



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Asociación de SetDB1 a los ribosomas durante el ciclo celular y su efecto sobre H3K9me1 citosólico.”

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

SEBASTIAN FERNANDO MARTY LOMBARDI

Director del Seminario de Título:

Dra. María Alejandra Loyola Pedevila

Patrocinante:

Dr. Álvaro Alberto Glavic Maurer

Junio 2017

Santiago – Chile

BIOGRAFÍA



Aparecí en este mundo un día martes 6 de Agosto de 1991, en las no tan lejanas tierras de Viña de Mar, ciudad que fue mi hogar desde que tengo memoria hasta entrar a la universidad. Cursé hasta el séptimo básico en el colegio Friendly High School, y buscando una mejor educación emigré al Colegio Rubén Castro de Viña del Mar, permaneciendo allí hasta egresar de la enseñanza Media. Crecí jugando en la calle, yendo a la playa como buen viñamarino, andando en bicicleta, y probando más deportes de los que puedo recordar. Durante mi tierna infancia desarrollé un amor por la lectura y los videojuegos, preferentemente por Tolkien y la fantasía, por quienes tengo una predilección hasta hoy en día. También en ese período desarrollé mi (no siempre correspondido) afecto por la ciencia y el conocimiento, fomentado por mis padres y familia, que si bien no siempre tenían las respuestas a todas mis preguntas, siempre me entregaron las herramientas para buscarlas. Debido a esta curiosidad por la naturaleza, sobre todo por la biología, entré a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, buscando las herramientas para responder todas las preguntas que tenía y la manera de moldear el mundo a mi gusto, intentando dejar una marca en la historia y solucionar todos los problemas que aquejan a este mundo, como un héroe de fantasía de la infancia. Ahora, terminando la carrera y cerrando este ciclo, tengo aún más preguntas antes, y si bien ya no pretendo salvar el mundo, aún espero dejarlo mejor de lo que lo encontré.

DEDICATORIA

A mis Padres y a mi Hermana,

por su apoyo incondicional.

Y a ti, que te diste el tiempo de leer lo que aquí escribo.

Si fue por necesidad, curiosidad o simple aburrimiento da igual,

lo importante es que esto no fue en vano.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y como corresponde, a mis padres y a mi hermana, sin quienes no sería quién soy hoy. Gracias por criarme, cuidarme, guiarme y apoyarme en todas mis ideas, sin importar que tan ridículas o locas fueran.

Al resto de mi familia, sobre todo a Liliana, Carla y Nicolás, gracias por estar siempre ahí y por todos los momentos de felicidad, risas y enseñanzas que me han dado.

A Ailyn Corona, quien ha sido un apoyo fundamental durante gran parte de este proceso, y por una parte importantísima de mi vida.

A los *cabros*, esos hermanos que uno elige y que han estado desde pequeños en buenos y malos momentos, risas, estupideces y travesuras. Gracias a ambos Nicos, Taro, Franco, Aldo y Nacho. Ya ahora siendo todos adultos y varios con familia, puedo ver que nos hemos guiado los unos a los otros de manera correcta. Puede que nuestros hígados ya no sean los mismos de antes, pero el cariño y el apoyo se mantiene intacto.

A mis amigos saltarines y su evolución. A Gonzalo, Nany, Marcia, Juan y Pablo, y a tantos más que van y vuelven. Son personas que uno a veces ni siquiera recuerda cómo conoció, pero que sabe que sin importar cuánto tiempo pase sin verlos, siempre será como si los hubiese visto el día de ayer.

A mis amigos del colegio, que si bien no nos vemos tanto como quisiéramos, los recuerdos del día a día de la sala de clases siempre estarán y para siempre se atesorarán.

A mis amigos y compañeros de Universidad, personas con una calidez y calidad humana excepcional. A Cata, Eliana, Danini, Juan Carlos, Nico, Mario, Panchito, Froko, Vale, Kary, Claudia, Dieguito, y en especial a Jorge, Nexo y Doberti. Gracias por las infinitas risas, por entender y compartir mi humor, por los paseos, las enseñanzas, y por sobre todo, por demostrarme que hay gente que está intentando volver a este mundo un lugar mejor, aunque sea un pequeño paso a la vez.

Al laboratorio de Epigenética y Cromatina de la Fundación Ciencia y Vida. Gracias a la Dra. Alejandra, la directora de este trabajo, por permitirme trabajar aquí en primera instancia, por sus consejos y guía a lo largo de todo este proceso, por su paciencia y apoyo en los momentos difíciles, y por sobre todo, por el amor que demuestra por lo que hace, que motivan a uno a trabajar y evidencia que una vida en la ciencia puede no ser tan terrible como uno a veces cree o quiere creer. A Francisco, por su guía, consejos y respuestas ante toda las dudas e ideas locas que uno puede tener, sirviendo muchas veces a modo de segundo tutor de este trabajo. Puede que no siempre sepa todas las respuestas, pero la seguridad con la que responde es más que suficiente. Gracias a todos los nucleosomas, oficiales y putativos, por toda las risas, carretes, almuerzos y momentos que hacen mucho más ameno cada día. A Francisca, Claudia, Checho, Dani, Juan, Cristian, Karla, Javiera y Betsi. Si no estuvieran, o fueran otras personas, ni siquiera sé si habría terminado este trabajo. Ustedes hacen que para un flojo como yo, el levantarse día a día sea mucho menos terrible.

Finalmente, gracias a todos aquellos que ya no están, las personas con las que he compartido momentos buenos, momentos malos, y momentos importantes en mi vida. Aquellos que fueron un apoyo, una ayuda, una guía o que de alguna forma dejaron alguna marca o algún recuerdo. Puede que la vida nos haya separado, pero su memoria y e importancia nunca desaparecerá.

“Desearía que no hubiera pasado en mi tiempo”, dijo Frodo.

“Al igual que yo” dijo Gandalf, “Y al igual que todos aquellos que viven para ver tales tiempos. Pero no es para ellos decidir. Todo lo que tenemos que decidir es que hacer con el tiempo que se nos ha dado”.

John Ronald Reuel Tolkien

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. Materiales y Soluciones	9
a. Material Biológico y Cultivo Celular	9
b. Sincronización celular, extracción de proteínas y cuantificación.....	9
c. Western Blot	9
d. Citometría de Flujo.....	11
e. Otros reactivos.....	11
f. Equipos.....	11

2. Soluciones y Tampones.....	11
a. Tampón de Laemmli 5X.....	12
b. Tampón de corrida 10X.....	12
c. Tampón de transferencia	12
d. Solución de bloqueo.....	12
e. Rojo Ponceau	12
f. Tampón RIPA	13
g. Tampón de lisis celular	13
h. Colchón de sacarosa	13
i. Tampón de resuspensión.....	13
3. Métodos.....	13
a. Cultivo y sincronización del ciclo celular:.....	13
b. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo:.....	14
c. Extracto total:.....	14
d. Obtención de polisomas:.....	14
e. Western Blot:	15
f. Programas y Análisis Informáticos:	16
RESULTADOS	17
1. Sincronización de células HeLa.	17
a. Obtención de células sincronizadas mediante el doble bloqueo con timidina.17	
b. Obtención de células sincronizadas en presencia de cicloheximida.....	22

2. Determinación de los niveles de SetDB1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.	26
3. Determinación de los niveles de H3K9me1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.	29
DISCUSIÓN.....	31
1. Sincronización de Células HeLa.....	31
2. Determinación de los niveles de SetDB1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.	33
3. Determinación de los niveles de H3K9me1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.	34
RESUMEN DE RESULTADOS.....	38
CONCLUSIÓN.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cascada de maduración de H3 y H4 recientemente sintetizadas.....	1
Figura 2. Esquema de la proteína SetDB1.....	5
Figura 3. Esquema de sincronización celular mediante doble bloqueo con timidina	17
Figura 4. Sincronización de células HeLa	21
Figura 5. Desarrollo del ciclo celular en presencia de cicloheximida.	25
Figura 6. Determinación de los niveles de SetDB1 en polisomas de células sincronizadas.....	28
Figura 7. Determinación de los niveles de H3 y H3K9me1 en polisomas de células sincronizadas.....	30
Figura 8. Modelo explicativo de la doble funcionalidad de H3K9me1	37

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio (Nombre IUPAC: persulfato amónico)
BSA	Seroalbúmina bovina
dCTP	Desoxicitidina Trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic acid)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
H3	Histona H3
H3K9me1	Histona H3 monometilada en la lisina 9
H3K9me2	Histona H3 dimetilada en la lisina 9
H3K9me3	Histona H3 trimetilada en la lisina 9
K	Lisina
kDa	Kilodalton
mRNA	RNA mensajero
NP40	Sustituto de Nonidet P-40
p/v	Peso/Volumen
PBS	Tampón Fosfato Salino
PI	Yoduro de Propidio (del inglés Propidium Iodide)

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTMs	Modificaciones post-traduccionales (del inglés Posttranslational Modifications)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (Nombre IUPAC: poli-1,1-difluoroeteno)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés Ribonucleic acid)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Nombre IUPAC: dodecilsulfato sódico)
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida, en condiciones denaturantes (con SDS)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Hidrocloruro de Tris (hidroximetil) aminometano
T-TBS	<i>Buffer</i> Tween-Tris salino
U	Unidad enzimática
uma	Unidades de masa atómica
v/v	Volumen/Volumen

RESUMEN

Una vez que las histonas son traducidas en los ribosomas, estas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales antes de entrar al núcleo. En particular, se han descrito las modificaciones y los complejos que forman las histonas H3 y H4 con distintas chaperonas. En esta cascada de maduración, la primera modificación que se establece es H3K9me1, la cual se genera de manera cotraduccional mediante la metiltransferasa SetDB1 asociada al ribosoma. Sin embargo, sólo el 36% de H3 soluble presenta esta modificación, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación, el cual no ha sido descrito hasta la fecha. Utilizando células sincronizadas realizamos un análisis mediante Western Blot para evaluar la presencia de SetDB1, H3 y H3K9me1 en ribosomas provenientes de células enriquecidas en distintas fases del ciclo celular. Logramos determinar que hacia el final de la fase S, hay una mayor presencia de SetDB1 en los ribosomas. En cuanto a H3 y H3K9me1, observamos una acumulación de la proteína y la marca tanto al inicio como al final de la fase S. Por lo tanto, se concluye que existiría un mecanismo de regulación dependiente del ciclo celular para la generación de la marca H3K9me1. Futuros estudios se requerirán para identificar las bases moleculares y el mecanismo de regulación de este proceso.

ABSTRACT

Once histones are translated in the ribosomes, they are post-translationally modified before entering in the nucleus. Previous studies characterized the maturation cascade involved in the establishment of modifications and folding of histones H3 and H4. On this maturation cascade, the first modification imposed is H3K9me1, which occurs cotranslationally by SetDB1, a methyltransferase associated to the ribosome. However, only 36% of the soluble H3 carries this modification, which suggests the existence of a regulation mechanism for the generation of this mark. Using synchronized cells, we performed a Western Blot analysis to assess the presence of SetDB1, H3, and H3K9me1 on ribosomes obtained from cells enriched in different phases of the cell cycle. We found that SetDB1 is enriched on ribosomes at late S phase. We observed an accumulation of H3 and H3K9me1 at early and late S phase. We concluded that there is a cell cycle dependent regulatory mechanism for the generation of H3K9me1. Future studies will be required to identify the molecular basis of this process.

INTRODUCCIÓN

El material genético de los organismos eucariontes se presenta compactado en forma de cromatina, cuya unidad fundamental es el nucleosoma. Éste está compuesto por 147 pares de bases de ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés), los cuales dan 1,65 vueltas alrededor de un octámero de proteínas formado por un tetrámero de las histonas H3 y H4 flanqueado por dos dímeros de las histonas H2A y H2B (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, en particular lisinas y argininas (Daly y col., 1951). Poseen un punto isoeléctrico entre pH 10,4 y 10,8 (Mirsky & Pollister, 1946), lo que genera que tengan una carga neta positiva, altamente afín al DNA. Estas proteínas se caracterizan por tener distintas modificaciones post-traduccionales (PTMs) principalmente en sus extremos N-terminales. Dichas marcas generan cambios en la interacción entre el DNA y proteínas y/o forman puntos de anclaje para el reconocimiento de diversos factores que modulan la estructura de la cromatina (Kouzarides, 2007). Esto origina que distintas zonas del genoma posean diferentes niveles de compactación (Lennartsson & Ekwall, 2009).

A pesar de que la función de las histonas dentro de la célula se ejecuta cuando éstas están asociadas al DNA, también es posible encontrarlas separadas de éste, reservorio que se denomina histonas solubles. Como ejemplos de dicho reservorio están aquellas histonas que han sido escindidas del nucleosoma como parte normal de los procesos que ocurren sobre el DNA, así como histonas recientemente

sintetizadas que aún no han sido incorporadas a la cromatina (Gunjan & Verreault, 2003). Estudios bioquímicos han demostrado que en células humanas asincrónicas el 1% de las histonas totales corresponde a histonas solubles, siendo alrededor de la mitad de ellas, histonas que se encuentran en el citoplasma (Loyola y col., 2006).

Luego de que las histonas H3 y H4 son traducidas en los ribosomas libres del citoplasma, éstas son procesadas a través de una “cascada de maduración” que involucra distintos tipos de complejos proteicos de histonas, chaperonas y enzimas (Figura 1). En esta vía las histonas adquieren su correcto plegamiento y algunas de sus PTMs (Campos y col., 2010; Alvarez y col., 2011; Gurard-Levin y col., 2014;). En el caso de la histona H3, la primera metilación en aparecer en esta vía de maduración corresponde a la monometilación de la lisina 9 (H3K9me1), modificación que se genera de manera cotraduccional (Rivera y col., 2015). Estudios realizados en histonas solubles indicaron que sólo un 36% de la histona H3 presenta la marca H3K9me1 (Loyola y col., 2006). Esta monometilación en H3K9 por sí sola se ha relacionado con activación génica (Barski y col., 2007), sin embargo su principal rol descrito dentro del núcleo es ser sustrato de las metiltransferasas Suv39h1 y Suv39H2 para generar H3K9me3. Esto se lograría mediante un mecanismo en el cual el complejo HP1 α -CAF1-SetDB1 monometila H3 soluble que será incorporada en la heterocromatina durante la replicación del DNA (Loyola y col., 2009). Posteriormente HP1 α -CAF1 se encargaría de, por una parte ensamblar el tetrámero H3-H4 en el DNA recientemente sintetizado, y por otra, entregar la proteína HP1 α en los sitios de heterocromatina que se están replicando (Quivy y col., 2004). Luego H3K9me1 sería sustrato de Suv39H1/H2, generándose H3K9me3 en estos sitios (Loyola y col., 2006). Dicha

trimetilación es necesaria para reclutar más HP1 α , generando la formación de dominios de heterocromatina (Stewart y col., 2005).

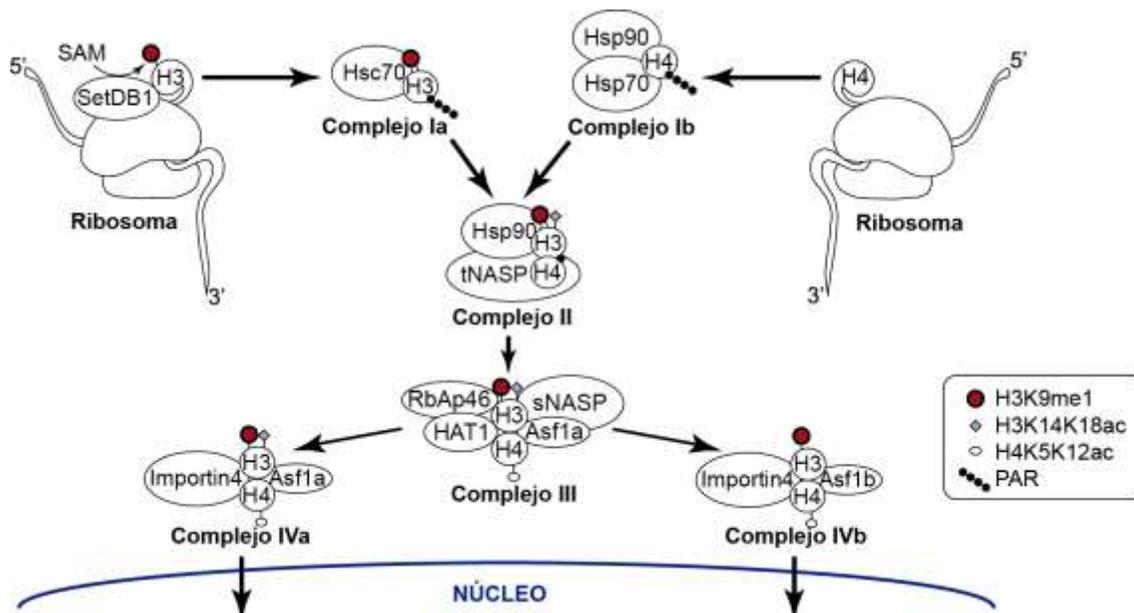


Figura 1: Cascada de maduración de H3 y H4 recién sintetizadas. Se muestra la vía por la cual las histonas H3 y H4, una vez que son sintetizadas en los ribosomas, forman una serie de complejos que van a guiarlas hacia su ingreso al núcleo, además de generar el heterodímero H3-H4 y establecer las distintas PTMs.

Sin embargo, H3K9me3 no solamente se encuentra en regiones de heterocromatina. También es posible encontrarla en regiones génicas, participando de un mecanismo de regulación transcripcional (Schultz y col., 2002). Un ejemplo es la regulación de la expresión de histonas. En *Drosophila* existe un mecanismo de inactivación de estos genes hacia el final de fase S, en donde el interruptor molecular HERS, al ser fosforilado en esta etapa del ciclo, se une a regiones reguladoras de la expresión de histonas y ancla HP1 y Suv39 a estas zonas. De esta manera se genera H3K9me3 induciendo la compactación de la cromatina y la inactivación de estos genes (Ito y col., 2012).

Existe una gran variedad de metiltransferasas de histonas, habiendo en mamíferos 6 enzimas capaces de metilar la H3K9, las cuales corresponden a Suv39h1, Suv39h2, EuHMTase, G9a, SetDB1 y SetDB2 (Kouzarides, 2007). La característica común de estas proteínas es la presencia de un dominio SET, el cual es específico para la metilación de H3K9 utilizando S-adenosil-metionina como cofactor (Dillon y col., 2005). Se ha reportado que algunas de estas enzimas presentan una localización subcelular predominante, encontrándose G9a y EuHMTasa principalmente en el núcleo y asociadas a la cromatina, Suv39H1/H2 principalmente asociadas a la cromatina, mientras que SetDB1 presenta una localización tanto nuclear como citosólica (Loyola y col., 2006).

SetDB1 ((Suppressor of variegation (Su(var)3-9), Enhancer of zeste(E(z)) and TriThorax) domain, bifurcated 1) es una enzima que posee 1291 aminoácidos de largo y un peso molecular de 143 kDa. Esta proteína, como su nombre lo indica, se caracteriza principalmente por poseer un dominio SET que le permite catalizar la reacción de metilación utilizando L-lisina como sustrato y SAM como cofactor, generando así S-adenosil-L-cisteína y N(6)-metil-L-Lisina en la histona H3. La actividad catalítica de esta proteína requiere de la presencia de dos dominios adyacentes ricos en cisteínas, Pre-SET y Post-SET (Harte y col., 1999). Además, el dominio SET presente en SetDB1 contiene una inserción de 347 aminoácidos conservada entre diversos organismos (Schultz y col., 2002), la cual, para que SetDB1 presente actividad catalítica, debe ser monoubiquitinada en la lisina 867 mediante la familia UBE2E de enzimas E2, de manera independiente de ligasas E3 (Sun & Fang, 2016). Esta proteína también posee un dominio MBD que se une a CpG metilados y dos dominios TUDOR, que en general actúan como adaptadores moleculares, uniéndose a lisinas metiladas y permitiendo el

ensamblaje de complejos macromoleculares (Schultz y col., 2002; Yang y col., 2002; Clough y col., 2007; Pek y col., 2012), (Figura 2).



Figura 2. Esquema de la proteína SetDB1. Se muestra la posición de los dos dominios Tudor, el dominio de unión a DNA metilado (MBD), los dominios Pre y Post-SET, y el dominio SET. La inserción de 347 aminoácidos se indica mediante la caja gris.

SetDB1 está implicado en varios procesos biológicos. Durante el desarrollo embrionario, ratones nulos para ESET, el ortólogo de SetDB1 en esta especie, presentan una alta tasa de mortalidad peri-implantación. Se ha especulado que esto se debería a que participa en la formación de patrones epigenéticos durante el desarrollo temprano (Dodge y col., 2004). Además, SetDB1 contribuye a la represión de genes que codifican para reguladores del desarrollo y a la mantención del estado troncal de las células embrionarias, por lo que la depleción de esta proteína puede llevar a la desestabilización del estado de troncalidad de las células embrionarias (Bilodeau y col., 2009). El silenciamiento de ESET en ratones también puede llevar a la diferenciación de estas células hacia células tipo trofoblasto, y a la inducción de genes asociados con este tipo celular. Esto ocurriría debido a que ESET estaría interactuando con el factor de transcripción Oct4, el cual a su vez recluta a ESET hacia genes asociados a trofoblasto para silenciarlos. De esta forma ESET estaría restringiendo la pluripotencialidad celular en células embrionarias (Yuan y col., 2009).

Por otro lado, SetDB1 se ha visto involucrado en el silenciamiento de retrovirus endógenos en primordios de la línea germinal de embriones. En estas células la transcripción de los retrovirus está inhibida por la metilación del DNA, sin embargo, al evitar la expresión de SetDB1 en estas células, se observa una disminución de la represión de los retrovirus endógenos, revelando que SetDB1 es esencial como guardián de la expresión proviral, previo a la metilación del DNA de la línea germinal (Liu y col., 2014). Esto también se ha visto a nivel global, en donde SetDB1 estaría generando un silenciamiento proviral a través de modificaciones de histonas (Matsui y col., 2010). Adicionalmente, SetDB1 se ha asociado a enfermedades neuronales como la enfermedad de Huntington, en donde ocurre una sobreexpresión de esta proteína en pacientes con dicha enfermedad generando un aumento de los niveles de H3K9me3 (Ryu y col., 2006). El mecanismo de esta sobreexpresión estaría mediado por la proteína mutada huntingtina, la cual induce el factor de transcripción Sp1, el cual a su vez activa la transcripción del gen que codifica para SetDB1 (Qiu y col., 2006).

Esta proteína también tendría un rol asociado a cáncer de hígado y melanoma. En el caso del cáncer de hígado, se ha observado que hay una sobreexpresión de SetDB1, y que además la inactivación de esta enzima disminuye el crecimiento celular. Esto ocurriría debido a que en células tumorales, p53, factor de transcripción que favorece el crecimiento celular, interactúa con SetDB1, lo cual genera la dimetilación de p53 en la lisina 370, aumentando la estabilidad de este factor (Fei y col., 2015). En melanoma, los niveles de SetDB1 también estarían aumentados, lo cual estaría acelerando la formación de melanomas y generando la desregulación de diversos genes (Ceol y col., 2011). SetDB1 tanto purificada desde células como la proteína recombinante genera las marcas H3K9me1, H3K9me2 y H3K9me3 en ensayos *in vitro*

(Schultz y col., 2002; Rivera y col., 2015). Sin embargo, la actividad de esta proteína puede variar al asociarse a otras proteínas, como por ejemplo, al unirse al co-represor mAM con el cual es capaz de trimetilar H3K9 (Yang y col., 2002).

En cuanto a su rol sobre H3K9me1 citosólico, en células HeLa se observó que una disminución de la expresión de SetDB1 conlleva a una baja en los niveles de esta marca (Loyola y col., 2009). Posteriormente se descubrió que SetDB1 es capaz de asociarse a los ribosomas, en donde cataliza de manera cotraduccional la reacción de monometilación de H3K9 (Rivera y col., 2015). Por lo tanto, SetDB1 sería capaz de generar un reservorio de H3K9me1 tanto en el citosol, acoplado a los ribosomas, como en el núcleo.

De acuerdo con los antecedentes expuestos, la actividad cotraduccional de SetDB1 sugiere que la presencia de la marca de monometilación sobre H3K9 debe tener una gran importancia para la célula dado que debe generarse en el momento en que la proteína es sintetizada, sin embargo, el hecho de que no todo el reservorio de H3 presente esta modificación apunta a que debe existir un mecanismo por el cual los niveles de H3K9me1 son regulados. Dado que H3 se expresa principalmente de manera acoplada a la fase S del ciclo celular (Marzluff & Duronio, 2002), una posibilidad es que la regulación de la generación de la marca esté ligada al ciclo, principalmente a dicha fase.

Por lo tanto, el presente proyecto propone estudiar la asociación de SetDB1 a los ribosomas en las distintas fases del ciclo celular y determinar su impacto sobre el establecimiento de H3K9me1, de manera de dar luces acerca de la forma en la que los niveles de H3K9me1 son regulados en la célula.

Hipótesis

- El avance de la fase S del ciclo celular se correlaciona con un aumento de la asociación de SetDB1 a los ribosomas, aumentando a su vez los niveles de H3K9me1.

Objetivo General

- Estudiar la asociación de SetDB1 a los ribosomas en las distintas fases del ciclo celular y correlacionar tal asociación con los niveles de H3K9me1 presentes en la histona H3 citosólica asociada a los ribosomas.

Objetivos Específicos

- Obtener cultivos sincrónicos de células HeLa mediante el doble bloqueo con timidina.
- Purificar polisomas desde células en distintas fases del ciclo celular y analizar los niveles de SetDB1, H3 y H3K9me1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y Soluciones

a. Material Biológico y Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular HeLa, proveniente de un carcinoma cervical humano, las que se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM HIGH GLUCOSE, suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-Glutamina (0,2 mM), Penicilina (10 U/mL) y Estreptomina (10 µg/mL), adquiridos en Hyclone. La Tripsina 5x se adquirió en GE Healthcare Life Science (Estados Unidos). El PBS pH 7,4 10x se adquirió en Thermo Fisher (Estados Unidos).

b. Sincronización celular, extracción de proteínas y cuantificación.

Los reactivos, Tris-HCl, SDS, EDTA, se adquirieron en Invitrogen (Estados Unidos). El cloruro de sodio se adquirió en Merck (Alemania). El cloruro de potasio, el DTT, el NP-40, el Tritón X-100, la leupeptina, la aprotinina, la cicloheximida y la timidina, se adquirieron en Sigma-Aldrich (Estados Unidos). El PMSF se adquirió en AppliChem (Alemania). 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).

c. Western Blot

El Tris, acrilamida y bis-acrilamida se adquirieron en Invitrogen (Estados Unidos). El Azul de Bromofenol se adquirió en Merck (Alemania). El BSA en polvo liofilizado se adquirió en Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Los compuestos Rojo Ponceau S, TEMED, Tween 20 y β-mercaptoetanol y se adquirieron en Winkler

(México). El glicerol de grado analítico se adquirió en Calbiochem (Alemania). El APS se adquirió en AppliChem (Alemania). Las membranas de PVDF de 0,45 μm y el estándar de peso molecular para SDS-PAGE "PageRuler™ Prestained Protein Ladder" se adquirieron en Thermo Scientific (Estados Unidos). Los kits de quimio-luminiscencia "SuperSignal® West ECL Chemiluminescent Substrate", "SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate" y "SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate" se adquirieron en Thermo Scientific (Estados Unidos). Las soluciones de revelado y fijación, así como las películas radiográficas, se adquirieron en AGFA (Argentina).

Los geles separadores de poliacrilamida empleados en SDS-PAGE se prepararon a la concentración requerida de acrilamida según las muestras a analizar, 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 0,6% (p/v) y 0,2% (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 añadió APS y TEMED a concentraciones finales de 0,6% (p/v) y 0,2% (v/v), respectivamente.

Los anticuerpos primarios anti Histona H3 (N° de catálogo: ab1791), anti H3K9me1 (N° de catálogo: ab9045), anti RPL5 (N° de catálogo: ab74744), anti RPS3A (N° de catálogo: ab171742), anti SetDB1 (N° de catálogo: ab9045) y anti β -Actina (N° de catálogo: ab3280) se adquirieron en Abcam (Reino Unido). Los anticuerpos anti ciclina B1 (N° de catálogo: 4138) y anti Ciclina E1 (N° de catálogo: 4129) se adquirieron en Cell Signaling (Estados Unidos). Los anticuerpos secundarios anti IgG

de conejo acoplado a peroxidasa de rabanito (N° de catálogo: 611-7302) y anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (N° de catálogo: 610-1302), se adquirieron en Rockland (Estados Unidos).

d. Citometría de Flujo

La RNasa se adquirió en Invitrogen (Estados Unidos). El Yoduro de Propidio se adquirió en Life Technologies (Estados Unidos).

e. Otros reactivos

El etanol, isopropanol, ácido clorhídrico fumante (37%), acetona y metanol se adquirieron en Merck (Alemania). El ácido tricloroacético y el Azul de Coomassie "Brilliant Blue G-250", se adquirieron en Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

f. Equipos

Las centrifugaciones para colectar las células se realizaron en una centrífuga "Eppendorf® Centrifuge 5702" de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Las centrifugaciones a 4°C se realizaron en una centrífuga "Heraeus Fresco™ 17 Microcentrifuge W", modelo 75002420 de Thermo Scientific (Estados Unidos) o en una Ultracentrífuga "Beckman Óptima™ XL-100K Ultra centrifuge" de Beckman-Coulter (Estados Unidos), empleando el rotor SW 55 del mismo fabricante.

2. Soluciones y Tampones.

Se utilizó agua destilada para completar los volúmenes de aquellas soluciones que presentan sus concentraciones en porcentaje (p/v) o (v/v).

a. Tampón 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 tampón en la muestra hasta una concentración 1X.

b. Tampón de corrida 10X

Se preparó con concentraciones de 250 mM Tris, 2 M Glicina y 1% (p/v) SDS. Para realizar el SDS-Page se llevó a 1X diluyéndolo con agua destilada.

c. Tampón de transferencia

Se utilizó para transferir las proteínas desde los geles de poliacrilamida hacia las membranas de PVDF, se preparó con tampón de corrida 10X, metanol y agua destilada en proporciones 1:2:7, respectivamente.

d. Solución de bloqueo

Se empleó 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.

e. Rojo Ponceau

Se utilizó para la tinción de las membranas de PVDF. Se preparó con una solución de 0,1% (p/v) Rojo Ponceau y 5% (v/v) ácido acético.

f. Tampón RIPA

Se usó para realizar extracto total de proteínas. Se preparó con concentraciones de 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% (p/v) NP-40, 1% (v/v) Desoxicolato de sodio, 0,1% (v/v) SDS y 1 mM EDTA.

g. Tampón de lisis celular

Se empleó para romper las células de las cuales se obtuvieron los polisomas. Se preparó con una composición de 100 mM Tris (pH 7,4), 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 100 µg/ml cicloheximida, 1 mM DTT, 100 µM PMSF, 4 µM Leupeptina, 0,3 µM aprotitina y 1% Tritón X-100.

h. Colchón de sacarosa

En esta solución se centrifugaron los extractos celulares desde donde se obtuvieron los polisomas. Consistía en 35% (p/v) sacarosa, 10 mM Tris (pH 7,4), 85 mM KCl y 5 mM MgCl₂.

i. Tampón de resuspensión

Utilizado para resuspender los polisomas. Estaba compuesto de 10 mM Tris (pH 7,4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ y 0,2 mM DTT.

3. Métodos

a. Cultivo y sincronización del ciclo celular:

Células HeLa se cultivaron en monocapas para realizar un bloqueo doble con timidina según lo descrito (Xeros, 1962). Brevemente, se sembraron células a un 30% de confluencia y se añadió 2 mM de timidina durante 16 h. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS y se liberaron en medio libre de timidina por 9 h. Luego se repitió el bloqueo con 2 mM de timidina durante 16 h para finalmente liberar las

células hacia el avance del ciclo celular. Luego se tripsinizaron y colectaron a distintos tiempos post-desbloqueo de manera de obtener células sincronizadas en distintos puntos del ciclo celular.

b. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo:

Posterior a la sincronización, y para verificar el proceso, se colectaron 2×10^6 células, las que se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Luego se fijaron agregando gota a gota, en baja agitación, etanol frío hasta llegar a una concentración de 70% (v/v). Las células se mantuvieron durante toda la noche a -20°C . Posteriormente, se lavaron con PBS e incubaron con 300 μL de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAsa A en PBS durante toda la noche, a 4°C . Finalmente, las células se diluyeron hasta una concentración de 2×10^6 células/mL y a 500 μL se le agregó 2 μL de 10 mg/mL PI para luego ser analizadas a través del citometría de flujo.

c. Extracto total:

Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a temperatura ambiente a 800 g por 5 min. Las células sedimentadas se trataron con un volumen igual al volumen de células utilizando el buffer RIPA. Se resuspendieron en el buffer y se dejaron en rotación a 4°C por 20 min, para luego ser centrifugadas a $13.300 \times g$ por 20 min. Finalmente el sobrenadante se recuperó y se midió su concentración mediante el método de Bradford. Se prepararon alícuotas a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas y se almacenaron a -80°C .

d. Obtención de polisomas:

Los polisomas se obtuvieron a partir de 25×10^6 células para cada punto a analizar, tanto para células sincronizadas como células asincrónicas, según lo descrito

por Rivera y col. (2015). Brevemente, las células HeLa se incubaron con 100 µg/mL de cicloheximida durante 1 h previo a su recolección. Luego de tripsinizarlas y lavarlas con PBS, se incubaron en rotación durante 20 min a 4°C en el tampón de lisis celular. Finalizada la incubación, las células se centrifugaron en frío (4°C) a 13300 x g durante 20 min, siendo luego el sobrenadante cargado sobre un colchón de sacarosa completando un volumen final de 5 mL en tubos Thinwall, Ultra-Clear™ 5 mL (Beckman). El colchón se ultracentrifugó en frío (4°C) en un rotor SW55 (Beckman) durante 16 h a 116000 x g, para luego resuspender el pellet generado, enriquecido en ribosomas, en el tampón de resuspensión. Se midió la concentración de RNA utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se prepararon alícuotas con una concentración de 600 ng/µL y se almacenaron a -80°C. Las proteínas asociadas a los ribosomas purificados se analizaron a través de Western blot.

e. Western Blot:

Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE. Luego de transferir las proteínas desde los geles de poliacrilamida a las membranas de PVDF, a una corriente de 400 mA por 90 min, éstas se tiñeron usando la solución de Rojo Ponceau, durante 10 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 T-TBS 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 rabanito, durante 1h, a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se preparó en T-TBS 1X en proporción de 1:5000, excepto cuando se usó

como anticuerpo primario anti Histona H3, usándose en ese caso el anticuerpo secundario en proporción 1:10000. 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.

f. Programas y Análisis Informáticos:

La citometría de flujo se realizó utilizando el programa “BD FACSDIVA™ Software” (BD Biosciences). Los análisis de ciclo celular se realizaron en el programa “FlowJo vX.0.7” (Tree Star). Los análisis de densitometría se efectuaron con el programa “ImageJ 1.43m” (National Institute of Health). Los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad). Este programa también se utilizó para los análisis estadísticos, realizando un test de ANOVA y posteriormente un test de Tukey entre todos los pares de columnas. Valores de $p \leq 0,05$ se consideraron como significativos. La edición de imágenes y figuras se realizó con los Programas Adobe Photoshop CS3 Extended y Adobe Illustrator CC2014 (Adobe Systems).

RESULTADOS

1. Sincronización de células HeLa.

Para poder estudiar la asociación de SetDB1 a los ribosomas y los niveles de H3K9me1 durante las distintas etapas del ciclo celular, se obtuvo en primera instancia células sincronizadas y se determinaron los tiempos a analizar dentro del ciclo celular.

a. Obtención de células sincronizadas mediante el doble bloqueo con timidina.

Para sincronizar las células se utilizó la técnica de doble bloqueo con timidina esquematizada en la Figura 3, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Luego se colectaron las células entre 0 y 345 min una vez finalizado el segundo bloqueo.

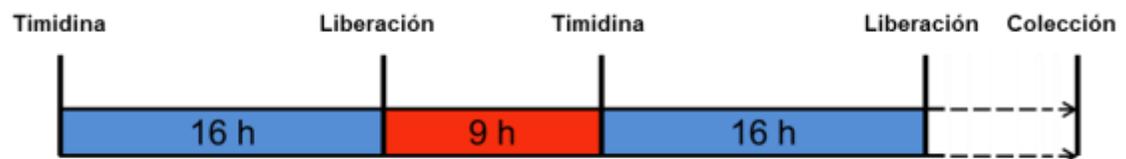


Figura 3. Esquema de sincronización celular mediante doble bloqueo con timidina. Se indican los puntos en donde se adiciona timidina 2 mM y donde se liberan las células para continuar con el ciclo celular. Los pasos de liberación implican el lavado de las células y cambio de medio de modo de retirar el exceso de timidina. Finalmente las células son colectadas, lo que se indica con las líneas segmentadas que representan una cinética de tiempo variable, posterior al doble bloqueo con timidina.

Como control se utilizaron células que se sometieron a los mismos cambios de medio, pero sin la adición de timidina. Las células colectadas se analizaron mediante citometría de flujo utilizando PI para determinar la cantidad de DNA en cada célula. Aquellas que se encuentran en la fase G1/G0 del ciclo, presentan una cantidad de DNA equivalente a 2C. Las que se encuentran en G2 o en mitosis, tienen una cantidad de DNA correspondiente a 4C. Aquellas que poseen una cantidad intermedia, entre 2C y 4C, son las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular (Figura 4A).

Se colectaron muestras cada 45 min hasta los 225 min de manera de analizar con mayor detalle lo que corresponde a la fase S del ciclo celular, y luego cada 60 min hasta llegar a los 345 min, en donde se espera encontrar las células sincronizadas en G2 o M. En los histogramas obtenidos (Figura 4B) se observó una distribución que corresponde a lo esperado en la condición control, es decir, una alta cantidad de células formando un pico en 50K en el canal PE-A, una población distribuida uniformemente entre 50K y 100K, y una segunda acumulación de células en el valor 100K en el canal PE-A, pero compuesta de menos células que la población correspondiente a 50K. En las células obtenidas a 0 min posterior al segundo bloqueo, se observó un primer pico, correspondiente a células en G1/G0, y luego un segundo pico correspondiente a células sincronizadas en un punto de la fase S. Este segundo pico se desplazó hacia la derecha a medida el tiempo transcurrió hasta los 285 min, indicando que había una población sincronizada en la fase S que luego pasó a estar en G2/M. Transcurridos 345 min post segundo bloqueo, la altura del segundo pico disminuyó, mientras que la del primer pico aumentó, indicando que las células volvieron a fase G1/G0.

La cuantificación de cada una de las poblaciones se muestra en la Figura 4C. En la condición control un 55,9% de las células se encuentran en G1/G0, mientras que un 23,6% de las células se encuentran en la fase S y un 20,5% en G2/M. En el caso de las células sincronizadas, a los 0 min 15,4% se encontraban en G1/G0, población que se mantuvo relativamente constante, sin sobrepasar el 20% del total de células hasta los 285 min, y sólo aumentando hasta el 35% a los 345 min. En cuanto a las células en S, a los 0 min el 60,6% se encontraba en esta fase, porcentaje que disminuyó casi a la mitad a los 135 min, alcanzando el 32,4%, y a un tercio a los 285 min, llegando sólo al 20%. Por otro lado, la población de células en G2/M aumentó a medida disminuyó la población en S, como era de esperar. A 0 min, el 24% de las células estaban en G2/M, pero esto aumentó hasta llegar al 62,9% de la población a los 225 min, valor que se mantuvo constante hasta los 345 min, donde disminuyó hasta el 51,6%, indicando que a este tiempo las células ya comenzaron a salir de G2/M y a entrar en G1/G0.

Considerando lo anterior, se determinó que entre los 0 y los 90 min las células están predominantemente en fase S, entre los 135 y 345 min están principalmente en G2/M, y que a los 345 min era posible encontrar células que terminaron una ronda de división, por lo que se consideró este tiempo como el límite para observar células en G2/M. Además, como se esperaba, se determinó que el protocolo de sincronización estaba funcionando.

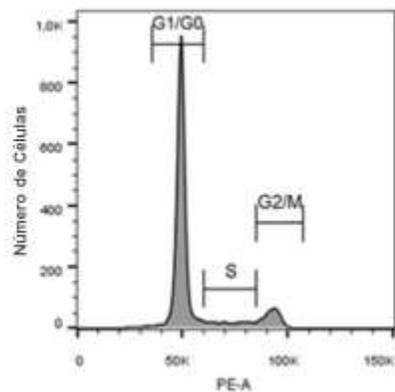
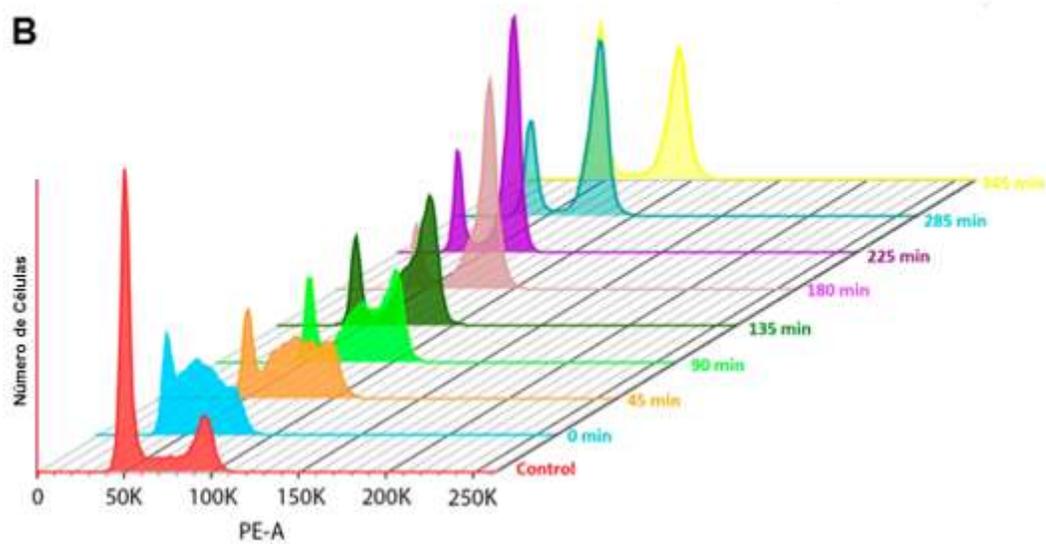
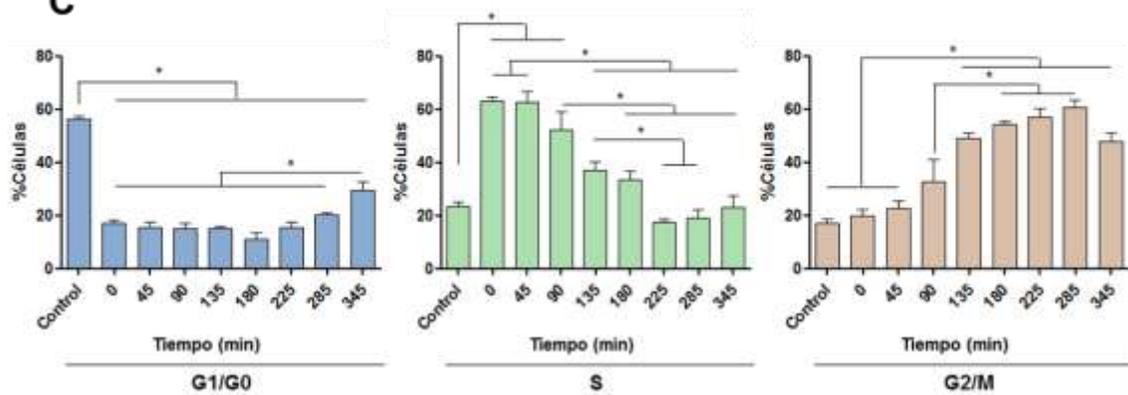
A**B****C**

Figura 4. Sincronización de células HeLa. (A) Histograma modelo de células asincrónicas. Se muestra un histograma representativo de células sin sincronizar. En el eje Y se presenta el número de células para cada valor en el eje X. El canal PE-A se presenta en el eje X y corresponde a una cuantificación de la señal proveniente de la fluorescencia del PI, la cual es directamente proporcional a la cantidad de DNA en cada célula. Se identifican las poblaciones con una cantidad de DNA equivalente a 2C, 2C-4C y 4C, correspondientes a células en las fases del ciclo celular G1/G0, S y G2/M, respectivamente. **(B) Histograma de células sincronizadas.** Se muestra un experimento representativo de células sincronizadas mediante un doble bloqueo con timidina y liberadas durante diferentes tiempos. Se superpusieron en el eje Z los histogramas obtenidos para el grupo control, y las células sincronizadas a distintos tiempos, indicados a la derecha de cada histograma. **(C) Porcentaje de células en las fases G1/G0, S y G2/M a los distintos tiempos post-sincronización.** Se indica el porcentaje de células en las fases del ciclo celular G1/G0 (izquierda), S (medio) y G2/M (derecha), obtenidos para las células sincronizadas colectadas a los distintos tiempos. n=3, (* p ≤ 0,05).

b. Obtención de células sincronizadas en presencia de cicloheximida.

Debido a que el protocolo de obtención de polisomas incluye el uso de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas que impide la separación de las subunidades de los ribosomas que están traduciendo, era necesario investigar si esta molécula altera el avance del ciclo celular. Para determinar esto, se utilizó el mismo protocolo de sincronización, pero agregando cicloheximida 1h previo a la colección de las células. Al igual que en el caso anterior, las células sincronizadas se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 5A. Como era de esperar, se observó el desplazamiento a lo largo del tiempo de una población de células en la fase S, que aumentó de manera conjunta la cantidad de DNA en su interior. Sin embargo, se obtuvo una cinética del ciclo celular diferente con respecto a la sincronización realizada sin cicloheximida (comparar Figura 5A y Figura 4A). El avance del ciclo se retrasó por la presencia de cicloheximida, lo que se vio reflejado en que recién a los 300 min la cantidad de células en la fase S empezó a disminuir, alcanzando un 56,6% de células en esta fase, y disminuyendo a un 29,7% a los 400 min (Figura 5B), a diferencia de lo que ocurrió con el experimento mostrado en la Figura 4B, en donde a los 285 y 345 min aproximadamente un 15% de las células estaban en fase S. De esto se concluye que a los 0 min la mayoría de las células se encuentran en G1/G0, entre los 90 y 300 min la mayor parte de las células se encontraban en fase S, y a los 400 min la población predominante pertenece a la fase G2/M.

Para corroborar la sincronización celular a nivel de proteínas, se realizaron extractos de proteínas totales desde células sincronizadas en presencia de cicloheximida y se analizaron los niveles de ciclinas E1 y B1 mediante Western Blot,

utilizando β -actina como control de carga (Figura 5C). La ciclina E1 tiene su pico de expresión al final de la fase G1, mientras que la ciclina B1 lo presenta en mitosis (Truman y col., 2001). Las células obtenidas a los 0 min post bloqueo presentaron el pico de la expresión de ciclina E1, expresión que disminuyó con el avance del tiempo. Por otro lado, en cuanto a la ciclina B1, se observó una baja expresión a lo largo del tiempo, presentando un pico de expresión a los 400 min. Estos resultados indicaron que a los 0 min, las células se encontraban en la transición desde G1 hacia S, que entre los 90 y 300 min las células estaban principalmente en la fase S del ciclo celular, y que a los 400 min las células estaban entre G2 y M. Además se evidenció que el avance del ciclo se produjo de manera normal en las células sincronizadas.

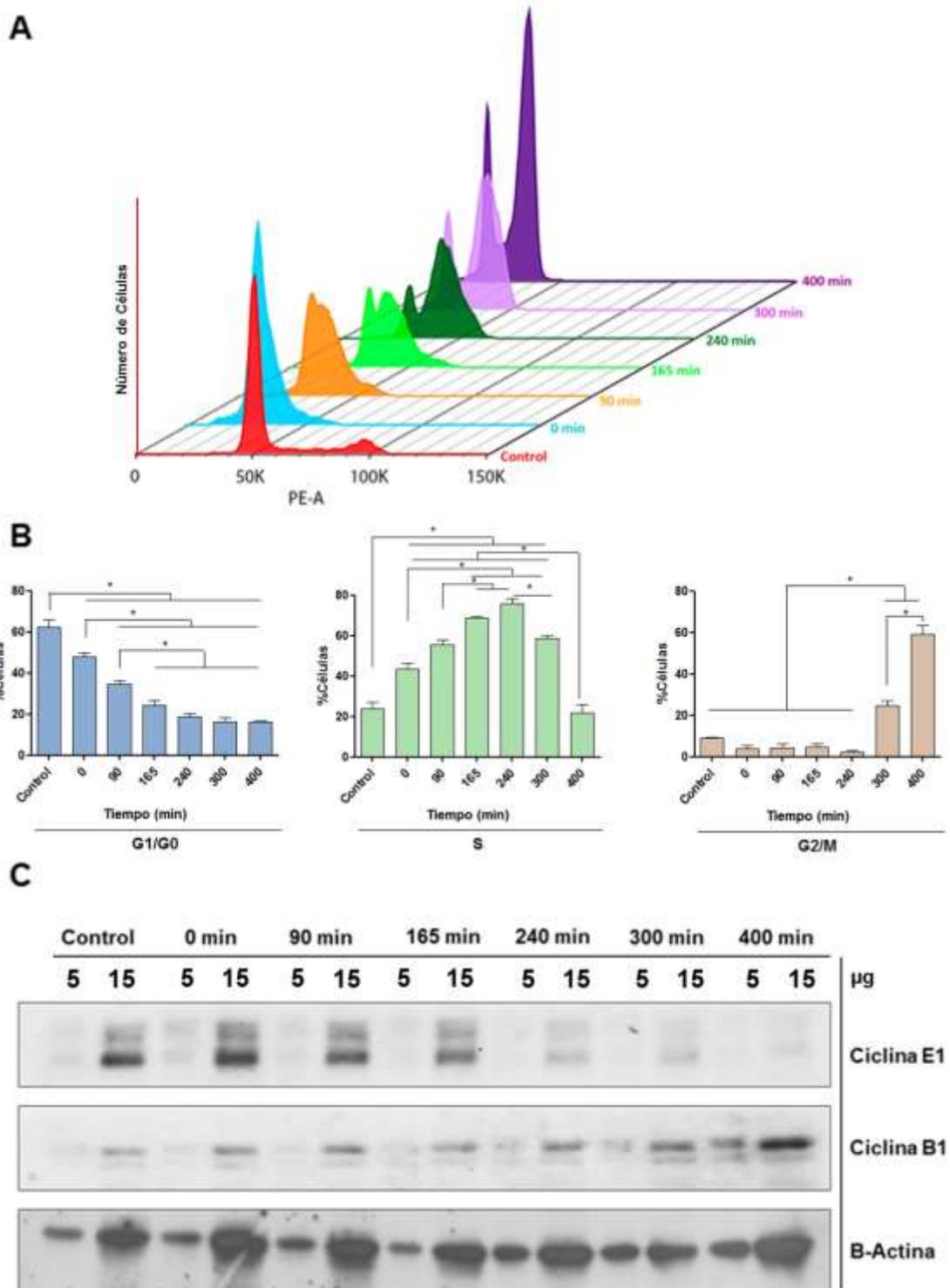


Figura 5. Desarrollo del ciclo celular en presencia de cicloheximida. (A) Histograma de ciclo celular mediante citometría de flujo en presencia de cicloheximida. Se superpusieron los histogramas de células sincronizadas en distintos puntos del ciclo celular, cultivadas presencia de cicloheximida durante 1 hora previo a la colección de las células. **(B) Porcentaje de células en cada fase del ciclo a los distintos tiempos post-sincronización.** Se indica el porcentaje de células en las fases del ciclo celular G1/G0 (izquierda), S (medio) y G2/M (derecha), obtenidos para las células sincronizadas colectadas a los distintos tiempos. **(C) Determinación de los niveles de ciclinas en células sincronizadas mediante Western Blot.** Para cada muestra, se cargaron 5 y 15 μg de proteínas proveniente de extractos totales en geles al 8% (p/V) de acrilamida. Los anticuerpos anti Ciclina E1, anti Ciclina B1 y anti β -Actina se usaron a una dilución 1:1000. n=3 (Ver Anexo 1), (* $p \leq 0,05$).

Recopilando todos los resultados anteriores, se les asignó un nombre a las poblaciones de células obtenidas en los distintos tiempos, de acuerdo al momento del ciclo al que corresponden. Cero min correspondió a células en la interfase G1/S (G1); 90 min se consideró como el inicio de la fase S (IS); 165 min como el medio de la fase S (MS); 240 min como un momento intermedio entre la mitad y el final de la fase S (MFS); 300 min como el final de la fase S (FS); y 400 min como un momento en el cual las células estarían entre G2 y la fase M del ciclo celular (G2/M). Por lo tanto, se logró establecer las condiciones para la sincronización de las células HeLa.

2. Determinación de los niveles de SetDB1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.

Con el objetivo de estudiar si la asociación de SetDB1 a los ribosomas se regula de manera dependiente del ciclo celular, se estudiaron polisomas aislados desde células sincronizadas en las distintas fases del ciclo celular.

Se corroboró la sincronización mediante citometría de flujo analizando una muestra al momento de la colección de las células (Figura 6A). Se observó que el pico de células en fase S se desplazaba hacia la derecha a lo largo del tiempo de acuerdo a lo esperado, hasta llegar hacia la zona del histograma correspondiente a la fase G2/M, de manera similar a lo visto en la Figura 5A, indicando que las células estaban sincronizadas en distintas etapas del ciclo celular. Una vez obtenidos los polisomas, se analizaron mediante Western Blot (Figura 6B). Dado que la concentración de las muestras obtenidas se midió en función de RNA, se utilizaron como control de carga las proteínas ribosomales RPL5 y RPS3, cuya cantidad debiese ser directamente proporcional a la cantidad de RNA. Se observaron niveles constantes de RPL5 y RPS3, indicando que se cargó la misma cantidad de polisomas para cada punto. Al

observar los niveles de SetDB1 en los polisomas, se pudo apreciar que una vez iniciada la fase S estos niveles se mantuvieron constantes entre G1 y S, aumentando en MS y alcanzando un pico en MFS, para luego disminuir levemente en FS, y de manera mucho más drástica en G2/M. Esto nos indicaría que SetDB1 se acumula en los polisomas en la mitad de la fase S.

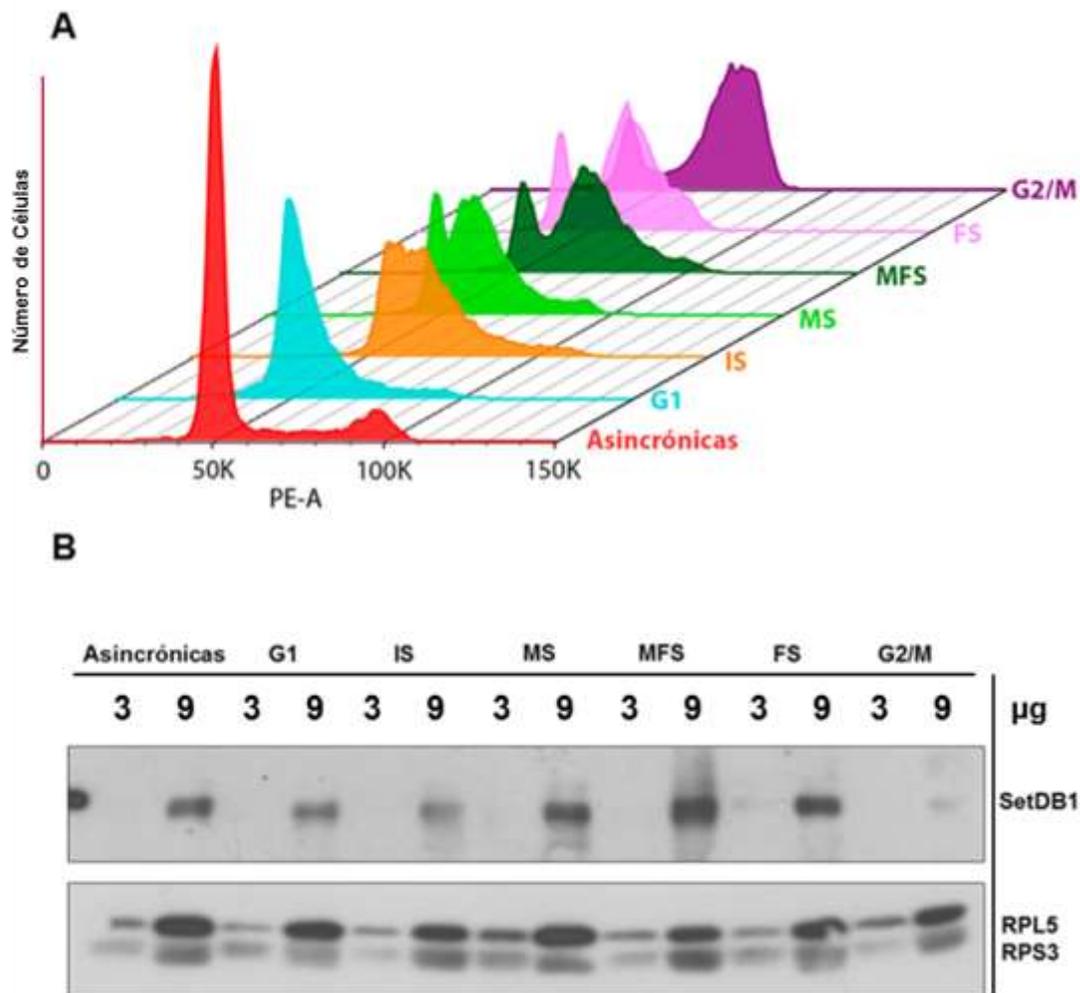


Figura 6. Determinación de los niveles de SetDB1 en polisomas de células sincronizadas. (A) Histograma de células sincronizadas utilizadas para la obtención de polisomas. Se muestra la superposición de los histogramas de células sincronizadas para la purificación de polisomas. La figura corresponde a una imagen representativa de tres réplicas de purificación. **(B) Análisis mediante Western Blot de los niveles de SetDB1 presentes en polisomas.** Se utilizaron geles al 8% (p/V) de acrilamida y se cargaron 3 y 9 µg de RNA para cada muestra. El anticuerpo anti SetDB1 se utilizó a una dilución 1:1000 mientras que los anticuerpos anti RPL5 y anti RPS3 se utilizaron en una mezcla de ambos a una dilución 1:64000 y 1:160000, respectivamente. Los geles mostrados son representativos de 3 réplicas biológicas (Ver Anexo 2).

3. Determinación de los niveles de H3K9me1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.

Utilizando los mismos polisomas obtenidos para analizar la presencia de SetDB1 a lo largo del ciclo celular, se examinó la presencia de H3 y H3K9me1, utilizando nuevamente RPL5 y RPS3 como control de carga. Los resultados obtenidos de los Western Blots de H3 (Figura 7A) mostraron que esta proteína se acumuló principalmente en el punto correspondiente a G1, para luego decaer levemente en IS y aún más en MS. Posteriormente, se observó una acumulación en FS.

Al analizar los niveles de H3K9me1 (Figura 7B), se observó, al igual que para H3, una acumulación en G1, para luego disminuir al avanzar el ciclo, como se evidenció para IS y MS. Posteriormente se observó un aumento de H3K9me1 hacia el final del ciclo celular, con un pico en MFS.

Finalmente, del análisis de los polisomas se desprende que SetDB1 y H3K9me1 se acumulan al final de la fase S del ciclo celular.

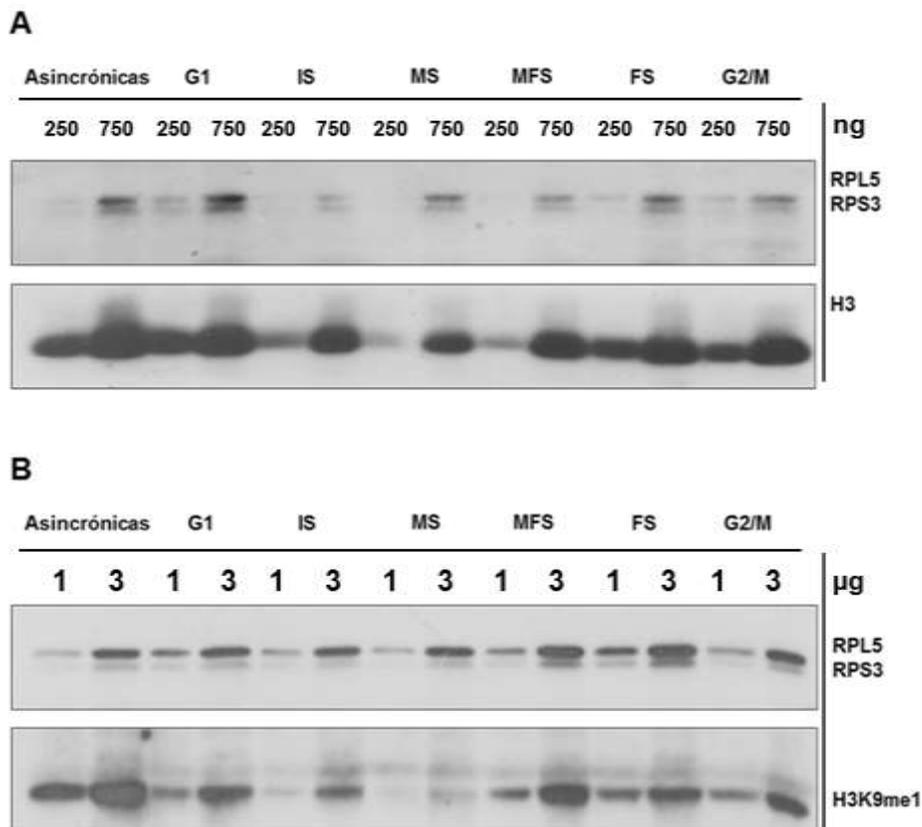


Figura 7. Determinación de los niveles de H3 y H3K9me1 en polisomas de células sincronizadas.

(A) Análisis mediante Western Blot de los niveles de H3 presentes en polisomas. Se utilizaron geles al 12,5% (p/V) de acrilamida y se cargaron 250 y 750 ng de RNA para cada muestra. El anticuerpo anti H3 se utilizó a una dilución 1:10000 mientras que los anticuerpos anti RPL5 y anti RPS3 se utilizaron en una mezcla de ambos a una dilución 1:16000 y 1:40000, respectivamente. Los geles mostrados son representativos de 3 réplicas biológicas. **(B) Análisis mediante Western Blot de los niveles de H3K9me1 presentes en polisomas.** Se utilizaron geles al 12,5% (p/V) de acrilamida y se cargaron 1 y 3 µg de RNA para cada muestra. El anticuerpo anti H3K9me1 se utilizó a una dilución 1:1000 mientras que los anticuerpos anti RPL5 y anti RPS3 se utilizaron en una mezcla de ambos a una dilución 1:16000 y 1:40000, respectivamente. Los geles mostrados son representativos de 3 réplicas biológicas (Ver Anexo 3).

DISCUSIÓN

1. Sincronización de Células HeLa.

Debido a que deseábamos estudiar la presencia de SetDB1 y el estado de la marca H3K9me1 en los polisomas en distintas etapas del ciclo celular, era necesario en primera instancia generar células sincronizadas. Dado que H3 se expresa asociada a la fase S del ciclo celular (Marzluff & Duronio, 2002), y a que la marca H3K9me1 está involucrada en la generación de heterocromatina, evento que se desarrolla al final de S (Cowell y col., 2002), decidimos usar un método que nos permitiera obtener células sincronizadas en distintas etapas de esta fase. El doble bloqueo con timidina permite detener el avance del ciclo celular durante la transición entre G1 y S (Xeros, 1962). Esto ocurriría presumiblemente debido a una disminución del reservorio de dCTP, desoxinucleótido necesario para la síntesis de DNA (Bjursell & Reichard, 1973).

En células HeLa asincrónicas, la duración de la fase S del ciclo celular es de 500 min, mientras que la duración del ciclo completo es de alrededor de 20 horas (Hahn y col., 2009). Sin embargo, en células sincrónicas, la duración de la fase S es menor, entre 200 y 260 min (Whitfield y col., 2002). Esto se condice con nuestros resultados de sincronización, ya que a los 285 min se logró obtener células que estaban reingresando a G1.

Una vez que se obtuvieron células en distintos puntos del ciclo celular y dentro de la fase S, se procedió a sincronizar células en presencia de cicloheximida. Esta molécula bloquea la elongación traduccional y no altera el perfil de purificación de polisomas (Schneider-poetsch y col., 2010). Estas características hacen idónea a la

cicloheximida para purificar ribosomas que se encuentran en estado de traducción, pero dado que es un inhibidor de la síntesis de proteínas podría retrasar el avance del ciclo celular. De hecho, se ha reportado que la cicloheximida es capaz de detener el avance del ciclo celular en distintas fases (Verbin & Farber, 1967; Ranning y col., 1981; Liu y col., 2010). Se observó que efectivamente hubo un retraso en el avance del ciclo, y que además las células estaban en mayor sincronía dado que la forma de los picos era más angosta. Además la cantidad de células que se encontraban en fase S aumentó, llegando hasta aproximadamente un 80%, en comparación al 60% obtenido en ausencia de cicloheximida (Figura 4C), y el cambio de fase entre S y G2/M fue más notorio que en la sincronización sin cicloheximida. Probablemente esto se deba a que al inhibir la síntesis de proteínas, el avance del ciclo se ralentice por el alto requerimiento de nuevas proteínas que tiene la célula en ese momento.

Dado que la expresión de ciclinas controla el avance del ciclo celular (Truman y col., 2001), consideramos que el flujo normal de estas proteínas debiese mostrar que el ciclo celular se estaba desarrollando de manera habitual. Ciclina E1 tiene su mayor expresión hacia el final de G1, mientras que ciclina B1 tiene una máxima expresión en mitosis (Truman y col., 2001). De acuerdo a nuestros resultados, se nombró a las distintas muestras de células sincronizadas según su posición en el ciclo. Las células que presentaban la mayor expresión de E1 se consideraron como G1, tomando en cuenta además el efecto de la sincronización y de la cicloheximida. Aquellas células obtenidas a 400 min post sincronización se denominaron como G2/M (es decir, que pueden pertenecer a G2 o a mitosis). El resto de las muestras de células sincronizadas a los distintos tiempos se nombraron de acuerdo al avance de la fase S. Una limitación de este experimento es que no logramos discernir entre células en G2 y M, ya que no

analizamos la presencia de ciclina A, que tiene su máxima expresión en G2, decayendo rápidamente en mitosis.

2. Determinación de los niveles de SetDB1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.

Observamos que SetDB1 se encuentra unida a los ribosomas durante todas las etapas del ciclo celular analizadas. Sin embargo, se observa una acumulación de SetDB1 en los ribosomas hacia el final de la fase S del ciclo celular, en particular en MFS (Figura 6B). Esto podría deberse a que al final de la fase S, el requerimiento celular de H3K9me1 sería mayor, dado que como ya se mencionó, es una marca necesaria para la generación de dominios de heterocromatina (Rivera y col., 2014). Además, la incorporación de H3K9me1 a la cromatina conllevaría, entre varios otros sucesos, la represión estable de la expresión de mRNAs de histonas mediante el mecanismo de represión de genes de Histonas, el cual es dirigido en *Drosophila* por la proteína HERS. Se ha observado que la expresión de este interruptor molecular en células humanas y de ratón, genera una detención del ciclo celular en G2/M, sugiriendo la presencia de homólogos de esta proteína en mamíferos. Sin embargo, su rol en estos animales aún debe ser investigado (Ito y col., 2012). De existir un mecanismo similar en mamíferos, se estaría generando un sistema de retroalimentación negativo en donde el aumento de H3K9me1 hacia el final de la fase S se traduciría en mayores niveles de H3K9me3 conllevando a mayor compactación de la cromatina, e impidiendo así la transcripción de genes de Histonas.

En cuanto a la forma en que se regula la unión entre SetDB1 y el ribosoma, no hay respuestas claras hasta la fecha. Una posibilidad es que sea a través de uno de los dos dominios Tudor presentes en SetDB1. Se ha visto que estos dominios, que son

capaces de reconocer lisinas metiladas (Pek y col., 2012), también están presentes en una variedad de proteínas que interactúan con RNA (Ponting, 1997). Por lo tanto, es posible que la interacción de SetDB1 con el ribosoma ocurra a través de la unión de uno de sus dominios Tudor al RNA ribosomal. El mecanismo de interacción entre SetDB1 y los ribosomas se espera analizar en el futuro, enfocando los estudios hacia la interacción de estos dominios con el RNA, o en su defecto, con proteínas ribosomales.

3. Determinación de los niveles de H3K9me1 en polisomas aislados desde células en distintas fases del ciclo celular.

Al estudiar la presencia de H3 y H3K9me1 lo primero que notamos fue la acumulación de ambas en la fase media/final de S (Figura 7A-B). Debido a la especificidad del anticuerpo contra H3K9me1, es de esperar que al aumentar la presencia de H3, H3K9me1 también aumente. Sin embargo los análisis de densitometría mostraron que el aumento ocurría independientemente de los niveles de H3, particularmente en G1, MFS y G2/M. La acumulación de esta marca en momentos distintos del ciclo, podría indicar roles distintos. En primera instancia, hacia el final de G1 y el inicio de S, habría un aumento de H3 dedicado a la mantención del reservorio de histonas para su uso en la estructuración de nueva cromatina debido al proceso de replicación del DNA. Por lo tanto, la generación de H3K9me1 en esta fase estaría principalmente dedicada a la cascada de maduración de H3, generando el correcto plegamiento y preparación de las histonas para su entrada al núcleo y posterior incorporación a la cromatina. Aquí, posiblemente H3K9me1 no tendría un rol para generar dominios de heterocromatina, sino que cumpliría una función aún no descrita

dentro del correcto procesamiento de las histonas recientemente sintetizadas, función que está siendo investigada en nuestro laboratorio.

Dado que, como se mencionó previamente, una fracción de las histonas no nucleosomales se encuentran metiladas (Loyola y col., 2006), es probable que haya un mecanismo de incorporación de histonas a la cromatina que no incluya H3K9me1. Prueba de esto es que se ha visto que los niveles de H3K9me1 aumentan al comparar cromatina naciente con cromatina madura, es decir post proceso de replicación (Alabert y col., 2014).

En cuanto al siguiente aumento de H3 y H3K9me1 en MFS, este podría relacionarse a que las histonas recientemente sintetizadas estarían dirigidas a la generación de dominios de heterocromatina al generarse un reservorio de uso directo de histona H3K9 metilada para ser incorporada en la cromatina.

Considerando todo lo anteriormente expuesto, y a modo de resumen de lo discutido, postulamos que SetDB1 y H3K9me1 tendrían funciones distintas al inicio y término de la fase S del ciclo celular. En el primer caso, se generaría la marca necesaria para el correcto procesamiento de la histona H3, pasando a través a la cascada de maduración e ingresando al núcleo, perdiendo la marca de monometilación en algún momento previo a la formación de nuevos nucleosomas, permitiendo que se estructure cromatina que no necesariamente será compactada de manera inmediata. De esta forma, H3K9me1 recientemente sintetizado no tendría un uso directo en la formación de dominios de heterocromatina. Posteriormente, hacia el final de S, se produciría el reservorio de H3K9me1 que será usado como sustrato para generar dominios de heterocromatina, es decir, la histona H3 mantendría la marca de

monometilación después de la cascada de maduración y se incorporaría a la cromatina, pudiendo ser entonces usada de manera directa para la formación de dominios de Heterocromatina (Figura 8).

En cuanto a las proyecciones de este trabajo, como se mencionó, consideramos necesario evaluar la actividad metiltransferasa de los polisomas provenientes de células sincronizadas mediante ensayos *in vitro*. Además, estudiar la presencia de desmetilasas y otras proteínas asociadas a la mantención del reservorio de H3 citosólico, e investigar cómo se regula la asociación diferencial de SetDB1 a los polisomas durante las distintas etapas del ciclo celular.

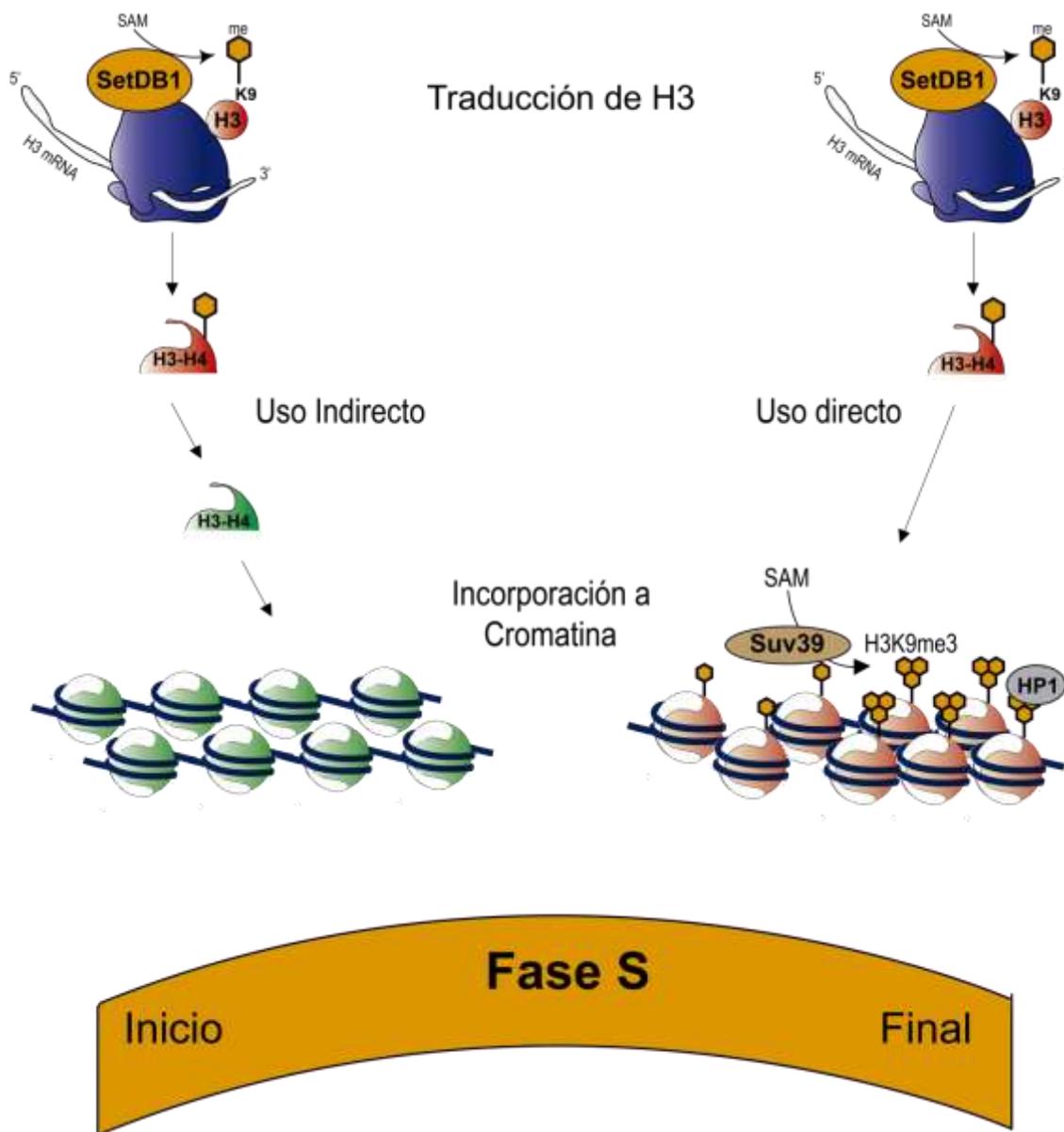


Figura 8. Modelo explicativo de la doble funcionalidad de H3K9me1. Al inicio de fase S, SetDB1 estaría monometilando la lisina 9 de H3 de manera cotraduccional. H3 pasaría a la cascada de maduración, eventualmente perdiendo la marca de monometilación antes de incorporarse a la cromatina. Al final de fase S, H3K9me1 tendría un uso directo desde su aparición cotraduccional, manteniendo la marca antes de incorporarse a la cromatina, para conformar heterocromatina.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se logró obtener células sincronizadas en distintos puntos del ciclo celular.
2. SetDB1 se acumula en los polisomas en un punto intermedio entre el medio y el final de la fase S del ciclo celular.
3. H3 se acumula al inicio y al final de S.
4. H3K9me1 tendría una mayor presencia en los polisomas al final de G1, en una etapa intermedia entre el medio y el final de S, y en G2/M.

CONCLUSIÓN

Los niveles de SetDB1 en los ribosomas se correlacionan con el avance de la fase S el ciclo celular, particularmente aumentando desde la mitad hasta el final de dicha fase. A su vez, H3K9me1 también aumenta, manteniendo altos niveles en los ribosomas desde la etapa media/final de S hasta G2/M.

BIBLIOGRAFÍA

- Alabert, C., Bukowski-Wills, J.-C., Lee, S.-B., Kustatscher, G., Nakamura, K., de Lima Alves, F., y col. 2014. Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components. *Nat. Cell Biol.* **16**: 281–293.
- Alvarez, F., Muñoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G. & Loyola, A. 2011. Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.* **286**: 17714–17721.
- Andrews, A.J. & Luger, K. 2011. Nucleosome Structure(s) and Stability: Variations on a Theme. *Annu. Rev. Biophys.* **40**: 99–117.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., y col. 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129**: 823–837.
- Bilodeau, S., Kagey, M.H., Frampton, G.M., Rahl, P.B. & Young, R.A. 2009. SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev.* **23**: 2484–2489.
- Bjursell, G. & Reichard, P. 1973. Effects of Thymidine on Deoxyribonucleoside Pools and Deoxyribonucleic Acid Synthesis Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* **218**: 3904–3909.
- Campos, E.I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W.-H.W., y col. 2010. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 1343–1351.

- Ceol, C.J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. a, Battisti, V., y col. 2011. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* **471**: 513–517.
- Clough, E., Moon, W., Wang, S., Smith, K. & Hazelrigg, T. 2007. Histone methylation is required for oogenesis in *Drosophila*. *Development* **134**: 157–165.
- Cowell, I.G., Aucott, R., Mahadevaiah, S.K., Burgoyne, P.S., Huskisson, N., Bongiorno, S., y col. 2002. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* **111**: 22–36.
- Daly, M.M., Mirsky, A.E. & Ris, H. 1951. The amino acid composition and some properties of histones. *J Gen Physiol.* **34**: 439–450.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C. & Cheng, X. 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* **6**: 227–227.10.
- Dodge, J.E., Kang, Y., Beppu, H. & Lei, H. 2004. Histone H3-K9 Methyltransferase ESET Is Essential for Early Development Histone H3-K9 Methyltransferase ESET Is Essential for Early Development. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 2478–2486.
- Fei, Q., Shang, K., Zhang, J., Chuai, S., Kong, D., Zhou, T., y col. 2015. Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53. *Nat. Commun.* **6**: 1–12.
- Gunjan, A. & Verreault, A. 2003. A Rad53 Kinase-Dependent Surveillance Mechanism that Regulates Histone Protein Levels in *S. cerevisiae*. *Cell* **115**: 537–549.
- Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.-P. & Almouzni, G. 2014. Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* **83**: 487–517.
- Hahn, A.T., Jones, J.T. & Meyer, T. 2009. Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell Cycle* **8**: 1044–1052.

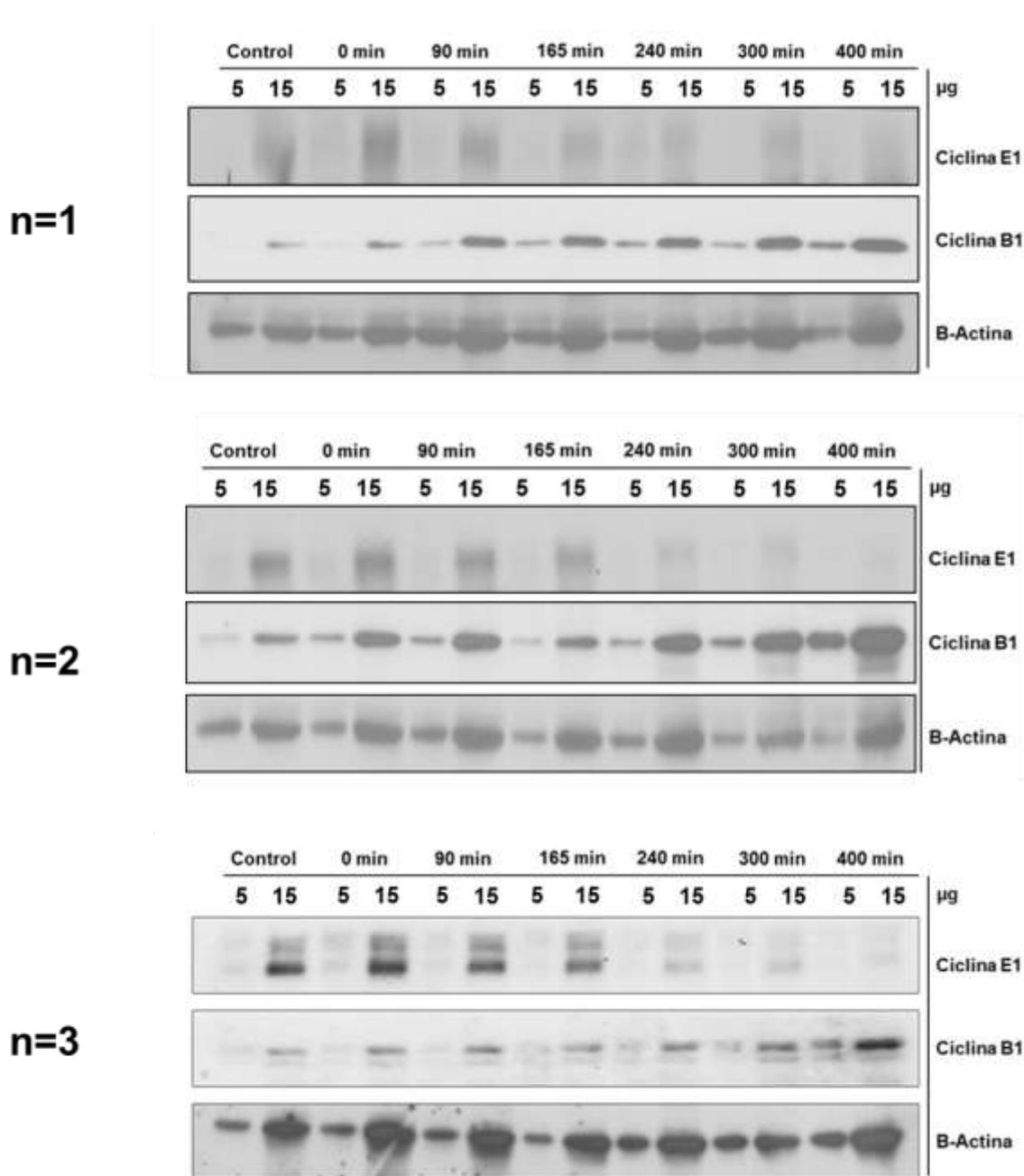
- Harte, P.J., Wu, W., Carrasquillo, M.M. & Matera, A.G. 1999. Assignment of a novel bifurcated SET domain gene, SETDB1, to human chromosome band 1q21 by in situ hybridization and radiation hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**: 83–86.
- Ito, S., Fujiyama-Nakamura, S., Kimura, S., Lim, J., Kamoshida, Y., Shiozaki-Sato, Y., y col. 2012. Epigenetic Silencing of Core Histone Genes by HERS in *Drosophila*. *Mol. Cell* **45**: 494–504.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**: 693–705.
- Lennartsson, A. & Ekwall, K. 2009. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**: 863–868.
- Liu, S., Brind'Amour, J., Karimi, M.M., Shirane, K., Bogutz, A., Lefebvre, L., y col. 2014. Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes Dev.* **28**: 2041–2055.
- Liu, X., Yang, J., Zhang, S.S., Liu, X. & Liu, D.X. 2010. Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide. *BMC Cancer* **10**: 684–684.8.
- Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A. & Almouzni, G. 2006. PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol. Cell* **24**: 309–316.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., y col. 2009. The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep.* **10**: 769–775.
- Luger, K., Mäder, a W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260.

- Marzluff, W.F. & Duronio, R.J. 2002. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 692–699.
- Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. a, Miyachi, H., Kimura, H., y col. 2010. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* **464**: 927–931.
- Mirsky, A.E. & Pollister, A.W. 1946. Chromosin, a desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. *J Gen Physiol.* **30**: 117–148.
- Pek, J.W., Anand, a. & Kai, T. 2012. Tudor domain proteins in development. *Development* **139**: 2255–2266.
- Ponting, C.P. 1997. Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 51–52.
- Qiu, Z., Norflus, F., Singh, B., Swindell, M.K., Buzescu, R., Bejarano, M., y col. 2006. Sp1 is up-regulated in cellular and transgenic models of huntington disease, and its reduction is neuroprotective. *J. Biol. Chem.* **281**: 16672–16680.
- Quivy, J.-P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y. & Almouzni, G. 2004. A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J.* **23**: 3516–3526.
- Ranning, W., Lindmo, T., Pettersen, E.O. & Seglen, P.O. 1981. The Role of Protein Accumulation in the Cell Cycle Control of Human NHIK 3025 Cells. **418**: 411–418.
- Rivera, C., Gurard-Levin, Z. a., Almouzni, G. & Loyola, A. 2014. Histone lysine methylation and chromatin replication. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**: 1433–1439.

- Rivera, C., Saavedra, F., Alvarez, F., Díaz-Celis, C., Ugalde, V., Li, J., y col. 2015. Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. *Nucleic Acids Res.* **43**: 9097–9106. y col
- Ryu, H., Lee, J., Hagerty, S.W., Soh, B.Y., McAlpin, S.E., Cormier, K. A, y col. 2006. ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 19176–19181.
- Schneider-poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., y col. 2010. Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 209–217.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G. & Rauscher, F.J. 2002. SETDB1: A novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* **16**: 919–932.
- Stewart, M.D., Li, J. & Wong, J. 2005. Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation , Transcription Repression , and Heterochromatin Protein 1 Recruitment Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation , Transcription Repression , and Heterochromatin Protein 1 Recruitment. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 2525–2538.
- Sun, L. & Fang, J. 2016. E3-Independent Constitutive Monoubiquitination Complements Histone Methyltransferase Activity of SETDB1. *Mol. Cell* 1–9.
- Truman, A.W., Kitazono, A.A., Fitz Gerald, J.N. & Kron, S.J. 2001. Cell Cycle: Regulation by Cyclins. *eLS* 1–8.
- Verbin, R.S. & Farber, E. 1967. Effect of cycloheximide on the cell cycle of the crypts of the small intestine of the rat. *J. Cell Biol.* **35**: 649–658.

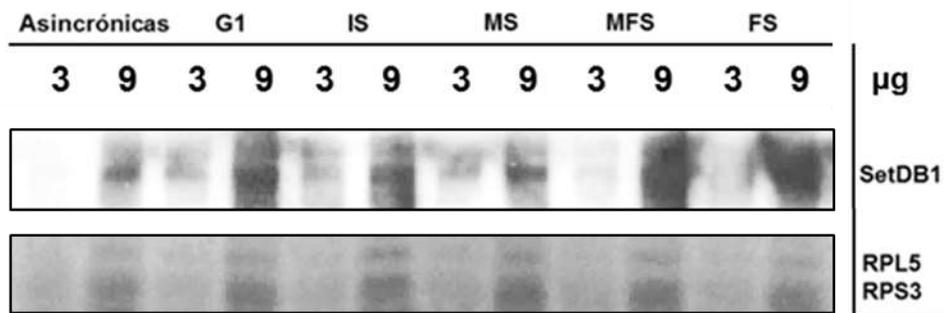
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., y col. 2002. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1977–2000.
- Xeros, N. 1962. Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature* **194**: 682–683.
- Yang, L., Xia, L., Wu, D.Y., Wang, H., Chansky, H. a, Schubach, W.H., y col. 2002. Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* **21**: 148–152.
- Yuan, P., Han, J., Guo, J., Orlov, Y.L., Huss, M., Loh, Y.H., y col. 2009. Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes Dev.* **23**: 2507–2520.

ANEXOS

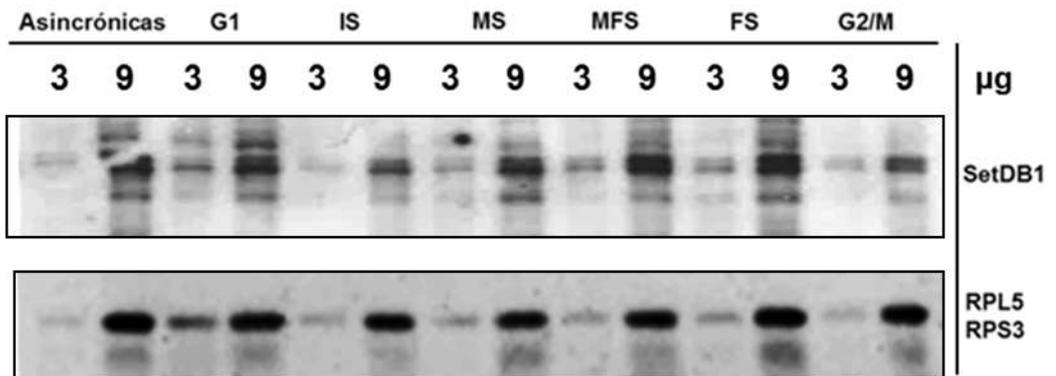
**Anexo 1: Determinación de los niveles de ciclinas en células sincronizadas mediante Western Blot.**

Se muestran los análisis mediante Western Blot de las 3 réplicas biológicas. Para cada muestra, se cargaron 5 y 15 µg de proteínas provenientes de extractos totales en geles al 8% (p/V) de acrilamida. Los anticuerpos anti Ciclina E1, anti Ciclina B1 y anti β-Actina se usaron a una dilución 1:1000.

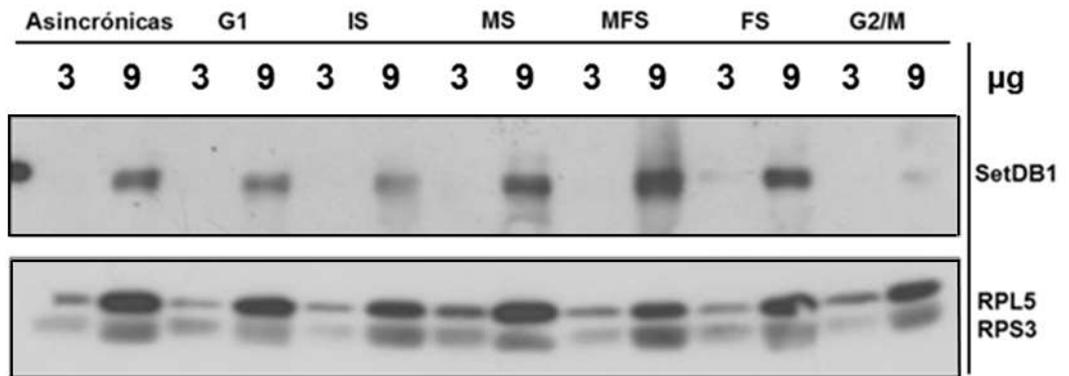
n=1



n=2

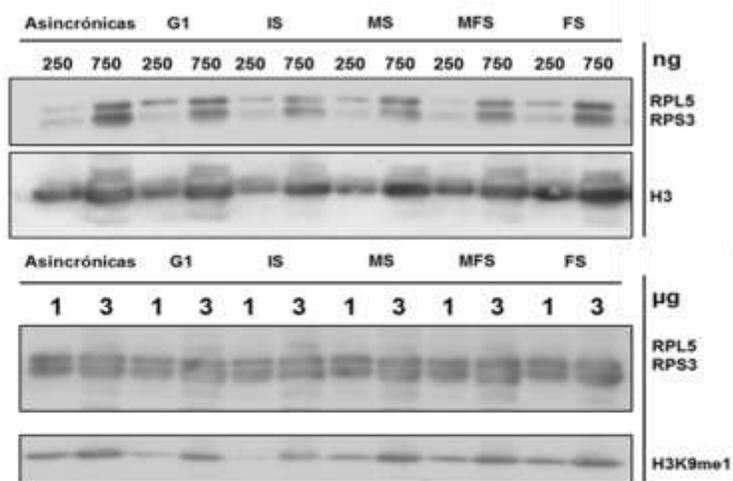


n=3

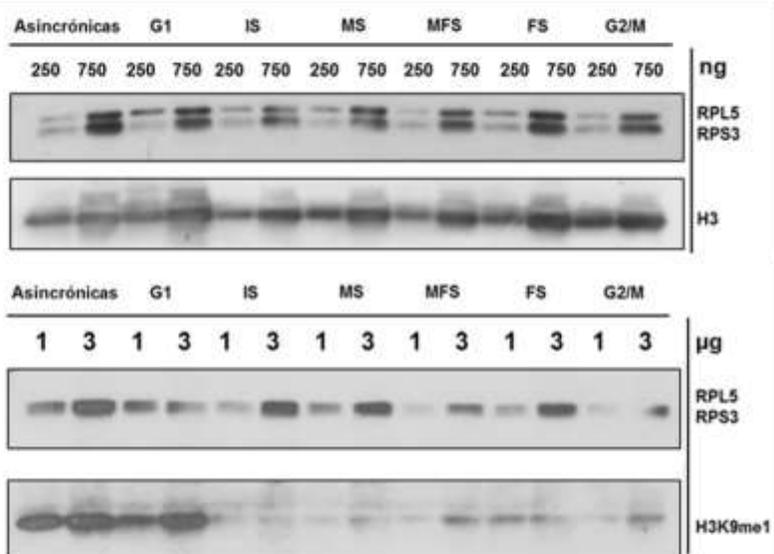


Anexo 2: Análisis mediante Western Blot de los niveles de SetDB1 presentes en polisomas. Se utilizaron geles al 8% (p/V) de acrilamida y se cargaron 3 y 9 µg de RNA para cada muestra. El anticuerpo anti SetDB1 se utilizó a una dilución 1:1000 mientras que los anticuerpos anti RPL5 y anti RPS3 se utilizaron en una mezcla de ambos a una dilución 1:64000 y 1:160000, respectivamente.

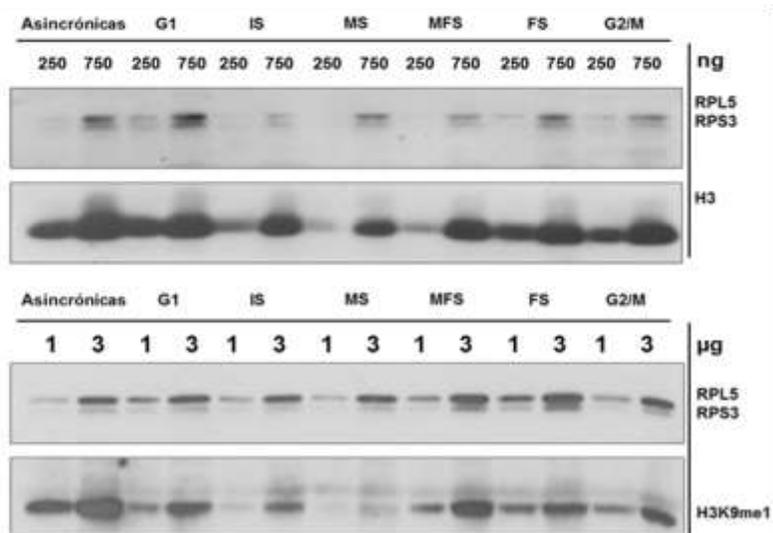
n=1



n=2



n=3



Anexo 3: Análisis mediante Western Blot de los niveles de H3K9me1 presentes en polisomas. Se utilizaron geles al 12,5% (p/V) de acrilamida y se cargaron 1 y 3 µg de RNA para cada muestra. El anticuerpo anti H3K9me1 se utilizó a una dilución 1:1000 mientras que los anticuerpos anti RPL5 y anti RPS3 se utilizaron en una mezcla de ambos a una dilución 1:16000 y 1:40000, respectivamente