



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico Molecular,
Hematología y Medicina Transfusional

*“Determinación del código de histonas de los sitios de crossover en el
genoma del ratón”*

KATHERINE ANDREA URBINA ESPINOZA



Firma

Director de tesis: MARCIA MANTEROLA, PhD

Programa de Genética Humana



Firma

1 de Agosto de 2023



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico Molecular,
Hematología y Medicina Transfusional

*“Determinación del código de histonas de los sitios de crossover en el
genoma del ratón”*

KATHERINE ANDREA URBINA ESPINOZA



Firma

Director de tesis: MARCIA MANTEROLA, PhD

Programa de Genética Humana



Firma

1 de Agosto de 2023

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

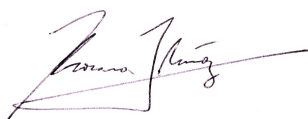
La **Srta. Katherine Andrea Urbina Espinoza**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Determinación del código de histonas de los sitios de crossover en el genoma del ratón”**, dirigida por la **Profa. Dra. Marcia Manterola** académica del Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por la: **Profa. Leonor Bustamante** académica del Departamento de Psiquiatría y Salud Mental Norte, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la **Profa. Gladys Tapia**, académica del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Correctora 1 Leonor Bustamante	6.88	25%
Correctora 2 Gladys Tapia	6.97	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	6.60	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.86	

En consecuencia la estudiante **Katherine Andrea Urbina Espinoza** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Profa. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



HERNAN RODRIGO
TORRES RIVERA
15.932.579-2
19/10/2023 - 13:04
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
CV: 65315399b51ef3192a687be3

Prof. Hernán Torres.
PEC curso
Trabajo de Investigación

A Rocío Urbina

A Marcela Espinoza

A Rodolfo Urbina

A Belén Guerrero

A Isabel Carrasco

A Elba Abarca

A Manuel Espinoza

A Daniella Ruiz

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de esta tesis. Su apoyo y orientación fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco de manera especial a:

Mi tutora Dra. Marcia Manterola, por su orientación, experiencia, dedicación y paciencia a lo largo de todo este proceso; gracias por creer en mí cuando yo misma dudaba de mis capacidades y conocimientos. Sus palabras lograron empujarme a esforzarme más y finalmente lograr cosas que jamás creí poder hacer.

A Theo Marchant por el apoyo en el laboratorio cuando lo necesité.

A Jorge Gómez por ser una constante en el laboratorio desde antes de la realización de este proyecto, por su amistad y paciencia.

A Daniela Ruiz por mostrarme el camino de las ciencias, por ser quien primero creyó en mí y ser quien vio lo que podía lograr.

A Belén Guerrero, gracias por ser mi amiga y estar siempre junto a mí, por las risas, el apoyo y la felicidad que me haces sentir.

A mis amigos, por ser quienes me dieron el empuje para seguir adelante, gracias por ser mi lugar seguro.

A mis papás y a mi hermana, por ser el cariño de mi vida.

Y al proyecto Fondecyt 11181329

INDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Hipótesis y objetivos.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Resultados.....	16
Discusión.....	27
Conclusiones.....	32
Referencias bibliográficas.....	33
Anexos.....	36

RESUMEN

Los *crossovers* meióticos (CO) son esenciales para la reproducción y la evolución. Garantizan la correcta segregación cromosómica en los gametos y promueven la diversidad genética. La formación defectuosa de CO conduce a la aneuploidía y la infertilidad; de ahí que conocer cómo se regulan los COs sea clave para entender la salud reproductiva. Nuestro grupo demostró que el lector epigenético BRDT, que lee lisinas acetiladas de H3 y H4, determina la formación y correcta localización de los CO durante la meiosis en el genoma del ratón, sugiriendo que mecanismos epigenéticos estarían involucrados en la formación y localización de los CO de mamíferos. Utilizando bases de datos de experimentos de ChIP Seq de histonas en espermatocitos de ratón, nuestro grupo encontró que diversas modificaciones de histonas están presentes diferencialmente en los CO *hotspots* en el genoma de células en meiosis. Sin embargo, falta la confirmación experimental de estos resultados. Para resolver ello, se realizó ChIP y Tiled qPCR en espermatocitos de ratones C57Bl6. Se analizaron 3 regiones genómicas: i) CO *hotspot* del cromosoma X ii) una región de formación de DSBs pero sin producción de CO, iii) una región sin DSBs ni formación de COs. Los análisis de datos se realizaron utilizando $\Delta\Delta Ct$ y los análisis estadísticos se realizaron mediante t-student. Observamos que existe un patrón de localización, enriquecimiento e intensidad de peaks específico de las modificaciones estudiadas en las diferentes regiones genómicas estudiadas. En este sentido encontramos diferentes ocupaciones de H3K9ac y H3K4me3 en las regiones de DSB, no-CO y CO, así como el enriquecimiento de nucleosomas que exhibían estas marcas de histona. H3K4me3 estaba presente como pocos peaks en el DSB, peaks altos en la región sin CO y en niveles muy bajos en la región CO. Por el contrario, esta región estaba totalmente ocupada en nucleosomas con H3K9ac en niveles de enriquecimiento bajos en comparación con las otras regiones genómicas. Así pues, en la región CO se marca un patrón particular de modificación activa de histonas que es diferente al de otros sitios genómicos.

INTRODUCCIÓN

La reproducción en organismos eucariontes depende de la producción de gametos haploides desde células somáticas y de la recombinación génica para generar variabilidad en la descendencia (1), para ello los cromosomas homólogos intercambian material genético entre ellos en un evento que se conoce como entrecruzamiento o *crossing over* durante paquiteno (2). El éxito en la formación de COs es crucial para que los cromosomas homólogos de origen segreguen correctamente (4) y, al intercambiar grandes segmentos de cromatina, crean nuevas combinaciones de alelos que aumentan la diversidad genética entre los individuos (2). Por ende, los COs son claves para formar gametos haploides (3), preservar la estabilidad del genoma en las células germinales y, por ende, producir gametos competentes (1). La ocurrencia de cualquier alteración en alguna de las etapas de formación de CO resulta en la generación de mutaciones genómicas, alteraciones en la segregación cromosómica, subfertilidad o infertilidad en los individuos portadores de las mutaciones genómicas y/o defectos en los descendientes (5).

El CO ocurre durante profase I, específicamente durante paquiteno y corresponde a un proceso de reparación de DNA altamente conservado en eucariontes que asocia físicamente a los cromosomas homólogos, permitiendo su correcto alineamiento y segregación durante Meiosis I (6). Los COs ocurren en respuesta a la generación de rupturas de doble hebra del DNA (DSB, *double strand breaks*) en todo el genoma (2), rupturas que son catalizadas por la enzima Spo11 (7). Al inicio de la Profase I, en el Leptoteno, se producen entre 200 a 300 DSB por núcleo, y sólo cerca del 10% termina formando un CO (8) entre Paquiteno medio y tardío. El resto de los DSB se reparan vía no CO(2)

Los productos de la reparación de DSB vía CO dan como resultado el intercambio de alelos en grandes segmentos cromosómicos (3). Por el contrario, los productos de la reparación de

DSB vía no CO implican sólo una transferencia unidireccional de información genética (o conversión de genes) en intervalos cortos y, por lo tanto, solo tienen un efecto local limitado en la diversidad genética. (Figura 1)

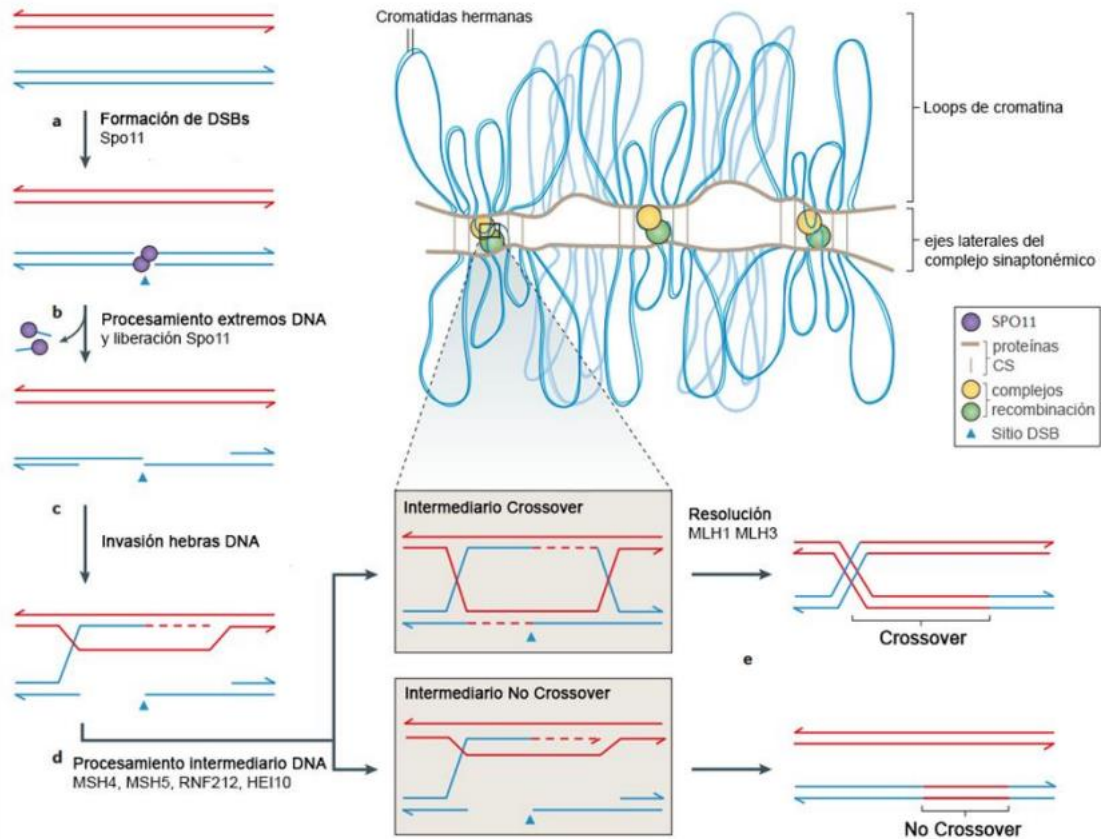


Figura 1: Mecanismos de recombinación meiótica, reparación de DSB vía CO y vía no CO durante la Profase I (Modificada de Baudat et al. 2013).

Estudios han demostrado que existe una alta regulación tanto en la localización como en la formación de CO y que estos ocurren en regiones específicas del genoma denominados *crossover hotspots* (9). Distintos mecanismos regulan los COs tales como la garantía de que ocurra un CO entre los homólogos, de que ocurran en sitios específicos del genoma

(interferencia de CO) y la homeostasis de CO. La formación de entre uno a dos CO siempre debe ocurrir en cada par de cromosomas homólogos para mantener a los homólogos juntos durante la profase I y metafase I y asegurar la correcta posición de los cromosomas en la placa metafásica con su posterior segregación durante la Anafase I; este mecanismo es conocido como garantía de CO (2). Por otro lado, si un par de cromosomas homólogos experimenta múltiples CO, estos no se distribuyen al azar, ya que un CO en una localización determinada inhibe la ocurrencia de otro CO adyacente, fenómeno conocido como la interferencia del CO (10). Juntas, la garantía de CO y la interferencia de CO dictan los límites inferior y superior para los números de CO en un par de cromosomas homólogos (11).

Estos fenómenos son probablemente los mecanismos mejor conocidos en relación con la regulación del CO. Sin embargo, los procesos que determinan la localización y la formación de un CO siguen siendo desconocidos.

Rol de la epigenética en la formación y localización de los CO.

Las modificaciones epigenéticas, como la acetilación y metilación de histonas, influyen en la apertura y accesibilidad de la cromatina. Estos cambios pueden marcar regiones específicas del genoma; estas modificaciones de la cromatina son generadas y eliminadas por enzimas *writers* y *erasers* específicas, y pueden influir en la función de la cromatina alterando directamente su estructura y reclutando proteínas *readers* que reconocen estas modificaciones (12)(13). En los últimos años, evidencia en plantas, levaduras y gusanos ha permitido sugerir fuertemente que la organización epigenética juega un rol clave en definir las características genómicas que especifican los CO *hotspots*, en levaduras y *A. thaliana*, los CO *hotspots* se caracterizan por ser ricos en histonas metiladas y acetiladas y bajos en metilación del DNA (15, 16).

Los CO son menos frecuentes en regiones densamente metiladas en el DNA que están

cercanas a los centrómeros en *A. thaliana* y una disminución en la metilación del DNA produce un cambio en la localización de los crossovers, al provocar un aumento en los *crossovers* que ocurren en regiones cercanas a centrómeros y disminuciones en los *crossovers* que ocurren en las regiones pericentroméricas de los cromosomas (17). Además, en *S. pombe* se ha visto que, mediante el estudio del CO *hotspot* *ade6-M26*, las histonas presentes en sitios de CO *hotspots* se encuentran hiper acetiladas y su deficiencia se encuentra asociada a un CO alterado tanto en su formación como en su localización (13).

En mamíferos se desconocen los mecanismos que determinan la localización de un CO en un lugar específico del genoma y no en otro, sin embargo, estudios muestran que mecanismos epigenéticos podrían estar involucrados de una manera similar a levaduras, plantas y gusanos. Recientemente se demostró que el lector epigenético BRDT, que lee y se une a histonas acetiladas, es un factor clave para la correcta formación y localización de los CO en el ratón (21, 22). Junto con ello se ha visto que ratones *knockout* para el lector epigenético, CFP1 (CXXC Finger Protein 1), proteína miembro del complejo metiltransferasa SETD1 bloquea la acumulación de H3K4me3 en la cromatina durante la ovogénesis y afecta significativamente la formación del CO durante paquiteno (23). Estos hallazgos que involucran a lectores epigenéticos sugieren firmemente que patrones epigenéticos en la cromatina están involucrados en la formación y localización de CO en el genoma, lo que sugiere que en la meiosis de mamíferos podría existir una configuración epigenética específica involucrada en la diferenciación de las vías de CO y no CO y que, por ende, promueva o prevenga el reclutamiento de los factores de recombinación en los puntos de CO en la cromatina.

Utilizando la base de datos de los experimentos de ChIP-seq de histonas en espermatoцитos de ratón realizados por Lam et al, nuestro grupo recientemente encontró mediante análisis

bioinformático que diversas modificaciones de histonas están presentes diferencialmente en los CO *hotspots* en el genoma de células en meiosis. Esto mediante la selección y posterior análisis de 3 regiones específicas del genoma del ratón, una región como modelo de CO, otra región como modelo de en donde ocurre DSB pero no CO y una región como modelo de sitio en donde no ocurre ni DSB ni CO en el DNA. Como modelo de estudio de los CO nuestro grupo seleccionó una región de 5 Kb en la posición 169,988 a 169,991 Kb de la región pseudoautosómica del cromosoma X (PAR, Pseudoautosomal region). Esta región tiene una tasa de recombinación que es 100% más alta comparado con los *hotspots* de autosomas (24), además que posee altas tasas de DSB y una densidad de CO 20 veces mayor a otros *hotspots*; como modelo de región de sólo DSBs se seleccionó una región de 5 Kb en la posición 31,505 – 31,510 Kb del cromosoma 17 puesto que se ha demostrado en Lam et al mediante ChIP-seq que esta región del genoma corresponde a un sitio donde se produce DSB pero que su reparación es vía no CO (26) y como modelo de una región sin ruptura del DNA se seleccionó una región de 5Kb en la posición 166,424– 166,428 Kb del cromosoma X ya que se ha visto en los datos entregados por Smagulova et al mediante ChIP-seq que esta región no presenta sitios de inicio de recombinación, ni características genómicas de los DSBs ni ocurrencia de CO (25); la selección de estas regiones fue con el fin de evidenciar la existencia de un patrón diferencial de modificaciones epigenéticas en sitios CO respecto a sitios no CO. En el caso de las marcas de histonas observamos que, en algunos casos, modificaciones como metilaciones y acetilaciones de histonas presentan cambios temporales en el enriquecimiento durante la Profase I.

Para resolver si existe un patrón epigenético específico en los sitios de CO se realizó Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y posteriormente Tiled qPCR en espermatoцитos de ratones C57Bl6, de las marcas de histona H3K4me3 y H3K9ac analizando 3 regiones genómicas: i) CO *hotspot* del cromosoma X ii) una región de formación de DSBs pero sin

producción de CO, iii) una región sin DSBs ni formación de COs. Los análisis de datos se realizaron utilizando $\Delta\Delta\text{Ct}$ y los análisis estadísticos se realizaron mediante t-student-

Observamos que existe un patrón de localización, enriquecimiento e intensidad de peaks específico de las modificaciones H3K4me3 y H3K9ac en las diferentes regiones genómicas estudiadas. En este sentido encontramos diferentes ocupaciones de H3K9ac y H3K4me3 en las regiones modelo de sólo DSB, región sin ruptura del DNA y región modelo de CO, así como el enriquecimiento de nucleosomas que exhibían estas marcas de histona. H3K4me3 estaba presente como pocos peaks en el DSB, peaks altos en la región sin CO y en niveles muy bajos en la región CO. Por el contrario, esta región estaba totalmente ocupada en nucleosomas con H3K9ac en niveles de enriquecimiento bajos en comparación con las otras regiones genómicas. Así pues, en la región CO se marca un patrón particular de modificación activa de histonas que es diferente al de otros sitios genómicos.

HIPÓTESIS

Los sitios de *crossover* están caracterizados por un enriquecimiento de modificaciones de histonas específicas en el genoma de las células germinales del ratón.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón epigenético de las modificaciones de histonas H3K4me3 y H3K9ac en los sitios de CO en el genoma de células germinales masculinas de ratón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el patrón epigenético de la histona H3K4me3 en el sitio de CO del cromosoma X durante la Profase I en espermatocitos de ratón.
2. Determinar el patrón epigenético de la histona H3K9ac en el sitio de CO del cromosoma X durante la Profase I en espermatocitos de ratón.
3. Comparar la configuración de las modificaciones de histonas H3K4me3 y H3K9ac entre el sitio de CO del cromosoma X con una región del genoma en donde ocurre DSB con bajas probabilidades de formación de CO.
4. Comparar la configuración de las modificaciones de histonas H3K4me3 y H3K9ac entre el sitio de CO del cromosoma X con una región del genoma que no ocurre DSB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron los testículos de 3 ratones B6JTyr;B6N de 3 meses de edad. Toda la manipulación de los ratones fue realizada por la Dra. Marcia Manterola, directora de tesis de la presente propuesta. El Protocolo asociado a este Proyecto de Investigación tiene asignado el código CBA-1050 por el Comité de Bioética de Animales y ha sido aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (ver Anexos), el cual es financiado por Fondecyt de Iniciación Nro. 11181329.

Diseño experimental

Para determinar el patrón epigenético de los sitios de COs o CO *hotspots*, nos interesamos en establecer mediante CHIP qPCR la presencia, enriquecimiento y extensión en pares de bases de las modificaciones de histonas H3K4me3 y H3K9ac (ligadas a cromatina descondensada o activa, y en la formación de COs en levaduras y gusanos) en 3 regiones genómicas como modelos de i) *Crossover hotspot*, ii) formación de sólo DSBs y reparación vía conversión génica (no CO ni DSB)

Sobre esa base, como modelo de CO *hotspot* se seleccionó una región de 5 Kb en la posición 169,988 a 169,991 Kb de la región pseudoautosómica del cromosoma X (PAR, Pseudoautosomal region) la cual tiene una tasa de recombinación que es 100% más alta comparado con los *hotspots* de autosomas (24) y una densidad de CO 20 veces mayor a otros *hotspots* (25).

Como modelo de región de sólo DSB se seleccionó una región de 5 Kb en la posición 31,505 – 31,510 Kb del cromosoma 17, la cual se ha caracterizado como un segmento en donde se produce DSB pero su reparación es vía no CO o conversión génica. (26).

Como modelo de región sin ruptura del DNA se seleccionó una región de 5Kb en la posición

166,424– 166,428 Kb del cromosoma X ya que se ha visto en los datos entregados por Smagulova et al mediante CHIP-seq que esta región no presenta sitios de inicio de recombinación, ni características genómicas de los DSBs ni ocurrencia de CO (25).

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La Inmunoprecipitación de cromatina se realizó utilizando el Kit True MicroChIP (Diagenode C01010130) siguiendo el protocolo entregado por el kit, la muestra utilizada fue de 75 mg de testículos de ratón B6JTyr;B6N.

- *Crosslinking* DNA-proteínas:

Se utilizó formaldehído al 37% para el *crosslinking*; el tiempo de incubación de la muestra con el formaldehído fue de 15 minutos en rotor a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con Glicina. La concentración final de la muestra fue de 0,125 M

- Lisis y *shearing* celular:

La lisis celular se realizó utilizando los buffers de lisis del kit True MicroChIP y la fragmentación de la cromatina se realizó mediante sonicación.

- Inmunoprecipitación magnética

La inmunoprecipitación se realizó utilizando los anticuerpos específicos Rabbit anti-H3K4me3 (Diagenode C15410003), Rabbit anti-H3K9ac (Abcam ab4441) para obtener el DNA enriquecido con estas modificaciones de histonas; Rabbit anti-H3 (Abcam ab1791) como control positivo; Rabbit anti-IgG (Santa Cruz #011-000-003) que se utilizó como input.

- *Decrosslinking*:

Para el *Decrosslinking* se utilizó los buffers de elusión pertenecientes al kit, las incubaciones se realizaron primero por 30 minutos en rotor a temperatura ambiente y luego por 4 horas a 65°C.

Purificación de DNA

En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se añadieron 5 volúmenes de tampón CHIP DNA Binding a cada volumen de muestra (5:1). Se mezcló brevemente para después transferir la mezcla a una columna de centrifugación en un tubo colector y centrifugar a $\geq 10.000 \times g$ durante 30 segundos. Luego se desechó el eluido, se añadieron 200 μL de DNA wash buffer a la columna y se centrifugó a $\geq 10.000 \times g$ durante 30 segundos. Se debió repetir el paso de lavado para después añadir 6-100 μl de DNA elution buffer directamente a la matriz de la columna y transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y centrifugar a $\geq 10.000 \times g$ durante 30 segundos para eluir el DNA (29).

Diseño de primers

Para el mapeo de las modificaciones de histonas de las regiones en estudio de los cromosomas X y 17, se realizó Tiled qPCR, diseñando múltiples primers que se sobrelapan entre sí cubriendo completamente las regiones genómicas a amplificar de acuerdo a lo descrito por Manterola et al, 2018 (21). El diseño de los primers se realizó utilizando el software Primer3 (v. 0.4.0) en donde se transcribieron distintas partes de la secuencia de interés en formato FASTA, obteniendo así distintos pares de primers para amplificar esa región. La selección de los primers a utilizar se realizó mediante la comparación de los parámetros relacionados con la calidad en el diseño de los primers, como T_m (59-60°C), contenido de GC (45-55%), tamaño del producto (100-200 pb) y tamaño de los primers (20-25pb). Los primers diseñados comprenden la región modelo de no-CO del cromosoma X que va desde 166,424,993 hasta 166,429,857pb, la región modelo de sólo DSB del Cromosoma 17 que va desde 31,505,117 hasta 31,509,934pb y la región modelo de CO *hotspot* del Cromosoma X que va desde 169,988,619 pb hasta 169,991,801 pb.

Se obtuvieron primers específicos diseñados para obtener amplicones de ~200 pb superpuestos entre sí; 30 pares de primers para la región no-CO del Cromosoma X, 18 pares

de primers para la región de sólo DSB del Cromosoma 17 y 16 pares de primers para la región PAR modelo de CO *hotspot*. Para la obtención de la secuencia de las regiones en estudio se utilizó Ensemble, repositorio de genomas de referencia de vertebrados; el genoma de referencia utilizado corresponde al genoma GRCm38/mm10.

Tiled qPCR

Todas las reacciones de Tiled qPCR fueron realizadas utilizando el equipo Eco-Real Time PCR System (Illumina) usando EvaGreen Dye (Solis Byodine) sin ROX. La concentración de templado de DNA utilizado fue de 10 pg/uL. Los ciclos de reacción fueron por 10 minutos a 95°C, seguido por 45 ciclos de 95°C; 15 segundos, 59°C; 60 segundos y 72°C; 15 segundos. Además de las regiones de interés, se utilizó como input DNA genómico y como control negativo agua Milli-q. Todas las reacciones se realizaron en triplicado.

El enriquecimiento de las modificaciones de histona respecto a su posición relativa en los cromosomas se calculó con el método del delta delta Ct (R) del DNA inmunoprecipitado y amplificado. $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$; $\Delta Ct = Ct_{H3} \text{ o } Ct_{H3 \text{ modificada}} - Ct_{DNA \text{ genómico}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{H3 \text{ modificada}} - \Delta Ct_{H3}$.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de t-student con un post-test de Mann-Whitney o Wilcoxon entre los resultados de cada animal de un mismo grupo de estudio para determinar diferencias significativas entre los ratones analizados.

RESULTADOS

Las regiones de CO, DSB y no ruptura de DNA de los cromosomas X y 17 presentan diferencias en el enriquecimiento de H3K4me3 y H3K9ac

Para determinar si las modificaciones de la histona H3 presentan una diferencia en los niveles de enriquecimiento entre las regiones de CO, DSB y no CO/DSB realizamos un mapeo de la presencia o ausencia de estas modificaciones en las regiones seleccionadas de los cromosomas X y 17 y cuantificamos cuántos de estos puntos analizados tenían H3K4me3 y H3K9ac.

Al analizar la presencia de H3K4me3, encontramos que en la región del CO *hotspot* del cromosoma X, el 37.5% del DNA estaba asociado a H3K4me3 (Figura 2). Por otro lado, el enriquecimiento de H3K4me3 en todo el sitio de DSBs del cromosoma 17 analizado fue de 27.8%, representando 0.74 veces menos histona modificada respecto de la región de CO del cromosoma X. Al contrario, en toda la región de no-CO/no-DSB del cromosoma X analizada, encontramos que el 56.6% del DNA estaba asociado a esta histona modificada, lo cual implica una diferencia significativa de 1.5 veces más H3K4me3 que la región de CO (Figura 2). Por su parte, la cantidad de H3K4me3 en la región de no-CO/no-DSB respecto de la región de DSB fue significativamente mayor, con un orden de magnitud de 2 veces más H3K4me3 ($p < 0.01$) (Figura 2). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las regiones de CO y los otros dos sitios genómicos analizados.

Por otro lado, tras analizar el total de sitios con H3K9ac en las tres regiones genómicas analizadas, encontramos que el sitio de CO presentó un 62.5% de DNA asociado a esta modificación (Figura 2). Este enriquecimiento fue 1.7 veces más que el contenido de H3K4me3 en la misma región. En el sitio de DSBs del cromosoma 17 encontramos un 77.8%

de DNA asociado a H3K9ac y un 73.3% en la región de no-CO/no-DSB, implicando un enriquecimiento 1.2 veces más que en la región de CO (Figura 2). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las tres regiones genómicas analizadas.

En conjunto, estos resultados muestran que hay una presencia diferencial de modificaciones de histonas asociadas a cromatina activa, como H3K4me3 y H3K9ac, dependiendo de la funcionalidad y actividad metabólica de las regiones genómicas durante la meiosis. Indican también que hay un enriquecimiento diferente de modificaciones de histonas en la región de CO en comparación con los otros sitios analizados.

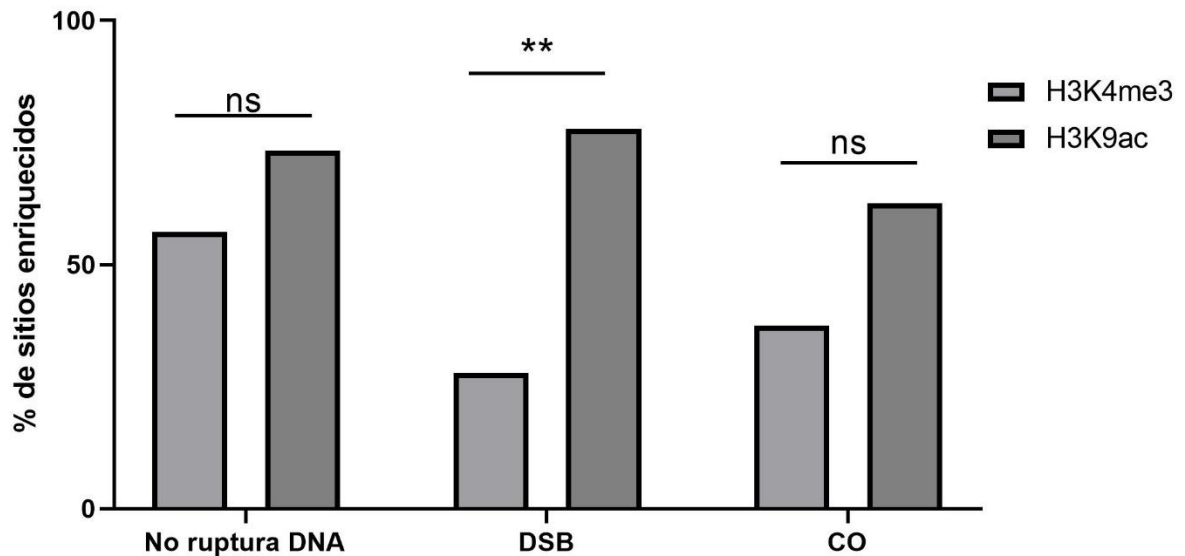


Figura 2: Porcentaje de sitios con modificaciones de la histona 3 en la región modelo de CO, de DSB y sin ruptura del DNA. Cuantificación del número de puntos amplificados que presentan las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac en las regiones del genoma de ratón modelo de no ruptura del DNA ($p=0.1796$), modelo de DSB ($p= 0.0031$) y modelo de CO ($p=0.1639$); cada barra representa el porcentaje de puntos con la modificación respecto a todos los puntos analizados mediante Tiled qPCR en cada región. $n = 30$ puntos analizados para el cromosoma X no-CO/no-DSB, $n = 18$ puntos analizados para el cromosoma 17 región sin DSB, $n = 16$ puntos analizados para el cromosoma X región modelo de CO *hotspot*.

Las regiones de CO, DSB y no-CO/no-DSB poseen diferencias en el enriquecimiento total de las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac.

Luego de determinar la cantidad de sitios de DNA que estaban asociados a H3K4me3 y H3K9ac en las regiones genómicas analizadas, analizamos a continuación modificaciones de histonas en los sitios de CO, DSBs y no-CO/no-DSB analizados en el genoma del ratón. Para ello mediante la fórmula de $\Delta\Delta Ct$, se obtuvo que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K4me3, representado en este caso como el promedio de los valores de $\Delta\Delta Ct$ fue de 13,33% ($p < 0,05$), mientras que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K9ac, representado como el promedio de los valores de $\Delta\Delta Ct$ fue de 26,70 ($p < 0,05$). (Fig 3A).

En cuanto al enriquecimiento total de las modificaciones de la histona H3 analizadas en la región modelo de DSB del cromosoma 17, calculadas mediante la fórmula de $\Delta\Delta Ct$ se obtuvo que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K4me3, representado en este caso como el promedio de los valores de $\Delta\Delta Ct$ fue de 12,22% ($p < 0,05$), mientras que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K9ac, representado como el promedio de los valores de $\Delta\Delta Ct$ fue de 33,37% ($p < 0,05$). (Fig 2B).

En relación al enriquecimiento total de las modificaciones de la histona H3 analizadas en la región modelo de CO del cromosoma X, calculadas mediante la fórmula de $\Delta\Delta Ct$ se obtuvo que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K4me3, representado en este caso como el promedio de los valores de $\Delta\Delta Ct$ fue de 0,1483 ($p < 0,05$), mientras que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K9ac, representado como el promedio de los valores de $\Delta\Delta Ct$ fue de 32,08% ($p < 0,05$).

Considerando lo anterior, estos resultados revelan diferencias en el nivel de enriquecimiento total entre las modificaciones de histonas asociadas a cromatina activa, H3K4me3 y H3K9ac. Se observa que en las 3 regiones analizadas, existe un enriquecimiento total mayor de la

modificación H3K9ac en comparación con la modificación H3K4me3.

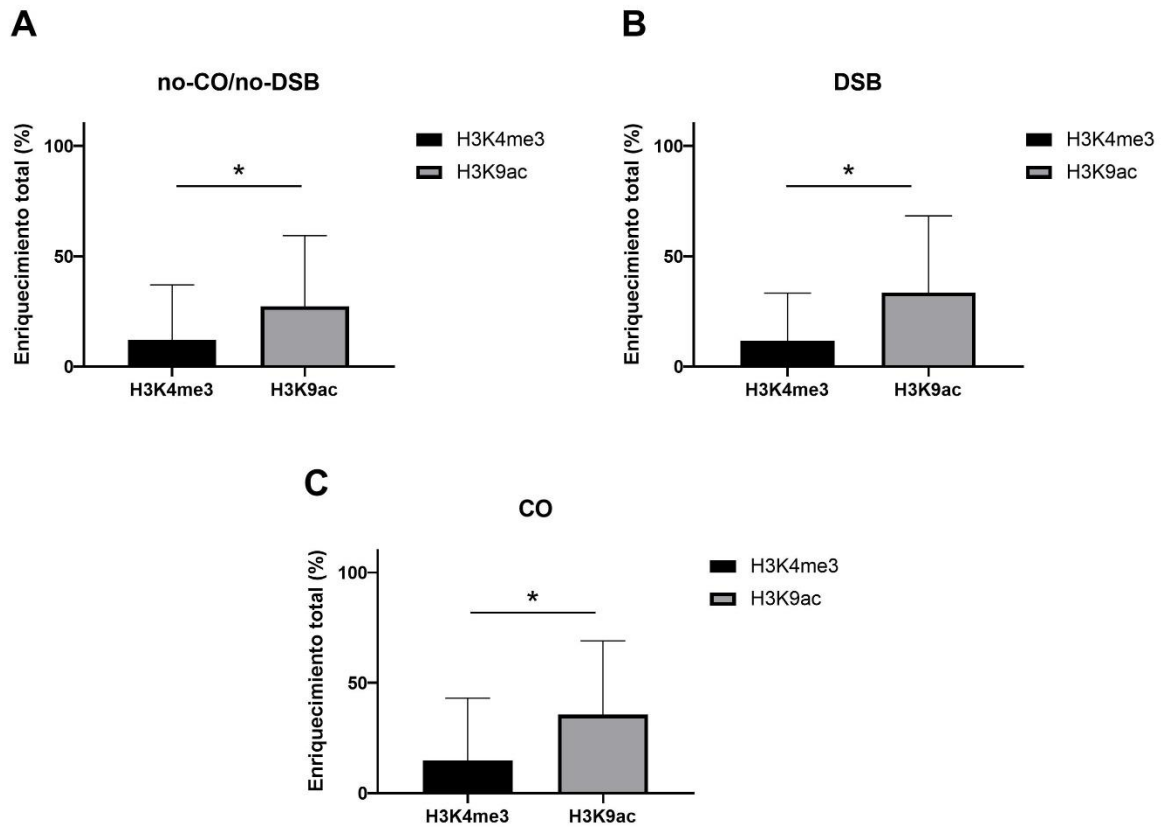


Figura 3: Enriquecimiento total de H3K4me3 y H3K9ac en las regiones de CO del cromosoma X, de DSB del cromosoma 17 y no-CO/no-DSB del cromosoma X. (A) Cuantificación del enriquecimiento total de las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac en la región modelo de no ruptura del DNA del cromosoma X; cada barra representa el promedio de enriquecimiento que presenta cada modificación de la histona H3 analizada ($p < 0,05$). (B) Cuantificación del enriquecimiento total de las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac en la región modelo de DSB del cromosoma 17; cada barra representa el promedio de enriquecimiento que presenta cada modificación de la histona H3 analizada ($p < 0,05$). (C) Cuantificación del enriquecimiento total de las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac en la región modelo de CO del cromosoma X; cada barra representa el promedio de enriquecimiento que presenta cada modificación de la histona H3 analizada ($p < 0,05$). Cada reacción de Tiled qPCR se realizó en triplicado. Las barras de error indican la desviación estándar. (Figura 3; $n = 30$ puntos analizados para el cromosoma X región sin ruptura del DNA; $n = 18$ puntos analizados para el cromosoma 17 región modelo de DSB; $n = 16$ puntos analizados para el cromosoma X región modelo de CO. Análisis estadístico de t-student)

Las modificaciones de la histona H3 presentan un patrón epigenético específico en las regiones de CO *hotspot*, de DSB y no-CO/no-DSB

Tras determinar que tanto la cantidad de DNA asociado a las modificaciones de histona analizadas y que la cantidad de H3 trimetilada en K4 y acetilada en K9 son diferentes en las distintas regiones analizadas, investigamos a continuación cómo era la configuración epigenética y la ubicación de los nucleosomas con H3K4me3 y H3K9ac a lo largo de los sitios de CO, DSB y no-CO/no-DSB estudiados.

Para realizar esta comparación se confeccionó un gráfico de nivel de enriquecimiento versus posición relativa de cada modificación para cada región analizada. Esto permitió observar la dinámica del enriquecimiento de cada una de las 2 modificaciones de la histona H3 superpuestas, proporcionando un análisis espacial completo y generando un mapa de enriquecimiento específico para cada región.

Al graficar los valores de $\Delta\Delta Ct$ de los amplicones obtenidos de las muestras ChIP respecto a su posición relativa, se observó que la ocupación de las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K9ac se distribuye de forma diferencial a lo largo de las 3 regiones del genoma de ratón analizadas.

Para analizar la configuración epigenética de la región del cromosoma X, mapeamos completamente la presencia, enriquecimiento y posición de cada nucleosoma con H3K4me3 y H3K9ac para poder realizar un análisis espacio específico de la región.

Con los valores de $\Delta\Delta Ct$ de los amplicones obtenidos desde las muestras ChIP, graficados respecto a su posición relativa, observamos que la ocupación de las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K9ac se distribuye de forma diferencial a lo largo de toda la región modelo de CO del cromosoma X, mostrando peaks de distinto grosor y altura.

Respecto de los resultados obtenidos con H3K4me3 se observan 3 peaks de enriquecimiento ($R > 0,15$), que se encuentran agrupados en 2 sitios de la región modelo de CO, al inicio y al final de ésta. El primer peak se observa entre las posiciones 169,988,808 – 169,988,985 pb y los 2 restantes se ubican entre las posiciones 169,990,873 – 169,991,524 pb. La existencia de estos peaks indica que los nucleosomas presentes en esos sitios en donde hubo amplificación presentan la modificación de histona H3K4me3.

Mientras, estas posiciones coinciden con la posición en que se encuentran los peaks con un mayor valor de $\Delta\Delta Ct$ ($R > 0,75$). Estos peaks mayores a 0,75 indican que estos sitios poseen la mayor ocupación de la modificación H3K4me3 en sus nucleosomas. Existieron 10 sitios en donde no hubo amplificación, por lo que se considera que en esto y se ubican mayoritariamente en la parte central de la región analizada como modelo de CO.

Con respecto a los resultados obtenidos con H3K9ac es posible observar 8 peaks ($R > 0,15$), que se encuentran espaciados a lo largo de toda la región modelo de CO del cromosoma X, la existencia de estos peaks indica que hubo amplificación en los sitios que fueron sometidos a qPCR, lo que se traduce como que los nucleosomas presentes en esos sitios en donde hubo amplificación presentan la modificación de histona H3K9ac. Por otra parte, los peaks con el enriquecimiento más alto ($R > 0,75$) se encuentran en uno solo de los extremos de la región del cromosoma X estudiada, entre las posiciones 169,990,873 - 169,991,033 pb. Los peaks con un valor de $\Delta\Delta Ct$ menor a 0,75 se encuentran en los extremos de la región estudiada. Mientras, hubo 4 sitios en donde no hubo amplificación (Fig 4A).

Con el propósito de estudiar la configuración epigenética de la región del cromosoma 17, realizamos un mapeo exhaustivo para determinar la presencia, enriquecimiento y posición de cada nucleosoma con H3K4me3 y H3K9ac. Esto nos permitió realizar un análisis detallado y

específico de la distribución de estas modificaciones en la región estudiada. Con los valores de $\Delta\Delta Ct$ de los amplicones obtenidos desde las muestras ChIP, graficados respecto a su posición relativa, observamos que la ocupación de las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K9ac se distribuye de forma diferencial a lo largo de toda la región modelo de DSB del cromosoma 17. Respecto de los resultados obtenidos de la muestra inmunoprecipitada con H3K4me3 se observan 5 peaks de enriquecimiento ($R > 0,15$) que se encuentran agrupados en 2 sitios de la región modelo de DSB, los primeros 2 se encuentran entre las posiciones 31,505,117 – 31,505,284 y 31,505,988 – 31,506,160 pb que están ubicados al inicio de la región analizada y los 3 restantes se encuentran entre las posiciones 31,509,107 – 31,509,934 pb. La existencia de estos peaks indica que los nucleosomas presentes en esos sitios en donde hubo amplificación presentan la modificación de histona H3K4me3.

Además, estas posiciones coinciden con la posición en que se encuentran los peaks con un mayor valor de $\Delta\Delta Ct$ ($R > 0,75$). Estos peaks mayores a 0,75 indican que estos sitios poseen la mayor ocupación de la modificación H3K4me3 en sus nucleosomas. Además, se puede observar en los resultados que en la parte central de la región seleccionada como modelo de DSB no existieron peaks de ocupación de la modificación de histona H3K4me3 ya que en estos puntos el valor de $\Delta\Delta Ct$ fue de 0 para cada uno. La cantidad de sitios total en donde no hubo amplificación fue de 13 puntos (Fig 4B).

En el caso de los resultados obtenidos con H3K9ac es posible observar 10 peaks ($R > 0,15$), que se encuentran espaciados por todo el largo de la región del cromosoma 17 analizada; la existencia de estos peaks indica que hubo amplificación en los sitios que fueron sometidos a qPCR, lo que se traduce como que los nucleosomas presentes en esos sitios en donde hubo amplificación presentan la modificación de histona H3K9ac. Por otra parte, los peaks con el

enriquecimiento más alto ($R > 0,75$) se encuentran entre las posiciones 31,505,410 - 31,505,582 pb, 31,507,638 - 31,507,833 pb y 31,509,107 - 31,509,714. Los peaks con un valor de $\Delta\Delta Ct$ menor a 0,75 se encuentran espaciados a lo largo de la región estudiada, siendo un 44,44% de todos los sitios estudiados. Mientras, hubo 2 sitios en donde no hubo amplificación. (Fig 3B).

Con el fin de analizar la configuración epigenética de la región no-CO/no-DSB del cromosoma X, mapeamos completamente la presencia, enriquecimiento y posición de cada nucleosoma con H3K4me3 y H3K9ac.

Con los valores de $\Delta\Delta Ct$ de los amplicones obtenidos desde las muestras ChIP graficados respecto a su posición relativa observamos que la ocupación de las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K9ac se distribuye de forma diferencial a lo largo de toda la región no-CO/no-DSB, mostrando peaks de distinto grosor y altura. Respecto de los resultados obtenidos con H3K4me3 se observan 6 peaks de enriquecimiento ($R > 0,15$), que se encuentran agrupados en 2 sitios de la región analizada, al inicio y al final de ésta. Los primeros 3 peaks se observan entre las posiciones 166,425,380 y 166,426,029 pb y los 3 restantes se ubican entre las posiciones 166,427,276 y 166,428,407 pb. La existencia de estos peaks indica que los nucleosomas presentes en esos sitios en donde hubo amplificación presentan la modificación de histona H3K4me3.

Asimismo, estas posiciones coinciden con la posición en que se encuentran los peaks con un mayor valor de $\Delta\Delta Ct$ ($R > 0,75$); estos peaks mayores a 0,75 indican que estos sitios poseen la mayor ocupación de la modificación H3K4me3 en sus nucleosomas. Además, los peaks menores a $R = 0,75$ se encuentran mayormente entre las posiciones 166,426,000 y 166,427,346 pb, que se encuentran en la parte central de la región analizada. Existieron 14

sitios en donde no hubo amplificación por lo que se considera que en estos puntos no existe enriquecimiento de la modificación de histona H3K4me3 (Fig 4C).

Respecto a los resultados obtenidos con H3K9ac es posible observar 15 peaks ($R > 0,15$), que se encuentran espaciados a lo largo de toda la región no-CO/no-DSB. La existencia de estos peaks indica que los nucleosomas presentes en esos sitios en donde hubo amplificación presentan la modificación de histona H3K9ac. Por otra parte, los peaks con el enriquecimiento más alto ($R > 0,75$) se encuentran entre la posición 166,425,380 - 166,426,029 pb y la posición 166,427,276 - 166,428,407 pb. Los peaks con un valor de $\Delta\Delta Ct$ menor a 0,75 se encuentran espaciados a lo largo de la región estudiada, siendo un 60% de todos los sitios estudiados. Mientras, hubo 8 sitios en donde no hubo amplificación (Fig 4C).

En su conjunto, estos datos indican que las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac exhiben una dinámica de enriquecimiento y densidad diferencial entre las tres regiones analizadas. Además, se pudo observar que la ocupación de las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K9ac se distribuye de manera diferencial a lo largo de cada una de las regiones estudiadas.

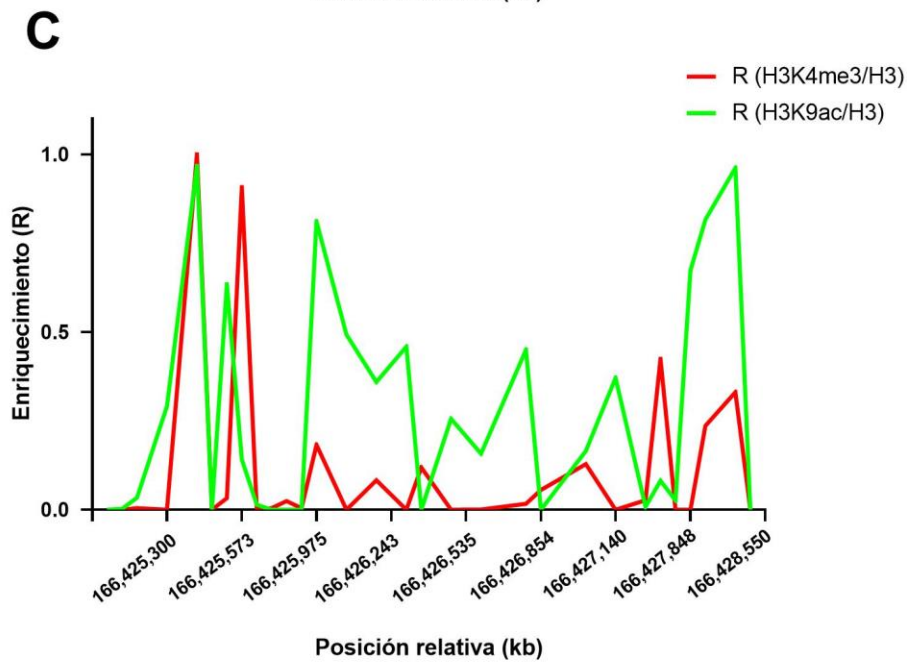
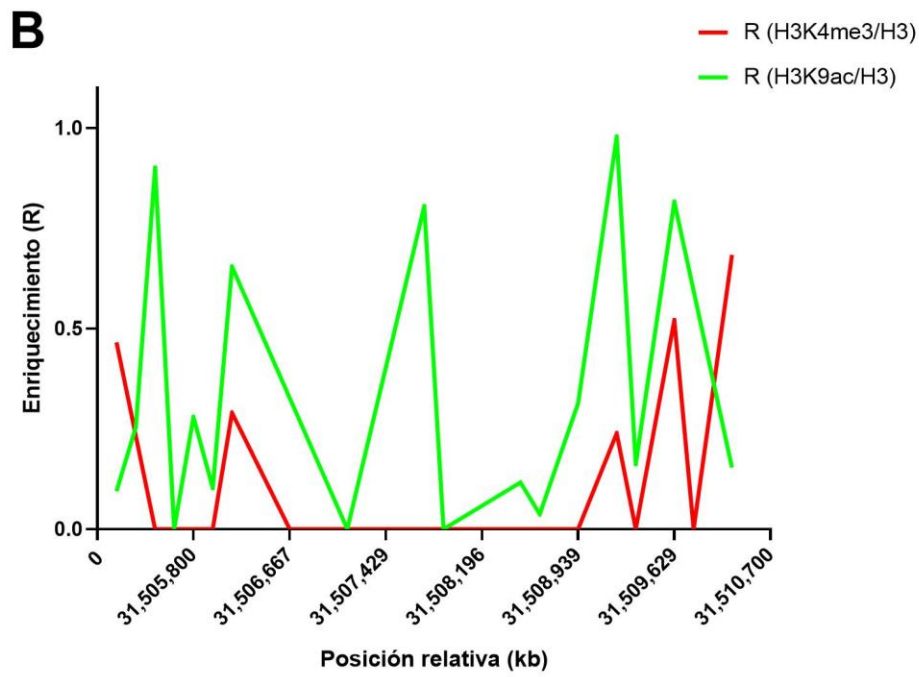
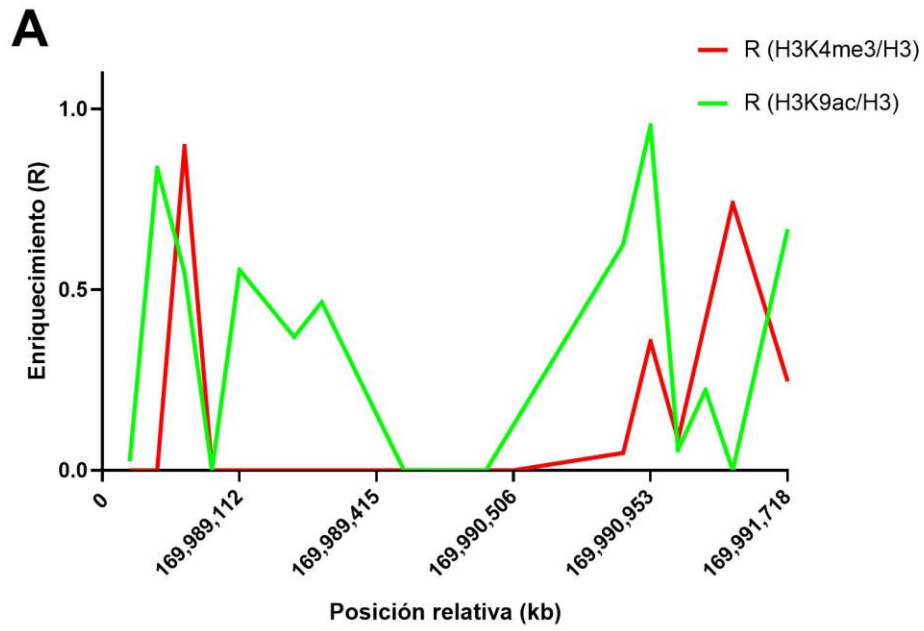


Figura 5: Las modificaciones de la histona H3 presentan una dinámica diferencial de enriquecimiento y densidad entre las regiones CO, DSB y no-CO/noDSB. (A-C) Mapa de densidad de enriquecimiento de H3K4me3 y H3K9ac de las regiones de CO de la región 169,988,619 - 169,991,801 Kb del cromosoma X (A); de la región de DSB de la región 31,505 - 31,509 Kb del cromosoma 17 (B); y no-CO/no-DSB de la región 166,424 – 166,428 Kb del cromosoma X (C). Línea roja representa el valor de $\Delta\Delta Ct$ (R) de cada amplicón obtenido por Tiled qPCR para H3K4me3, y la línea verde el valor para H3K9ac. Cada reacción de Tiled qPCR se realizó en triplicado.

DISCUSIÓN

H3K4me3 y H3K9ac son marcadores epigenéticos de cromatina abierta presentes en sitios de actividad transcripcional que desempeñan un papel importante en la regulación génica y en la organización de la cromatina durante Meiosis I. Debido a estudios en levaduras, plantas y gusanos se conoce que están ligadas a la regulación de la recombinación meiótica por estar presentes en profase I, especialmente en sitios de DSB *hotspots*, lo que indicaría un papel importante en la regulación de pasos cruciales para generar diversidad génica y que presentan una dinámica epigenética específica que esté modulando las etapas de profase. A pesar de esta evidencia en mamíferos no es conocido si existe una dinámica o código epigenético que module las etapas de profase I cruciales para recombinación génica.

Inicialmente se analizó si existen diferencias en la cantidad de puntos enriquecidos de cada modificación de histonas entre las regiones modelo de CO, DSB y no-CO/no-DSB. Los resultados obtenidos indican que tanto en la región no-CO/no-DSB como en la región de CO, no se observan diferencias significativas en la cantidad de puntos donde se produce enriquecimiento de las modificaciones de histona H3K4me3 y H3K9ac. En cambio, se observaron diferencias significativas entre la cantidad de puntos enriquecidos con la modificación de histona H3K4me3 y la cantidad de puntos enriquecidos con la modificación de histona H3K9ac en la región modelo de DSB. Se encontró una mayor cantidad de puntos con enriquecimiento de la modificación H3K9ac en comparación con una menor cantidad de puntos con la modificación de histona H3K4me3. Es interesante destacar que estas diferencias en las cantidades de puntos enriquecidos con cada una de las modificaciones epigenéticas de la histona 3 son distintas a lo que se ha observado en otras especies, donde la modificación de histonas H3K4me3 suele estar presente en los sitios de DSB.

Una posible explicación para estas diferencias en nuestros resultados, en comparación con

la evidencia en otras especies, puede deberse al hecho de que los ratones analizados son ratones de 3 meses de edad, y se sabe que aproximadamente el 80% de sus células meióticas están en paquiteno, una etapa en la cual se forma el complejo sinaptonémico para la recombinación genómica, en lugar de estar en leptoteno, que es la etapa donde ocurre la generación de DSB. Esto puede influir en la distribución y enriquecimiento de las modificaciones de histonas en las regiones de interés durante la profase I de la meiosis.

Con base en estos resultados, decidimos analizar el enriquecimiento total de cada una de las modificaciones de la histona H3 en todas las regiones. El objetivo es obtener una comprensión más profunda del nivel de enriquecimiento que los nucleosomas de estas regiones presentan con respecto a estas modificaciones epigenéticas. En los resultados obtenidos se pudo observar que las diferencias en el enriquecimiento total entre sitios enriquecidos con la modificación de histonas H3K4me3 y H3K9ac son significativas tanto en la región no-CO/no-DSB, DSB y CO. Curiosamente, en las 3 regiones, se observó que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K9ac es significativamente mayor que el enriquecimiento total de la modificación de histona H3K4me3. Esto es interesante, dado que como se mencionó anteriormente tanto la región no-CO/no-DSB como la región de CO tienen una cantidad similar de sitios con enriquecimiento. De estos resultados se desprende que los nucleosomas presentes en estas regiones, incluida la región de DSB, muestran un mayor enriquecimiento total de la modificación de histonas H3K9ac en comparación con la modificación de histonas H3K4me3.

Como tercer paso para determinar si estas regiones del genoma de ratón poseen un patrón epigenético específico de las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K9ac consistió en generar mapas de cada región del genoma de ratón en gráficos que relacionaban el enriquecimiento de cada punto de genoma amplificado con su posición relativa. Se obtuvieron tres mapas que representan los niveles de enriquecimiento de las modificaciones

de histonas H3K4me3 y H3K9ac en cada región estudiada. Estos mapas permitieron analizar de manera contextual el enriquecimiento y la densidad de las modificaciones de la histona H3 en los nucleosomas presentes en cada región.

Respecto al mapa que muestra el patrón epigenético de las modificaciones H3K4me3 y H3K9ac en la región no-CO/no-DSB, se observa que la mayoría de los peaks de ambas modificaciones epigenéticas coinciden en posición. Sin embargo, en varios puntos, se presentan diferencias significativas en los valores de enriquecimiento, lo que sugiere que esos nucleosomas contienen ambas modificaciones de la histona H3, pero en distintos niveles de enriquecimiento.

En la región de DSB en el gráfico construido se nota un peak al inicio donde la posición y el nivel de enriquecimiento de ambas modificaciones coinciden. Luego la modificación de histona H3K4me3 desaparece y solo se encuentran peaks de alto enriquecimiento de la modificación H3K9ac. Al final de la región nuevamente se superponen las posiciones de los peaks pero manteniendo una diferencia en los niveles de enriquecimiento siendo mayor para H3K9ac que para H3K4me3. De manera interesante justo al inicio de la región se puede observar cómo en la misma posición relativa, el nivel de enriquecimiento de H3K9ac comienza a elevarse mientras que el nivel de H3K4me3 disminuye. Del mismo modo al final de la región se nota lo contrario: mientras que el nivel de enriquecimiento de H3K4me3 experimenta un gran aumento, en la misma sección del genoma, el nivel de H3K9ac ya disminuye. Esta dinámica de enriquecimiento es bastante interesante puesto que se ha visto que existe una interacción entre estas dos marcas epigenéticas en sitios críticos de recombinación meiótica, en donde se ha visto que lectores epigenéticos de metilación mantienen la marca epigenética H3K9ac en los sitios críticos de recombinación, antagonizando la actividad deacetilasa de las proteínas HDAC debido a su capacidad para reconocer la marca de histona de H3K4me3. Siguiendo esta información, una hipótesis para los resultados obtenidos es que al reconocer la marca de H3K4me3 en estos sitios, la

acetilación de la lisina 9 no solo se mantiene si no que aumenta, y que esta misma regulación hace que disminuyan los niveles de enriquecimiento de H3K4me3.

Sobre este mismo análisis se puede estudiar la dinámica de enriquecimiento que se pudo ver al construir el mapa de la región de CO puesto que en esta región también se pudo observar la tendencia de que existe un primer peak de ambas modificaciones de la histona H3 que coinciden en posición y enriquecimiento y luego ocurre que disminuyen los niveles de enriquecimiento de H3K4me3 en los nucleosomas presentes en la parte central de la región. Mientras, se observa un aumento de los niveles de enriquecimiento de la modificación de histona H3K9ac, en donde se pueden ver peaks claros que representan que los nucleosomas de esas posiciones poseen un nivel alto de enriquecimiento de esa modificación de histona H3. Al final de la región, en cambio se puede ver que existe un aumento en el enriquecimiento de la H3K4me3 y una disminución del enriquecimiento de la H3K9ac, en donde se genera un peak con un alto nivel de enriquecimiento en H3K4me3 y una ausencia de enriquecimiento de la H3K9ac en ese nucleosoma. Aquí también se puede observar que luego de que exista un nucleosoma con una cantidad de enriquecimiento de ambas modificaciones, luego los nucleosomas que siguen en la región presentan altos niveles de H3K9ac y no presentan H3K4me3, lo que también puede ser explicado por la evidencia de que es necesaria la presencia de la marca epigenética de H3K4me3 para que se desarrolle y mantenga el enriquecimiento de la modificación de H3K9ac gracias a los lectores epigenéticos de metilación. Estos resultados muestran que existe un *cross-talk* entre estas modificaciones y que podría estar definiendo el patrón epigenético de estas modificaciones de histona en las regiones que son críticas para la recombinación genómica. También estos resultados en la región modelo de CO pueden verse explicados debido a que en esta región está la presencia de un CTCF (CCCTC-binding factor), que es una proteína de unión al DNA que actúa como un regulador clave en la organización tridimensional de la cromatina y en la formación de bucles de DNA. Por estudios anteriores se sabe que CTCF

puede interactuar con enzimas que regulan la acetilación de histonas como las histona acetiltransferasas (HATs) que agregan grupos acetilo a las histonas, incluida la H3K9ac. Este CTCF podría estar interactuando con HATs, que generan un aumento en la acetilación de la lisina 9 de la histona 3 en los nucleosomas de esa región y, junto con el *cross-talk* entre H3K4me3 y la unión de lectores de metilación, podrían estar aumentando de forma significativa los niveles de enriquecimiento de H3K9ac, generando peaks con niveles altos de enriquecimiento, demostrando claramente que los nucleosomas de esa región poseen un patrón epigenético específico para la modificación epigenética H3K9ac y por consiguiente, con su marcador epigenético de unión H3K4me3.

CONCLUSIONES

En conjunto, estos resultados muestran que hay una presencia diferencial de modificaciones de histonas asociadas a cromatina activa, como H3K4me3 y H3K9ac, dependiendo de la funcionalidad y actividad metabólica de las regiones genómicas durante la meiosis. Indican también que hay un enriquecimiento diferente de modificaciones de histonas en la región de CO en comparación con los otros sitios analizados.

Los mapas generados mostraron patrones específicos de enriquecimiento para cada región, destacando que en la región de CO se observaron picos iniciales de ambas modificaciones, seguidos de una disminución en H3K4me3 y un aumento en H3K9ac, para luego invertir esta tendencia al final de la región. Esto sugiere una posible interacción entre estas marcas epigenéticas en sitios críticos de recombinación meiótica.

Estos hallazgos indican que existe un *cross-talk* entre H3K4me3 y H3K9ac, lo que podría estar definiendo el patrón epigenético en las regiones cruciales para la recombinación génica. Además, la presencia de la proteína CTCF en la región modelo de CO podría estar interactuando con enzimas reguladoras de la acetilación de histonas, como las HATs, contribuyendo al aumento de la acetilación de la lisina 9 de la histona 3 y, junto con el *cross-talk* entre H3K4me3 y los lectores de metilación, podría influir significativamente en los niveles de enriquecimiento de H3K9ac.

En conjunto, estos resultados resaltan la dinámica regulación epigenética que ocurre durante la meiosis I en los ratones, lo que podría tener un papel fundamental en la generación de diversidad genética y en la regulación de la recombinación meiótica. Sin embargo, es importante seguir investigando para comprender completamente los mecanismos y el impacto de estas modificaciones epigenéticas en la formación y localización de *crossovers* durante la profase I de la meiosis en mamíferos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gray S, Cohen PE. Control of Meiotic Crossovers: From Double-Strand Break Formation to Designation. *Annual review of genetics*. 2016;50:175-210.
2. Hunter N. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(12).
3. Baudat F, Imai Y, de Massy B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(11):794-806.
4. Thacker D, Keeney S. PCH'ing together an understanding of crossover control. *PLoS genetics*. 2009;5(7):e1000576.
5. Wang S, Hassold T, Hunt P, White MA, Zickler D, Kleckner N, et al. Inefficient Crossover Maturation Underlies Elevated Aneuploidy in Human Female Meiosis. *Cell*. 2017;168(6):977-89 e17.
6. Lam I, Keeney S. Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;7(1):a016634.
7. Hwang PY, Hunter N. Mapping meiotic breaks: Spo11 oligonucleotides precisely mark the spots. *Genome biology*. 2011;12(4):111.
8. Holloway JK, Sun X, Yokoo R, Villeneuve AM, Cohen PE. Mammalian CNTD1 is critical for meiotic crossover maturation and deselection of excess precrossover sites. *The Journal of cell biology*. 2014;205(5):633-41.
9. Drouaud J, Khademian H, Giraut L, Zanni V, Bellalou S, Henderson IR, et al. Contrasted patterns of crossover and non-crossover at *Arabidopsis thaliana* meiotic recombination hotspots. *PLoS genetics*. 2013;9(11):e1003922.
10. Hillers KJ. Crossover interference. *Current biology : CB*. 2004;14(24):R1036-7.
11. Martini E, Diaz RL, Hunter N, Keeney S. Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell*. 2006;126(2):285-95

12. Crichton J, Playfoot C, Adams I. The Role of Chromatin Modifications in Progression through Mouse Meiotic Prophase. *Journal of Genetics and Genomics*. el 20 de marzo de 2014;41(3):97–106.
13. Yamada T, Mizuno K, Hirota K, Kon N, Wahls WP, Hartsuiker E, et al. Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *The EMBO journal*. 2004;23(8):1792-803.
14. Tock AJ, Henderson IR. Hotspots for Initiation of Meiotic Recombination. *Frontiers in genetics*. 2018;9:521.
15. Yelina N, Diaz P, Lambing C, Henderson IR. Epigenetic control of meiotic recombination in plants. *Science China Life sciences*. 2015;58(3):223-31.
16. Yelina NE, Lambing C, Hardcastle TJ, Zhao X, Santos B, Henderson IR. DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Genes & development*. 2015;29(20):2183-202.
17. Yelina NE, Choi K, Chelysheva L, Macaulay M, de Snoo B, Wijnker E, et al. Epigenetic remodeling of meiotic crossover frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA methyltransferase mutants. *PLoS genetics*. 2012;8(8):e1002844.
18. Wagner CR, Kuervers L, Baillie DL, Yanowitz JL. *xnd-1* regulates the global recombination landscape in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2010;467(7317):839-43.
19. Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Geli V, Nicolas A. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *The EMBO journal*. 2009;28(2):99-111.
20. Grey C, Baudat F, de Massy B. PRDM9, a driver of the genetic map. *PLoS genetics*. 2018;14(8):e1007479.
21. Manterola M, Brown TM, Oh MY, Garyn C, Gonzalez BJ, Wolgemuth DJ. BRDT is an essential epigenetic regulator for proper chromatin organization, silencing of sex

- chromosomes and crossover formation in male meiosis. *PLoS genetics*. 2018;14(3):e1007209.
22. Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*. 2007;26(37):5521-7.
23. Jiang Y, Zhang HY, Lin Z, Zhu YZ, Yu C, Sha QQ, et al. CXXC finger protein 1-mediated histone H3 lysine-4 trimethylation is essential for proper meiotic crossover formation in mice. *Development*. 2020;147(6).
24. Getun IV, Wu ZK, Khalil AM, Bois PR. Nucleosome occupancy landscape and dynamics at mouse recombination hotspots. *EMBO reports*. 2010;11(7):555-60.
25. Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science*. 2011;331(6019):916-20.
26. Kwan-Wood Gabriel Lam KB, Gang Cheng, Florencia Pratto & R. Daniel Camerini-Otero. Cell type specific genomic reveals histone modification dynamics in mammalian meiosis. *Nature communications*. 2019.
27. Smagulova F, Gregoret IV, Brick K, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV. Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature*. 2011;472(7343):375-8

ANEXOS

Tabla 1:

Primer utilizados para el análisis de la región CO del cromosoma X, región DSB del cromosoma 17 y de la región no-CO/no-DSB por Tiled qPCR

N°	Primer Forward	Primer Reverse
Cromosoma X CO hotspot, región 169,988 - 169,991 (5 kb de longitud)		
1	GGCAGTGAAGGAATGGAAAA	GATCCTTTATTGGCGATCACA
2	GCCGTCCACCTCTAATGTGT	GAAAATCACATCGCCTGTCTG
3	GACCACGAGCAAATCTCACC	GTCTCCTTGCCGTCGTGT
4	ACGAGTGGATCGGGAAGAAC	ATGGAGCCGTTGTCGTAGTC
5	TCCTGCTGGACTACGACAAC	TGCTCCGTACAGTCCAGATG
6	GCTGTTTATGGGGTCGAGAA	GGGGGTGATCACTGTGAATG
7	AGAGCGTCGTGACATCTTCC	GGGGGTGATCACTGTGAATG
8	CATACTCATCCCCAGCATC	GCCTGGCCTCAGTATGGAAT
9	GCACGACCGCTTAGAAGAAC	GGTGTCCGTGTTTAAGATGTGA
10	CATCTGGCCTCATCTGGAGT	AACAGCGACGAGCAGTCAAT
11	GTCGCTGTTTGCGTATGTGT	CAGCAGGCGAGTGACATAAA
12	GGGGAGAATAAAGGAGAAGCA	GCGCATGACTGTGATTGATT
13	GCCTCACACATTCAATCAGC	AGGATGCAGGGGTTTAAGTG
14	CCCCTGCATCCTACATTCAC	GGAGAGGTCAGGGGATGAC
15	GTCATCCCCTGACCTCTCC	TCAGAGCCCAGTGTCAATCA
16	GCCTCGGTGACTGACAGG	CTCAGCCTCCGCACACAC
17	ACAGTTAATCGCGGTCATCC	CCTGGATTGAATGTGTGAGG
Cromosoma 17, región 31,505 – 31,510 (5 kb de longitud)		
1	GAAACACAATTGGGCTCTGG	GGGCAGTCCTCAGGTGTC
2	CCCAGAACTTGCTTCCTGTC	TCTAGCCCCAGGATTTACCC
3	TATCCGCTGTGGGTAAATCC	TGGCTGTAAACCCTGAGACC

4	TACGCGACGGGAGGTATTAG	TGTGGCAGGTGTTTTGAGAC
5	CTGAGCCACAGAGGTCCTG	AATCCTGTGTGTGCAGTTGG
6	AATGGTCCAACCTGCACACAC	GGGCCATAGAGACTACCACTTG
7	TGGCCCATCAAGTGGTAGTC	CTGTCCTGGAACCTCCCTCTG
8	GATCAGACCTGCCTGCTCTC	TTGAGAAAACCTCCTCTTTGG
9	GTGTGCAGAAAGCCACACTG	GATGTTGGAACCCCTGTAGC
10	GCTACAGGGGTTCCAACATC	TGTGGAGAGGTTGCATCTTG
11	ATATGTGTGGGTTCCCTTGC	CAGCAAAGGTGGAGCTAGAG
12	CCTCTGCATACACAAGGTTAGC	CTCCTTCTGCCATTCGAGTC
13	TGTCCACAGGCTTATGTCC	CCGTCCTGGAACCTCACTCTG
14	CCAGGGCTACACAGAGAAACC	TCAATTGGGAAGGAAAGGTG
15	ACCCTCCTCCCTTGAGTTG	TGCTCTGGGTCTCCTGAATC
16	CCGAGAAAAGGCAGAGACAC	TGGCTATTCTGGTCCTCTCC
17	TCCTGCCCAGTTGCTGTTAC	CAGCAGGAGTGGGACTGTTAG
18	GCTAAACAGCCCAAACCTGG	GCCATAGTGACAGTAACCGTTG
19	TCACTATGGCTACTGACATGC	TCCACCTTCTCCAAGTCTGG
20	GGTTTTGTACGGAAAAGAATCAG	TTTTCTCTCCCTGCCCTTTC
Cromosoma X no-CO/no-DSB, región 166,424– 166,428 (5 kb de longitud)		
1	TCGCTCCTTCAGCTCTGC	AACGTTGCTTGCTTGCTAAAA
2	TGAGCATAAATTTCTTTTGATTCCA	AGGAAGCAATGTCTGAGTTCCA
3	CCCTGGAACCTCAGACATTGC	GTGCAAAGCAATCTTCATCG
4	TGCTTTTGCACAAAATATACTTCC	GGGAATATGAGGGATGCTAAAGA
5	AAACTTTAAATATGCACATTCAGCAA	ACTGGAATCAGAATGATCTGGAA
6	TTGGTGATTGATGGTGATGC	GTGGTGTCTGTTACGGATG
7	GGCTTAGGTGAACTCCAGTG	CCCTCAACCAATTGTGAGC
8	ACCCCATCCGTGAACAGAC	AATCATTTTCATCTTTTCGTGATTGT

9	GGGAGAGAGAAACAATCACGAA	TGGCTTCTTACCCAGCTCAC
10	AGCTGGGTAAGAAGCCACTTG	TGCCTATACCATGCCTTTGG
11	GCCACTTGAGATGGCTAGGTC	CTGCCAAGGTCCCCATTT
12	AAGCGTCCAAAGGCATGG	TTTTCATGTAGGTGACTGCCAAG
13	TGAAAATAGTTCATTTCCCAGATACA	CCCCTTAGATTTTCATCCTTGCT
14	AAAGCGCCAGCAAGGATG	GAGTTGCCCGTTTGTTTGC
15	ACGGGCAACTCTGAACACA	GCAGGTAAAAACGGGAGTGG
16	TCCATGAGCAGAGCACCA	GCACCTGCTCACCCCTTT
17	CACCATTGCTCAATCCCTTC	TTCTGGCTCTGGGGAGGA
18	CCCCTTCCTGGCTACTGC	TCAAGGAGAGGCTTGGAGGT
19	CCTCCAAGCCTCTCCTTGA	AGCACTGGGGTGAATGTCC
20	TCAAGAGCCTTGTTCCATCC	CCGAGAGGTAATATATAGGCACAAGT
21	GCAGGACACAAACACCCAGT	GGAATTGGCTGAGTTCCAGA
22	CAGCTATGAATTGAGCACAAAGAC	GAGGCCAGCTACAGCCTTTTA
23	GCTGGCCTCCACATAGCC	CCAGCTTCAGGTAGAAATGTGTC
24	AGCTTGGAACGGTGAGGAA	TGATTTTATATTTTCTAATTGGCTGTG
25	TTGAGCGTCAATAAGCTGAAACT	GCTTTGGGCCTCTTGCATA
26	TTTCAACTGTTCTGCATGTTTGA	CCAGTTCAAGCTTTCTGCACTT
27	CCAGATCTCTTTTCCCAAGACC	GCGTGCAGCTGTACTIONCAT
28	CATCACCAAAGGGTACACAGG	AAAGCCCATCCTCAGTGACA
29	AGTTAACCTCCACAAGTAAGGAAGTG	TGGAACTGGCCTCAAACCTGT
30	CCAGGCAGGGCTAAATAGTGA	CCAGCCAAGTGTCCCTAGGTAAT

Santiago, a 18 de diciembre de 2018

Certificado n°: **18217 – MED – UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA-1050**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Rol del lector epigenético Brdt en regular la estabilidad genómica mediante la formación y localización de los crossovers en meiosis”**, de la Investigadora Responsable Dra. **Marcia Manterola Zúñiga**, Profesor Asistente, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.


La Investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **180** ratones *Brdt*^{-/-} y **114** ratones *WT*, provenientes de Columbia University Medical Center, New York, USA, desde diciembre de 2018 a diciembre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Fondecyt de Iniciación Nro. 11181329**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.



Ronald Vargás Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile