (Figura 15), no se detectaron péptidos (4-17) diacetilados, lo cual también era inesperado, pues un patrón típico de PTMs de la histona H4 citosólica recientemente sintetizada es la acetilación de las lisinas 5 y 12 (Perry y col., 1993).

Con estas evidencias de PTMs y de proteínas asociadas al complejo IVa, se concluyó que el complejo analizado por espectrometría de masas no correspondería al complejo IVa, sino que probablemente a un complejo de histonas desensambladas de la cromatina. Posiblemente, el complejo IVa se perdió en algún paso de purificación posterior a la última cromatografía de intercambio aniónico, y también es muy probable que, junto con el complejo IVa aislado en el tercer paso de cromatografía de intercambio aniónico, hayan habido remanentes de complejos nucleares no-nucleosomales de las histonas H3 y H4, los cuales se enriquecieron al someter la muestra a una purificación en la columna CM-celulosa. Para analizar al complejo IVa por medio de espectrometría de masas será necesario realizar su purificación solo hasta el paso de cromatografía en la columna DEAE-5PW, evitando el uso de la columna CM-celulosa y de las gradientes de glicerol.

#### 4.2.2. Complejo IVb.

En la fracción proteica correspondiente al complejo IVb se detectó Importina-4 y otras carioferinas, como Importina- $\beta$  e Importina-9, las cuales también se han involucrado en la translocación de histonas al interior del núcleo. En efecto, trabajos anteriores describieron que, en células HeLa, Importina-4, Transportina, Importina-5, Importina-7 e Importina-9 serían responsables de mediar la translocación nuclear de

las histonas H3, H4, H2A y H2B (Muhlhauser y col., 2001; Baake y col., 2001), aunque con diferentes especificidades. Por ejemplo, Importina-9 tendría mayor importancia en mediar la translocación de las histonas H2A y H2B, mientras que Importina-4 e Importina-5 en mediar la translocación de las histonas H3 y H4. También se detectaron las histonas H3 y H4, pero no se detectó Asf1. Esto puede deberse a que, para el análisis de espectrometría de masas, solo se analizaron las bandas con proteínas que fueran más abundantes, cortándolas desde los geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie. Así, cabe la posibilidad de haber perdido a Asf1 durante este proceso.

Además, se detectaron múltiples proteínas ribosomales, factores de iniciación y elongación de la transcripción, factores remodeladores de la cromatina y componentes de la maquinaria de reparación del DNA. También se detectó a la proteína DNA metil transferasa 1 (DNMT1), la cual es responsable de mantener los patrones de metilación del DNA, la cual es una marca involucrada en el silenciamiento de genes (Kar y col., 2012). La detección de todas estas proteínas tiene sentido dada la presencia de las distintas Importinas en la muestra, las cuales median la translocación nuclear de todos estos factores. Por ejemplo, se ha descrito que Importina-4 e Importina-9 median la translocación nuclear tanto de las proteínas ribosomales como de otras proteínas nucleares (para mayor detalle revisar Chook & Süel, 2011). Dado que las carioferinas  $\beta$  (familia a la que pertenecen las Importinas detectadas) son proteínas de gran tamaño y con múltiples sitios de unión a proteínas cargo (Conti y col., 2006; Cook y col., 2007), se puede especular que median la translocación simultánea de muchas de las proteínas detectadas junto con el complejo IVa. Será necesario comprobar esto en el futuro.

Respecto de las PTMs asociadas a la histona H3 de este complejo, se detectó la monometilación de la lisina 9 en el 20% de los péptidos analizados, lo cual es concordante con lo descrito para las histonas H3 citosólicas (Loyola y col., 2006). Si bien también se detectó dimetilación y trimetilación de la lisina 9, los porcentajes no sobrepasaron el 5% y el 2% respectivamente. En cuanto a H4, más del 40% de los péptidos (4-17) se encontraron diacetilados, concordante con las acetilaciones en las lisinas 5 y 12 esperadas para una histona H4 recientemente sintetizada.

Al analizar las variantes de H3 asociadas a este complejo, los antecedentes descritos en la literatura nos indicaban dos posibles escenarios: que el complejo IVb estuviera asociado tanto a H3.1 como a H3.3, o que estuviera asociado, preferentemente, a H3.1. Esto, pues se ha descrito que tanto Asf1a como Asf1b poseen afinidades similares hacia H3.1 y H3.3 *in vitro* (Tagami y col., 2004), pero también se ha descrito, en un trabajo reciente, que Asf1b, *in vivo*, interactúa preferentemente con CAF-p60, la sub-unidad central del complejo CAF que media la deposición de la variante H3.1 en la cromatina durante la fase S del ciclo celular (Abascal y col., 2013). La espectrometría de masas reveló que el complejo IVb estaba asociado a ambas variantes por igual, con un 50% de los péptidos (27-40) de H3 correspondiendo a la variante H3.1 y el otro 50% a H3.3 (Figura 19). Así, con las evidencias recopiladas, se puede determinar que efectivamente el complejo IVb purificado y analizado por espectrometría de masas correspondía a un complejo citosólico de las histonas H3 y H4, enriquecido en monometilación de la lisina 9 de la histona H3.

#### **4.3. Implicancias de la existencia de los complejos IVa y IVb de translocación nuclear de las histonas H3 y H4.**

En base a los resultados de Western blot, se puede especular que los complejos IVa y IVb estarían entregando histonas a distintas maquinarias de ensamblaje de la cromatina y que tendrían distintos impactos en la expresión genética. Así, el complejo IVa se encargaría de translocar histonas enriquecidas en PTMs asociadas a activación de la transcripción (H3K14ac), mientras que el complejo IVb se encargaría de translocar histonas enriquecidas en PTMs asociadas a la represión transcripcional (H3K9me1). Esto es interesante, pues podría implicar que existe una maquinaria que entrega información a la cromatina en replicación, ayudando a mantener una "memoria" en el patrón de PTMs de las histonas, que ya estaría operando desde el citosol. Así, simplemente al realizar un "*switch*" en el suministro de las histonas, prefiriendo una de las dos vías por sobre la otra (complejos IVa o IVb), se favorecerían distintos estados en la cromatina, según los distintos requerimientos celulares. Será muy interesante explorar esta posibilidad.

En cuanto al hecho de entregar histonas a distintas maquinarias de ensamblaje de la cromatina, se puede especular que el complejo IVb, enriquecido en la isoforma B de Asf1, adquiriría una mayor importancia al momento de translocar histonas durante la fase S del ciclo celular, entregando las histonas preferentemente a la chaperona CAF-1, mientras que el complejo IVa, enriquecido en la isoforma A de Asf1, adquiriría una mayor importancia en el resto del ciclo celular, entregando histonas a la maquinaria de ensamblaje de la cromatina en la que actúa la chaperona HIRA (esto en base al antecedente de la interacción preferencial de Asf1b con CAF-1 y de Asf1a con HIRA) (Abascal y col., 2013).

Con los resultados de espectrometría de masas, podemos afirmar que el complejo IVb no media la translocación nuclear exclusiva de alguna de las variantes de H3, translocando tanto a H3.1 como a H3.3. Sin embargo, debemos tener en consideración que los complejos purificados provienen desde extractos S100 de células HeLa asincrónicas. Así, cabe la posibilidad de que, de todas formas, el complejo IVb esté enriquecido en histonas H3.1 durante la fase S del ciclo celular e incluso que durante esta fase el complejo IVb sea prevalente sobre el complejo IVa. Para comprobar esta hipótesis será interesante realizar experimentos con células HeLa sincronizadas y realizar los extractos S100 durante la fase S del ciclo celular, específicamente en tiempos tempranos de dicha fase.

## 5. CONCLUSIONES

- Se confirmó la existencia de los complejos IVa y IVb de translocación nuclear de las histonas H3 y H4.
- El análisis comparativo demostró que el complejo IVa está enriquecido en la marca H3ac y que el complejo IVb está enriquecido en la marca H3K9me1.
- Ambos complejos de translocación nuclear están asociados a Importina-4, pero a diferentes isoformas de Asf1: el complejo IVb está asociado solo a Asf1b, mientras que el complejo IVa está mayoritariamente asociado a Asf1a.
- Los resultados espectrometría de masas indicaron que, al finalizar las purificaciones, no se purificó el complejo IVa, sino que, posiblemente, un complejo de histonas H3 y H4 nucleosomales desensambladas de la cromatina.
- Los resultados de espectrometría de masas del complejo IVb detectaron a Importina-4 y el patrón de PTMs de la histona H3 reveló que alrededor del 20% de esta histona presenta H3K9me1. El 40% de la histona H4 presentó la marca de diacetilación esperada.
- El 100% de la histona H3 asociada a lo purificado bajo el nombre de "complejo IVa" correspondió a H3.1, mientras que en el complejo IVb, el 50% correspondió a H3.1 y el otro 50% a H3.3.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abascal, F., Corpet, A., Gurard-Levin, Z., Juan, D., Ochsenbein, F., Rico, D., Valencia, A. y Almouzni, G. 2013. Subfunctionalization via Adaptive Evolution Influenced by Genomic Context: The Case of Histone Chaperones ASF1a and ASF1b. *Mol Biol Evol.* **30**(8): 1853-1866.
2. Alvarez, F., Muñoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G. y Loyola, A. 2011. Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J Biol Chem.* **286**(20): 17714-17721.
3. Andrews, A. y Luger, K. 2011. Nucleosome Structure(s) and Stability: Variations on a Theme. *Annu Rev Biophys.* **40**: 99-117.
4. Blackwell, J., Wilkinson, S., Mosammaparast, N. y Pemberton, L. 2007. Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import. *J Biol Chem.* **282**(28): 20142-20150
5. Campos, E., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W., Seepany, H., Gao, Z., Day, L., Greenblatt, J. y Reinberg, D. 2010. The program for Processing Newly-synthesized Histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol.* **17**(11): 1343-1351.
6. Chang, L., Loranger, S., Mitzzen, C., Ernst, S., Allis, C. y Annunziato, T. 1997. Histones in Transit: Cytosolic Histone Complexes and Diacetylation of H4 During Nucleosome Assembly in Human Cells. *Biochemistry.* **36**: 469-480.
7. Chook, Y. y Süel, K. 2011. Nuclear import by karyopherin- $\beta$ s: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta.* **1813**(9): 1593-1606.
8. Chow, C., Georgiou, A., Szutorisz, H., Mala e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C., y Dillon, N. 2005. Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* **6**: 354-360.
9. Conti, E., Muller, C. y Stewart, M. 2006. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol.* **16**: 237-244.
10. Cook, A., Bono, F., Jinek, M. y Conti, E. 2007. structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem.* **76**: 647-671.
11. Daly, M., Mirsky, A. y Ris, H. 1951. The amino acid composition and some properties of histones. *J Gen Physiol.* **34**(4): 439-450.

12. Dignam, J., Lebovitz, R. y Roeder, R. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**(5): 1475-1489.
13. Drane, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., y Hamiche, A. 2010. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* **24**: 1253-1265.
14. Fiserova, J. y Goldberg, M. 2010. Nucleocytoplasmic transport in yeast: a few roles for many actors. *Biochem Soc Trans.* **38**: 273-277.
15. Freitas, N. y Cuhna, C. 2009. Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins. *Curr Genomics.* **10**(8): 550-557.
16. Görlich, D., Vogel, F., Mills, A., Hartmann, E., y Laskey, R. 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature.* **377**: 246-248.
17. Groth, A., Corpet, A., Cook, A., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J. y Almouzni, G. 2007. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science.* **318**(5858): 1928-1931.
18. Gunjan, A. y Verrault, A. 2003. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell.* **115**(5): 537-549).
19. Jasencakova, Z., Scharf, A., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G. y Groth, A. 2010. Replication stress interferes with histone Recycling and predeposition marking of new histones. *Mol. Cell* **37**: 736-743.
20. Jenuwein, T. y Allis, C. 2001. Translating the histone code. *Science.* **293**(5532): 1074-1080.
21. Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., y Felsenfeld, G. 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet.* **41**: 941-945.
22. Justin, N., De Marco, V., Aasland, R. y Gambelin, S. 2010. Reading, writing and editing methylated lysines on histone tails: new insights from recent structural studies. *Curr Opin Struct Biol.* **20**(6): 730-738.
23. Kar, S., Deb, M., Sengupta, D., Shilpi, A., Parbin, S., Torrisani, J., Pradhan, S. y Patra, S. 2012. An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function. *Epigenetics.* **7**(9): 994-1007.
24. Keck, K. y Pemberton, L. 2012. Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly. *Biochim Biophys Acta.* **1819**(3-4): 277-289.
25. Koike, A., Arai, S., Yamada, S., Nagae, A., Saita, N., Itoh, H., Uemoto, S., Totani, M. y Ikemoto, M. 2012. Dynamic mobility of immunological cells

- expressing S100A8 and S100A9 in vivo: a variety of functional roles of the two proteins as regulators in acute inflammatory reaction. *Inflammation*. **35**(2): 309-419.
26. Kornberg, R. D. 1977. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*. **46**: 931-954.
  27. Lange, A., Mills, R., Lange, C., Stewart, M., Devine, S. y Corbett, A. 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem*. **282**:5101-5105.
  28. Lorain, S., Quivy, J., Monier-Gavelle, F., Scamps, C., Lécluse, Y., Almouzni, G. y Lipinski, M. 1998. Core Histones and HIRIP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA. *Mol Cell Biol*. **18**(9): 5546-5556.
  29. Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A. y Almouzni, G. 2006. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol. Cell* **24**: 309-316.
  30. Loyola, A. y Almouzni, G. 2004. Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta*. **1677**: 3-11
  31. Loyola, A. y Almouzni, G. 2007. Marking histone H3 variants: how, when and why?. *Trends Biochem Sci*. **32**: 425-433.
  32. Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. y Almouzni, G. 2009. The HP1 $\alpha$ -CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep*. **10**(7): 769-775.
  33. Luger, K., Mader, A., Richmond, R., Sargent, D. y Richmond, T. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution. *Nature*. **389**: 251-260.
  34. Maake, M., Bauerle, M., Doenecke, D. y Albig, W. 2001. Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur. J. Cell Biol*. **80**: 669-677.
  35. Marzluff, W., Wagner, E. y Duronio, R. 2008. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**(11):843-54.
  36. Maya, D., Morillo-Huesca, M., Chávez, S. y Muñoz-Centeno, M. 2011. Free Histones and the Cell Cycle. *En H. Sellignam (ed.). DNA Replication-Current Advances*. pp 409-426. InTech, Croatia. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/dna-replication-current-advances/free-histones-and-the-cell-cycle>.
  37. Mingot, J., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. y Gorlich, D. 2001. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J*. **20**: 3685-3694.
  38. Mirsky, A. y Pollister, A. 1946. Chromosin, A desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. *J Gen Physiol*. **30**(2): 117-148.

39. Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. y Pemberton, L. 2002. Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem.* **277**(1): 862-868.
40. Muhlhauser, P., Muller, E., Otto, A. y Kutay, U. 2001. Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep.* **2**: 690-696.
41. Perry, C., Dadd, C., Allis, C. y Annunziato, A. 1993. Analysis of nucleosome assembly and histone exchange using antibodies specific for acetylated H4. *Biochemistry.* **32**(49): 13605-13614.
42. Peterson, C. y Laniel, M. 2004. Histones and histones modifications. *Curr Biol.* **14**(14): 546-551.
43. Pradeepa, M., Manjunatha, S., Sathish, V., Agrawal, S. y Rao, M. 2008. Involvement of Importin-4 in the transport of transition protein 2 into the spermatid nucleus. *Mol Cell Biol.* **28**(13): 4331-4341.
44. Sarma, K. y Reinberg, D. 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**(2):139-49.
45. Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S. y Fujiyama, S. 2010. A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.* **24**: 159-170.
46. Shi, Y., Mowery, R., Ashley, J., Hentz, M., Ramirez, A., Bilgicer, B., Slunt-Brown, H., Borchelt, D. y Shaw, B. 2012. Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Sci.* **21**(8): 1197-1209.
47. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. y Nakatani, Y. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell.* **116**: 51-61.
48. Turner, B. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell.* **111**(3): 285-291.
49. Valaskovic, G., Kelleher, N., Little, D., Aaserude, D. y McLafferty, F. 1995. Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Analyt. Chem.* **67**: 3802-3805.
50. Young, M. y Tye, B. 1997. Mcm2 and Mcm3 are constitutive nuclear proteins that exhibit distinct isoforms and bind chromatin during specific cell cycle stages of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**(8): 1587-1601.