TESE DE DOUTORAMENTO

DESCIFRANDO LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON BROMODOMINIOS EN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES

José Ángel Pardavila Paz

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **Anxo Vidal Figueroa**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **Descifrando la función de las proteínas con bromodominios en la generación de células pluripotentes**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna José Ángel Pardavila Paz, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **10 de Febreiro de 2021**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna. **Miguel Ángel Fidalgo Pérez**

En condición de: **Titor/a e director/a**

Título da tese: **Descifrando la función de las proteínas con bromodominios en la generación de células pluripotentes**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna José Ángel Pardavila Paz, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **10 de Febreiro de 2021**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **José Ángel Pardavila Paz**

Título da tese: **Descifrando la función de las proteínas con bromodominios en la generación de células pluripotentes**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela**, **23 de febrero de 2021**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

José Ángel Pardavila Paz declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral

En Santiago de Compostela, 03 de marzo de 2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Tabla de Contenidos

1. **RESUMEN** 6
2. **INTRODUCCIÓN** 10
2.1 Exordio 12
2.2 El estado celular pluripotente 13
2.2.1 Las etapas tempranas del desarrollo embrionario 14
2.2.2 Las células troncales embrionarias 15
2.2.3 La pluripotencia inducida 17
2.3 El control molecular del estado celular pluripotente 20
2.3.1 Mecanismos generales que gobiernan la pluripotencia 21
2.3.2 Regulación epigenética de la pluripotencia 25
2.3.3 Estudio de la química epigenética de la acetilación de histonas 32
2.4 La inducción de pluripotencia mediada por factores de transcripción 34
2.4.1 Trayectorias celulares durante la reprogramación celular somática 34
2.4.2 Mecanismos moleculares en la formación de iPSCs 36
2.4.3 Reprogramación epigenética durante la inducción de pluripotencia 39
2.4.4 Aplicaciones y retos actuales de la tecnología iPSC 41
2.5 Las proteínas que contienen bromodominios 43
2.5.1 La arquitectura del dominio BRD 44
2.5.2 El reconocimiento de residuos de lisina acetilados 44
2.5.3 Clasificación de las proteínas BRDs 45
2.5.4 Moléculas inhibidoras de los BRDs 57
2.6 Funciones moleculares de las proteínas BRD 62
2.6.1 Los BRDs y la remodelación de la cromatina 62
2.6.2 Los BRDs y la modificación de histonas 63
2.6.3 Los BRDs y el reconocimiento de histonas 64
2.6.4 Los BRDs y la modulación de la transcripción 65
2.7 Funciones biológicas de las proteínas con bromodominios 65
2.7.1 Los BRDs en desarrollo embrionario 66
2.7.2 Los BRDs en pluripotencia 67

3. **OBJETIVOS E IMPACTO** 70
4. **MATERIALES Y MÉTODOS** 74
4.1 Reactivos y kits 76
4.2 Modelos experimentales 76
4.3 Cultivo celular 78
4.4 Tratamientos con inhibidores químicos contra BRDs 79
4.5 Clonación de vectores plasmídicos 80
4.6 Transformación y obtención de ADN plasmídico 81
4.7 Transfección de células de mamífero 83
4.8 Generación de partículas lentivirales y transducción 84
4.9 Generación de líneas *knock-out* mediante CRISPR-Cas9 85
4.10 Ensayos de reprogramación en fibroblastos 86
4.11 Ensayos de reprogramación en pre-iPSCs 87
4.12 Detección de fosfatasa alcalina 88
4.13 Ensayo de formación de colonias pluripotentes 89
4.14 Citometría de flujo 89
4.15 Análisis del ciclo celular 90
4.16 Ensayo de proliferación celular por MTT 90
4.17 Determinación de muerte celular 91
4.18 Inmunofluorescencia 91
4.19 Inmunofluorescencia cuantitativa de célula única 92
4.20 Estimación del daño en ADN 93
4.21 Análisis del grado de compactación nuclear 93
4.22 Ensayo de accesibilidad en la cromatina 94
4.23 Extracción y purificación de ADN 95
4.24 Extracción de ARN 96
4.25 Obtención de ADN complementario 97
4.26 Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR 97
4.27 Análisis del transcriptoma mediante RNA-seq 98
4.28 Análisis *in silico* mediante GO, KEGG y GSEA 99
4.29 Extracción de proteína total 100

4.30 Obtención de fracción proteica unida a cromatina 101
4.31 Obtención de histonas 103
4.32 Análisis mediante Western blot 103
4.33 Inmunoprecipitación de nucleosomas y visualización 104
4.34 Identificación de cambios proteicos por SILAC-MS 105
4.35 Software y Algoritmos 106
4.36 Análisis estadísticos 108
4.37 Recursos bibliográficos 108
5. **RESULTADOS** 110
5.1 Análisis de la función BRD en reprogramación celular 112
5.1.1 La inhibición de la actividad BRD compromete la generación de iPSCs 112
5.1.2 Identificación de una firma de expresión BRD asociada a la adquisición de pluripotencia 115
5.1.3 Determinación de la función de los dominios BRD en SCR mediante cribado químico 119
5.1.4 La inhibición de la familia BET fenocopia la supresión de actividad BRD global en reprogramación 122
5.1.5 La actividad BRD de BET es dispensable en las etapas iniciales de la reprogramación 125
5.1.6 La actividad BRD de BET resulta necesaria para la adquisición de pluripotencia 127
5.2 Caracterización de la actividad BRD de la familia BET en intermediarios avanzados de reprogramación 129
5.2.1 La actividad BRD de BET es necesaria para la reprogramación eficiente de pre-iPSCs 129
5.2.2 La actividad BRD de BET resulta esencial al inicio de la transición pre-iPSC a iPSC 133
5.2.3 La presencia de JQ1 no afecta a la capacidad proliferativa ni a la viabilidad celular de las pre-iPSCs 135
5.3 Disección de los mecanismos de acción de la actividad BRD de la familia BET en la adquisición de pluripotencia 137
5.3.1 La inhibición de la actividad BRD de BET altera la composición de la cromatina 137
5.3.2 JQ1 altera la cromatina de manera dependiente e independiente de actividad transcipcional 140

5.3.3 JQ1 altera la presencia en cromatina de proteínas involucradas en procesos clave en reprogramación 143

5.3.4 La inhibición de la actividad BRD de BET afecta a la reparación de daño en el ADN 145

5.3.5 La actividad BRD de BET es necesaria para la organización de la cromatina 148

5.3.6 La inhibición de la actividad BRD de BET aumenta la compactación de la cromatina 152

5.3.7 La inhibición de la actividad BRD de BET altera el paisaje transcripcional de pre-iPSCs 154

5.3.8 La actividad BRD de BET coopera con NANOG para promover pluripotencia 159

5.4 Identificación del papel individual de cada miembro de la familia BET en la adquisición de pluripotencia 161

5.4.1 La pérdida de función de BRD3 y BRD4 recapitula el impacto transcripcional mediado por JQ1 161

5.4.2 Funciones no redundantes de BRD3 y BRD4 necesarias para la transición pre-iPSC a iPSC 165

5.4.3 BRD2 inhibe la formación de iPSCs 168

5.4.4 Las funciones de BRD2, BRD3 y BRD4 en la formación de iPSCs se encuentran conservadas 171

5.5 Análisis de la función BRD en pluripotencia 174

5.5.1 La inhibición de la actividad BRD compromete el mantenimiento del estado celular pluripotente 174

5.5.2 La actividad BRD de BET es necesaria para el mantenimiento de pluripotencia 177

5.4.3 La inhibición de MEK y GSK3β sostiene la autorrenovación de iPSCs en presencia de JQ1 179

5.4.4 El medio SL+2i no es suficiente para rescatar la ausencia de actividad BRD de BET en reprogramación 181

5.4.5 La presencia de BRD3 y BRD4 resulta necesaria para el mantenimiento de pluripotencia *naïve* 183

6. **DISCUSIÓN** 186

6.1 Impacto del reconocimiento de residuos Kac en Reprogramación y Pluripotencia 189

6.2 Funciones BRD específicas: similitudes y diferencias entre cribados químicos en reprogramación 191
6.3 La complejidad de la actividad BRD de BET en reprogramación y pluripotencia 194
6.4 La actividad BRD de BET y su impacto en la cromatina de pre-iPSCs..... 197
6.5 Funciones no redundantes y opuestas de la familia BET en reprogramación y pluripotencia 201
7. **CONCLUSIONES** 206
8. **APÉNDICE** 210
8.1. Tabla suplementaria 1. Químicos, reactivos y soluciones 212
8.2. Tabla suplementaria 2. Kits y Accesorios 215
8.3. Tabla suplementaria 3. ADN recombinantes..... 216
8.4. Tabla suplementaria 4. Anticuerpos primarios y secundarios..... 217
8.5. Tabla suplementaria 5. Oligonucleótidos 219
8.6. Tabla suplementaria 6. Secuencias sgRNAs..... 222
8.7. Tabla suplementaria 7. Datos transcriptómicos obtenidos por RNA-seq... 223
8.8. Tabla suplementaria 8. Datos proteómicos obtenidos por SILAC-MS 227
9. **LISTA DE ABREVIATURAS** 230
10. **LISTA DE FIGURAS** 236
11. **BIBLIOGRAFÍA** 242
12. **CURRICULUM VITAE** 274
13. **AGRADECIMIENTOS** 282

1. RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) representa una poderosa herramienta para entender los programas moleculares que determinan la identidad celular y alberga un gran potencial con fines terapéuticos. Sin embargo, la generación de iPSCs por lo general sigue siendo un proceso ineficiente y no del todo seguro, lo que limita sus potenciales usos clínicos. Mientras que la reprogramación somática para alcanzar la pluripotencia conlleva numerosos cambios transcriptómicos y epigenéticos a lo largo de distintas trayectorias celulares, el impacto del reconocimiento de residuos acetilados de lisina (Kac) dista mucho de ser comprendido. Por esto, en esta tesis investigamos de una manera exhaustiva el papel del reconocimiento de residuos Kac mediada por proteínas que contienen bromodominios (BRDs) durante reprogramación y en pluripotencia. Aquí identificamos que la actividad global BRD contenida en la superfamilia de proteínas BRD resulta esencial tanto para la generación de células iPSC como para el mantenimiento del estado celular pluripotente. Además, a través de cribados químicos descubrimos actividades BRD específicas que resultan inhibidoras o facilitadoras del proceso de reprogramación. De manera destacada, encontramos que la actividad BRD de la familia BET resulta imprescindible en pluripotencia y en las etapas finales de la reprogramación durante la transición pre-iPSC a iPSC. A nivel molecular, por medio de aproximaciones ómicas y análisis bioinformáticos, identificamos que la ausencia de actividad BRD de BET afecta a los procesos de estabilidad genómica, organización de la cromatina y control de la expresión génica que participan en la adquisición de pluripotencia. Finalmente, mediante aproximaciones de ganancia y pérdida de función hallamos funciones no redundantes e incluso opuestas de cada uno de los miembros de la familia BET que intervienen en reprogramación y pluripotencia. De manera colectiva, nuestros resultados proporcionan un conocimiento más a fondo de las dinámicas nucleares que tienen lugar en un contexto de reprogramación y pluripotencia, y contribuyen a un mejor entendimiento de las vías moleculares que preservan la identidad celular. Además, la manipulación de los mecanismos identificados en los que participa la actividad BRD de BET tiene el potencial de facilitar la generación de iPSCs de una manera más eficiente y segura.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. INTRODUCCIÓN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.1 EXORDIO

Uno de los avances más fascinantes en las últimas décadas es la posibilidad de manipular los programas celulares de diferenciación para generar cualquier célula deseada, lo que representa una gran esperanza con fines terapéuticos. Probablemente, el descubrimiento más llamativo a este respecto fue el realizado en 2006 por el Dr. Shinya Yamanaka cuando demostró que es posible reprogramar células diferenciadas hacia células pluripotentes inducidas (iPSCs), las cuales son muy similares a las células troncales embrionarias (ESCs). Por medio de la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción (OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC) las células diferenciadas pueden ser reprogramadas y adquirir el estado celular pluripotente, que se caracteriza por un potencial ilimitado de autorrenovación y capacidad de dar lugar a cualquiera de los tipos celulares presentes en un organismo adulto. Así, no es de extrañar que la comunidad científica haya dedicado un gran esfuerzo en tratar de entender los programas moleculares que intervienen y determinan la adquisición de pluripotencia durante el proceso de reprogramación celular somática (SCR). Sin embargo, a pesar de los grandes avances realizados desde el descubrimiento de las iPSCs, todavía existen varios retos actuales que necesitan ser resueltos para poder hacer realidad totas las expectativas generadas en torno a esta poderosa tecnología. Esto se debe en gran parte a que todavía no se conocen en profundidad los programas moleculares que gobiernan este complejo proceso de reprogramación de una identidad celular diferenciada en una pluripotente. Motivados por esto, en esta tesis doctoral nos propusimos esclarecer el papel casi desconocido del reconocimiento de la acetilación en residuos de lisina (Kac) durante la SCR y en la pluripotencia una vez establecida. En concreto, abordamos mediante una gran variedad de aproximaciones moleculares y celulares cuál sería la función o funciones del reconocimiento en residuos Kac por los bromodominios (BRDs), los únicos dominios proteicos conocidos con capacidad de interpretar esta modificación epigenética.

En las siguientes secciones y con el fin de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, se introducirá de manera simple y concisa el estado del arte relacionado con la meta de estudio de esta tesis doctoral.

2.2 EL ESTADO CELULAR PLURIPOTENTE

En mamíferos, la pluripotencia es un estado celular que existe de manera transitoria durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. En condiciones de cultivo celular, las células pluripotentes (PSCs, por sus siglas en inglés) incluyen a las células troncales embrionarias (ESCs, por sus siglas en inglés) y las células pluripotentes inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés). Debido a que las PSCs poseen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente en cultivo y la habilidad de diferenciarse a cualquier tipo celular que forma parte de un organismo adulto (**Figura I1**), representan una prometedora herramienta para la medicina regenerativa entre otros fines.

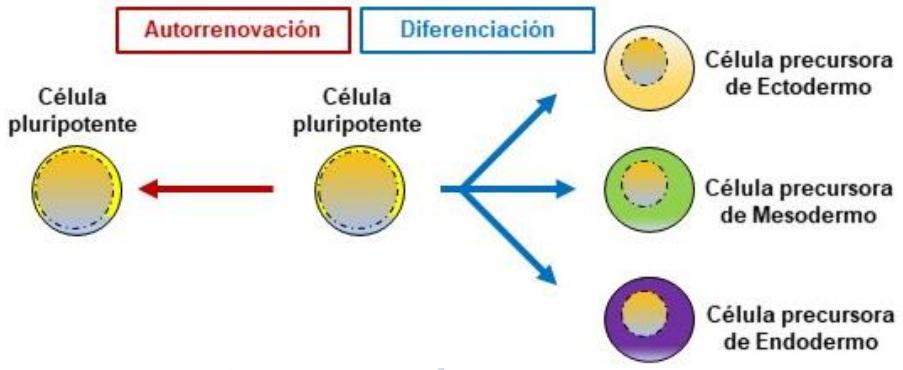


Figura I1. Características principales de las PSCs. Esquema simplificado en el que se muestran las principales características de las PSCs. Cada PSC individual puede dar lugar a otra célula idéntica mediante división simétrica (autorrenovación) y posee la habilidad a su vez, mediante división asimétrica, de dar lugar a células precursoras de cada una de las tres capas germinales que se corresponden con ectodermo, mesodermo y endodermo (diferenciación).

A continuación, se abordará de manera breve el conocimiento actual de los mecanismos moleculares gobernando el estado celular pluripotente y se encuentran estrechamente relacionados con este trabajo de tesis doctoral. Esta sección versará sobre la pluripotencia murina por ser el modelo de estudio escogido para abordar qué funciones desempeñan las proteínas que contienen BRDs en reprogramación y pluripotencia.

2.2.1 Las etapas tempranas del desarrollo embrionario

Tras la fecundación, la formación y división del zigoto se produce la activación del programa transcripcional embrionario (**Figura I2**). Esta activación del programa embrionario ocurre en ratón el día 1.5 post-fertilización, en el estado celular de dos células (2C) [1,2]. En sentido estricto, las 2C son totipotentes o, lo que es lo mismo, capaces de dar lugar a cualquier célula precursora de las tres capas germinales del embrión y a todas las estructuras extraembrionarias necesarias para el desarrollo del mismo [1-3].

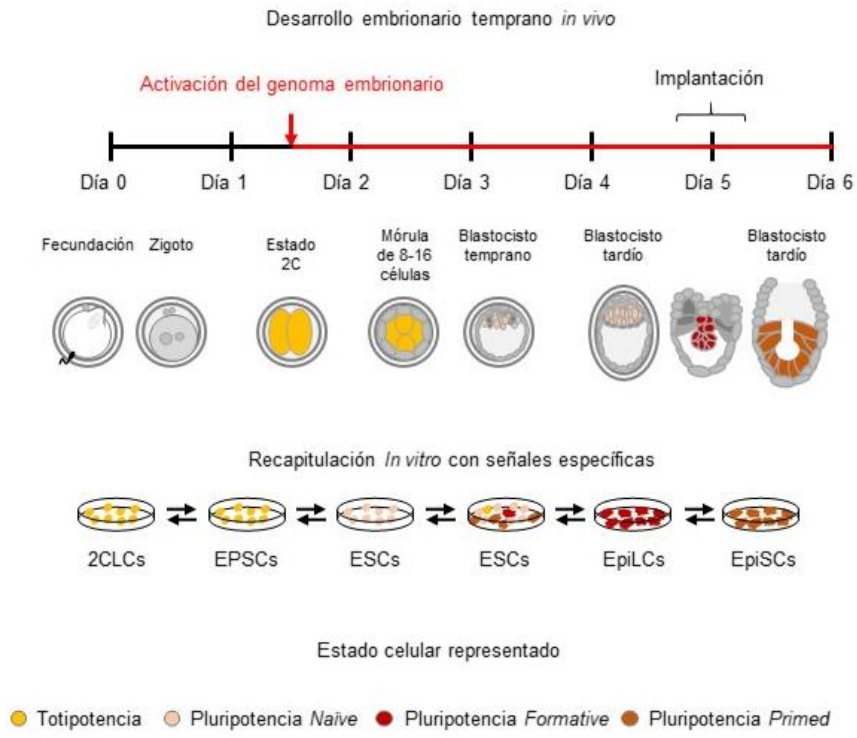


Figura I2. Etapas tempranas del desarrollo embrionario. Simplificación esquemática mostrando las etapas del desarrollo embrionario temprano en ratón (arriba) y respectiva recapitulación de tipo celulares *in vitro* (centro) e interconversión en ellos (flechas) mediante cultivo en medios específicos. El código de color (abajo) representa el estado de pluripotencia en el que se encuentran las células resaltadas durante el desarrollo *in vivo* (arriba) o de la recapitulación del estado *in vitro* (abajo).

En la etapa comprendida entre 2,5-3,5 días post-fertilización la división, polarización y especialización celular conduce a la formación de una estructura multicelular hueca denominada blastocisto [2]. El blastocisto es una estructura compuesta por dos masas celulares, una dispuesta de manera externa y otra interna, formando una oquedad denominada blastocele [2]. La capa celular externa, constituida por células de trofoectodermo (TE) y denominada trofoblasto, contribuirá a las estructuras extraembrionarias necesarias para la implantación y el desarrollo embrionario posterior [2]. La masa celular interna (ICM, por sus siglas en inglés), rodeada por una capa de células del endodermo primitivo denominada hipoblasto, está formada por las células de las que se derivan las ESCs [2]. Las células de la ICM que forman el ectodermo primitivo (o embrioblasto/epiblasto), darán lugar a todos los tipos celulares que constituyen un individuo adulto incluyendo la línea germinal. Las células de la ICM en estado pre-implantacional se encuentran en un estado celular pluripotente que se ha denominado *naïve* [2,4]. A día 4 post-fertilización, se produce la implantación del blastocisto en la pared uterina mediante un intrincado proceso en el cual el blastocisto ha de salir de su capa externa (la *zona pellucida* proveniente del oocito) para yuxtaponerse y adherirse a la pared uterina, para que finalmente las células del trofoblasto invadan y reconstruyan las arterias espirales maternas asegurando el flujo sanguíneo entre madre y feto [5]. Tras la implantación, las células pluripotentes se encuentran formando el epiblasto post-implantacional, del cual se puede derivar otro tipo de célula madre troncal, denominada del epiblasto tardío (EpiSCs, por sus siglas en inglés), que se caracterizan por un estado celular pluripotente con características propias que se ha denominado *primed* [2,4,6,7]. Hoy en día, sabemos que tanto en desarrollo como en cultivo celular la pluripotencia abarca un espectro continuo de distintos estados celulares con características propias [8,9]. Por ejemplo, recientemente se ha conseguido derivar también en cultivo, además de los estados de pluripotentes *naïve* y *primed*, un estado pluripotente al que se ha denominado *formative* [8,10,11].

2.2.2 Las células troncales embrionarias

Inicialmente las ESCs de origen murino fueron derivadas de células de la ICM de blastocistos pre-implantacionales y cultivadas sobre

células sustentadoras (ej. fibroblastos irradiados) en presencia de suero [12,13]. Estudios posteriores identificaron que el factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés) era una citoquina clave para prevenir la diferenciación de las ESCs en cultivo y mantener su capacidad de autorrenovación [14-16]. Las ESCs de origen murino, al igual que la ICM de la que proceden, satisfacen todos los ensayos funcionales de pluripotencia tanto en cultivo celular como en desarrollo embrionario (ej. contribución en quimeras, transmisión en línea germinal y desarrollo de un organismo completo mediante ensayos de complementación tetraploide) y por ello se considera que representan el estado fundamental de pluripotencia (*Ground Pluripotency State*), siendo referido a veces por ciertos autores en la literatura como estado pluripotente *naïve* [4].

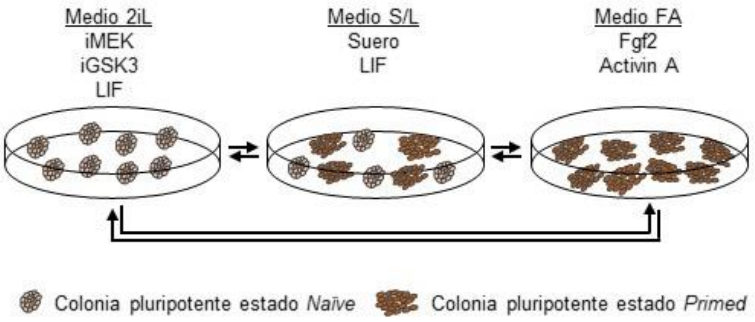


Figura I3. Medios que permiten la autorrenovación de células pluripotentes recapitulando distintos estados de pluripotencia. Esquema mostrando las condiciones de cultivo en los que se recapitula la pluripotencia de la ICM pre-implantacional (medio 2iL), la pluripotencia de las EpiSCs post-implantacional (medio FA) y el medio estándar de pluripotencia en presencia de suero (medio S/L), dónde se dan poblaciones celulares con heterogeneidad de formación de colonias pluripotentes *naïve* y *primed* entre otras poblaciones celulares.

Por otro lado, las EpiSCs tienen limitado su potencial en desarrollo embrionario, como muestra su baja contribución en ensayos de quimeras e incapacidad de generar un individuo completo mediante complementación tetraploide [7,17-20]. Por esto, se considera que las EpiSCs están en un estado de pluripotencia más avanzado en el desarrollo denominado *primed* [4,12,13,21]. Es de resaltar que las ESCs de origen humano muestran una gran similitud con las EpiSCs murinas

incluyendo la baja tasa de clonogenicidad y la dependencia de las citoquinas activina A y factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2, por sus siglas en inglés) para su mantenimiento en cultivo en vez de LIF [4].

Las ESCs murinas cultivadas en condiciones estándar, es decir en presencia de suero y LIF (referido a partir de ahora como SL), se muestran como una población heterogénea interconvertible, conformada principalmente por células con características de pluripotencia *naïve* y otras más similares al estado pluripotente *primed* [9,22] (**Figura I3**).

Recientemente, otros estados celulares minoritarios presentes en ESCs cultivadas en SL incluirían a células 2C-like (*2C-like cells*), células en estado *formative* y células del endodermo primitivo temprano o PrE [23,24]. Es importante resaltar que cada uno de estos estados celulares poseen características particulares, y a pesar del gran interés surgido en tratar de entender cada una de estas identidades celulares con gran potencial hacia la clínica todavía estamos lejos de comprender con detalle los mecanismos moleculares básicos que los gobiernan, tanto en desarrollo como en cultivo. Sin embargo, avances importantes han permitido poder estabilizar en cultivo cada una de estas poblaciones [9,10,22]. Por ejemplo, y relevante para esta tesis doctoral, el uso de dos inhibidores contra la actividad quinasa de MEK (*MAPK/ERK Kinase*) y contra la de GSKS3 (*Glycogen Syntase Kinase*) en ausencia de suero y presencia de LIF (referido a partir de aquí como medio 2iL) permite estabilizar el estado *pluripotente naïve* [4,25]. Las ESCs cultivadas en 2iL se caracterizan por un ADN hipometilado a nivel global, la expresión uniforme de factores de transcripción clave en pluripotencia (ej. *Nanog*, *Rex1* o *Stella* entre otros), y una reducida expresión de marcadores de diferenciación hacia linajes de las tres capas germinales [4,25].

2.2.3 La pluripotencia inducida

Desde el establecimiento de la técnica de transferencia nuclear de célula somática (SCNT, por sus siglas en inglés) [26,27] y los experimentos seminales de John B. Gurdon [28,29], se puso de manifiesto que células completamente diferenciadas contenían toda la información genética necesaria para dar lugar a individuos adultos clonados. Aproximaciones posteriores mostraron mediante experimentos de

fusión celular entre ESCs, tanto de origen murino como humano, y células somáticas adultas [30,31], que las células pluripotentes albergaban los componentes moleculares necesarios para reprogramar la identidad celular somática hacia un estado celular embrionario.

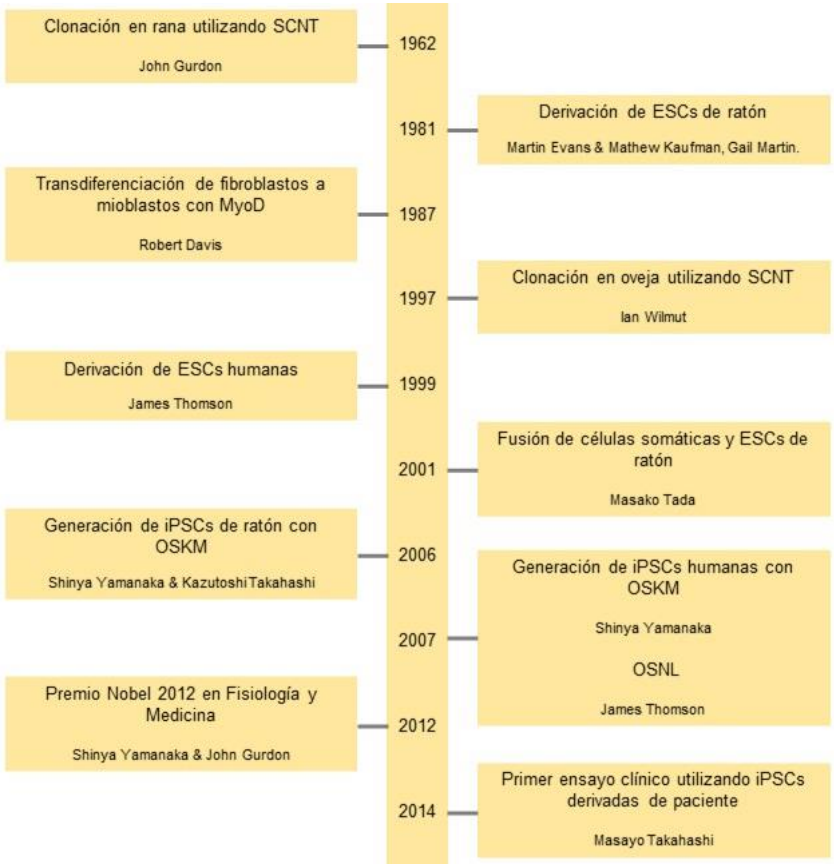


Figura I4. Principales hitos históricos relacionados con la pluripotencia inducida. Línea temporal que incluye los avances más destacables relacionados con el logro de la pluripotencia inducida por parte del grupo del Dr. Yamanaka incluyendo los trabajos seminales con la SCNT hasta el primer ensayo clínico utilizando iPSCs derivadas de paciente.

Por otro lado, se demostró que la simple expresión ectópica de factores de transcripción (TFs, por sus siglas en inglés) asociados a un tipo de linaje celular específico era suficiente para alterar el destino celular. Por ejemplo, la sobreexpresión del TF MYOD en fibroblastos

permitía la obtención de células musculares [32], y la sobreexpresión del TF mieloide C/EBP en células B facilitaba la obtención de macrófagos de manera eficiente [33,34]. De este modo, estos trabajos de transdiferenciación celular y evidencias posteriores [34-37], pusieron de manifiesto que los cambios de destino celular no están restringidos a células embrionarias ni a células procedentes del mismo linaje.

Estos conceptos de cambio de destino celular por expresión ectópica de factores de transcripción, junto al conocimiento previo de que era posible revertir células somáticas a un estado embrionario, abrieron la posibilidad de lograr la reprogramación celular somática (SCR, por sus siglas en inglés) hacia un estado celular pluripotente mediante la expresión ectópica de los factores adecuados (**Figura I4**). Así, en 2006, Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka, mostraron que era posible manipular los programas de identidad celular para lograr células con características muy similares a las ESCs. En concreto, demostraron que era posible convertir células diferenciadas adultas de origen murino (ej. fibroblastos) en células pluripotentes inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés) por medio de la simple expresión ectópica de tan sólo 4 TFs: OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC, referidos como OSKM y también llamados "factores de Yamanaka" [38]. Tan sólo un año más tarde, el grupo del Dr. Yamanaka, y de manera independiente el grupo del Dr. Thomson utilizando otra combinación de TFs (ej. OCT4, SOX2, NANOG y LIN28), reportaron la generación de iPSCs humanas [39,40]. Estos trabajos seminales, en conjunto con numerosas evidencias posteriores han puesto de manifiesto que las iPSCs son equivalentes desde un punto de vista funcional a las ESCs y, por lo tanto, son capaces de dar lugar los distintos tipos celulares que conforman un individuo adulto [41-47].

Durante estos últimos años, hemos sido testigos de diferentes aproximaciones experimentales para generar iPSCs) incluyendo distintas combinaciones de TFs y reguladores epigenéticos [48], microRNAs [49,50] e incluso mediante el uso de pequeñas moléculas químicas [51]. Además, para la posible aplicación clínica de las iPSCs, ha sido importante demostrar que la reprogramación puede ser adquirida sin la necesidad de integrar los factores de reprogramación en el

genoma de la célula o, al menos, no de manera permanente. Este tipo de aproximaciones se han logrado mediante métodos como la escisión de los factores utilizando la estrategia Cre/LoxP [52] o el sistema piggyBac [53,54], evitando la integración de los factores utilizando virus RNA no integrativos como el Sendai [55], vectores episomales [56] o transfección directa de los factores como proteína [57] o mRNA [58] **(Figura I5)**. Este rápido avance en el campo ha propiciado que podamos entender con más detalle los programas moleculares que intervienen en el complejo proceso de toma de decisiones celulares durante la SCR [39,59-62].

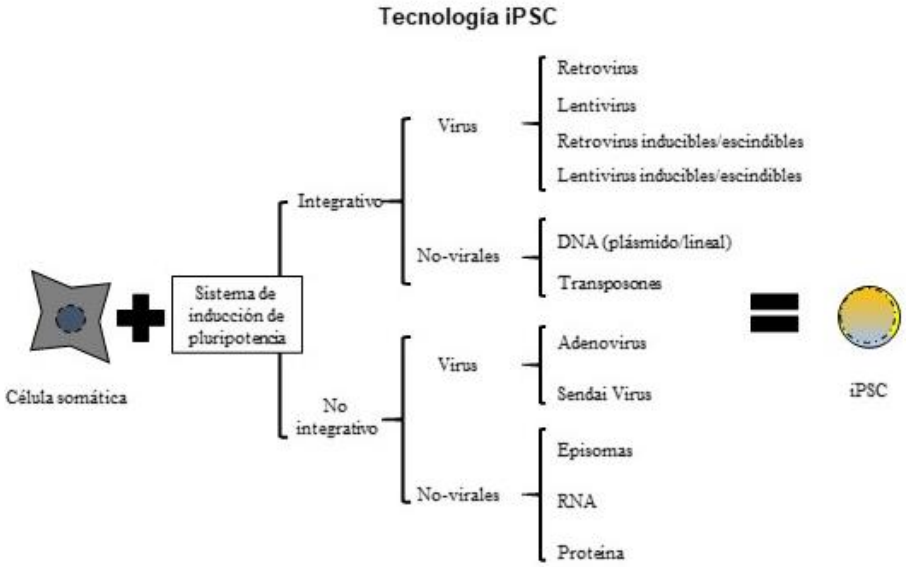


Figura I5. Aproximaciones metodológicas para la generación de iPSCs. Esquema de los distintos métodos para inducir la pluripotencia en una célula somática (ej: MEF) y obtener iPSCs con (arriba) o sin (abajo) integración de los factores de reprogramación en el genoma celular.

2.3 EL CONTROL MOLECULAR DEL ESTADO CELULAR PLURIPOTENTE

Como se ha visto, las células pluripotentes (PSCs) pueden ser aisladas de embriones en desarrollo (ej. ESCs y EpiSCs) u obtenidas mediante SCR (ej. iPSCs). La pluripotencia está gobernada principalmente por

una intrincada red cooperativa en la que se incluyen factores de transcripción (TFs) y reguladores epigenéticos que intervienen en el control de la expresión génica [9,63-65]. Sin embargo, a pesar de los grandes avances surgidos durante las dos últimas décadas, nuestro conocimiento sobre el control molecular involucrado en la adquisición, mantenimiento y salida del estado celular pluripotente dista mucho de ser completo, particularmente durante la SCR para generar iPSCs.

2.3.1 Mecanismos generales que gobiernan la pluripotencia

Hoy en día, sabemos que en el control molecular del estado celular pluripotente participan circuitos transcripcionales altamente regulados por complejas redes de interacciones proteicas con ácidos nucleicos y vías de señalización celular. Perturbaciones en los programas moleculares que gobiernan esta red de pluripotencia comprometen el paisaje transcripcional y epigenético característico del estado celular pluripotente. En esta sección, por simplicidad, se expondrá de manera breve las funciones de los principales factores de transcripción (TFs) y vías de señalización que participan en el control de pluripotencia que se encuentran estrechamente relacionados con el trabajo experimental de esta tesis doctoral. La regulación epigenética de la pluripotencia se desarrollará más ampliamente en la siguiente sección (**ver 2.3.2**) por ser el tema principal objeto de estudio de este trabajo de investigación.

2.3.1.1 Factores de transcripción centrales en la red de pluripotencia

El circuito central de la red génica de pluripotencia (**Figura I6**) está formado por los factores de transcripción OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 (*Sry box-containing gene 2*) y NANOG (*Nanog homeobox*) [25,66,67]. La expresión de *Pou5f1* (gen que codifica OCT4) se restringe a la ICM, el epiblasto tardío y las células germinales primordiales en desarrollo [68-70]. En cultivo, alteraciones en los niveles de esta proteína tanto al alza como a la baja conducen a diferenciación celular [70,71]. SOX2 es otro de los TFs clave en el mantenimiento de las PSCs así como para su diferenciación hacia neuroectodermo [71,72]. OCT4 y SOX2 forman heterodímeros que regulan

de manera cooperativa distintas dianas aguas abajo entre los que se incluyen ellos mismos, *Pou5f1* y *Sox2* [73,74]. Por su parte, NANOG es requerido para la formación del epiblasto tardío a partir de la ICM [75,76]. Es de resaltar, que la expresión constitutiva de NANOG en ESCs murinas permite la autorrenovación de éstas en ausencia de la citoquina LIF, de la que hablaremos en la siguiente sección [75,76]. OCT4, SOX2 y NANOG (OSN), ocupan simultáneamente la mayoría de sus dianas genómicas, entre las cuales se incluyen TFs esenciales en el control de pluripotencia, como ESRRB y miembros de la familia KLF (ej. KLF2 y KLF4) [77-80]. OSN también trabajan en conjunto reprimiendo la transcripción de genes específicos de linaje, impidiendo la salida de pluripotencia y diferenciación espontánea de las ESCs [81].

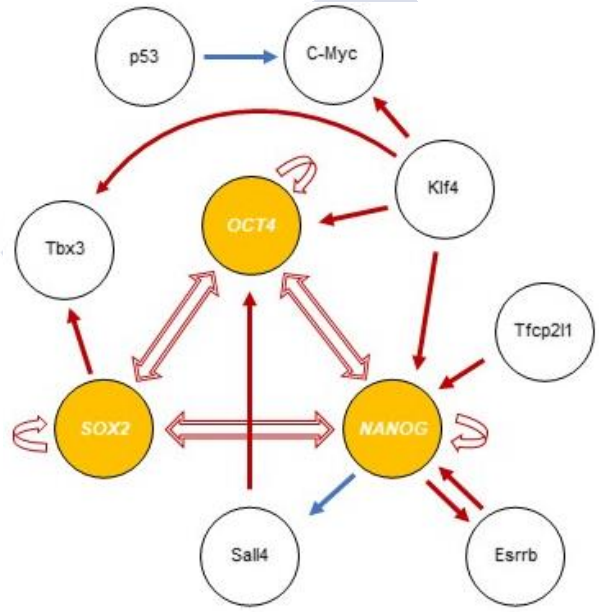


Figura I6. Red transcripcional y factores centrales en pluripotencia. Los factores centrales OCT4, SOX2 y NANOG interactúan entre ellos en un bucle de regulación y autorregulación positiva (flechas rojas vacías) y a su vez, cada uno de ellos interactúa de manera positiva (flechas rojas) o negativa (flechas azules) con otros factores de transcripción y viceversa.

Este ciclo regulatorio formado por OSN parece ser el responsable de la inducción de la expresión de genes asociados a

pluripotencia, incluyendo su propia expresión, durante la formación de iPSCs a partir de células somáticas [67,82]. c-MYC, uno de los cuatro "factores de Yamanaka", y presente en muchos de los cócteles de reprogramación utilizados hasta la fecha, parece facilitar la activación de este circuito de retroalimentación mediante la estimulación de la expresión génica y la proliferación celular, pero de forma general, no específica de genes relacionados con el estado celular pluripotente [83].

2.3.1.2 Vías de señalización

La adquisición y mantenimiento de pluripotencia requiere la activación e inhibición de múltiples vías de señalización (**Figura I7**). Como ya se ha comentado, las ESCs de origen murino fueron inicialmente derivadas en cultivo en presencia de fibroblastos irradiados y en presencia de suero, lo que proporciona al medio de cultivo citoquinas (ej, LIF, WNT y BMP4) junto con otros factores que favorecen la autorrenovación [12,13,67].

Las señales de LIF (**Figura I7**, izquierda) activan el programa genético de autorrenovación a través del factor STAT3 [84]. Entre las múltiples dianas de vía LIF-STAT3 se encuentran los factores *Klf4* y *Tfcp2l1*, cuya sobreexpresión facilita la autorrenovación de las ESCs sin necesidad de LIF [85-87] mediante la regulación al alza de la expresión del gen *Nanog*, el cual, y como hemos mencionado anteriormente, es suficiente para mantener la autorrenovación independiente de LIF cuando es sobreexpresado [87]. Asimismo, se ha demostrado que la proteína BCL-3 actúa aguas abajo de la señalización LIF-STAT3 promoviendo el mantenimiento de pluripotencia mediante su asociación con OCT4 y β-CATENINA [88].

Las señales de BMP, procedentes del suero, actúan mediante los factores de transcripción SMAD (**Figura I7**, derecha) evitando la diferenciación mediante la inhibición de genes de diferenciación [89]. El efecto de la señalización BMP parece afectar al destino neuroectodérmico mientras LIF estaría evitando la diferenciación a linajes no neuronales [25].

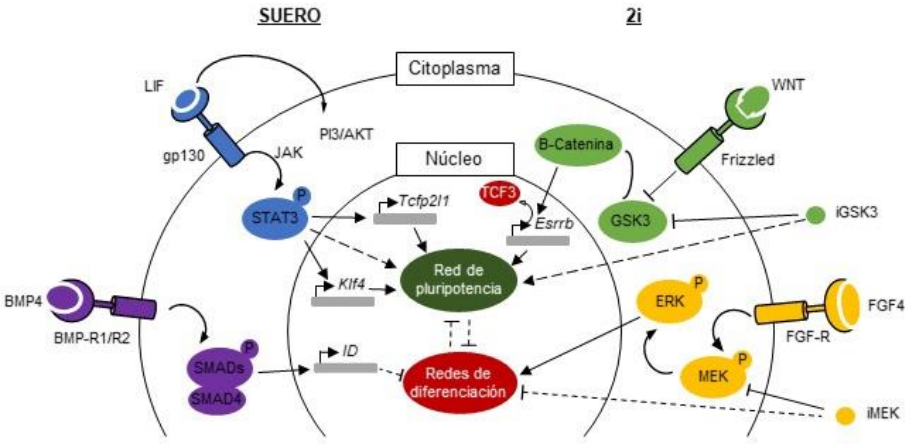


Figura I7. Rutas de señalización extrínsecas que participan en el control del estado celular pluripotente. Esquema simplificado de las principales rutas de señalización que afectan autorrenovación de las PSCs. Las flechas señalan activación y las barras inhibición o bloqueo de la actividad de la diana. Las líneas continuas implican una diana directa o conocida aguas abajo y las discontinuas indican un efecto indirecto o inferido. Desde la izquierda y en el sentido de las agujas del reloj: BMP4 está presente en suero y actúa vía SMADs para para activar genes ID. La señalización LIF afecta muchas rutas, pero actúa principalmente vía fosforilación de STAT3 mediada por JAK, activando *Tcfp2l1* y *Klf4*. La ruta WNT canónica bloquea la actividad GSK3 llevando a la estabilización de B-Catenina, que a su vez anula la represión de genes de pluripotencia mediada por TCF3. El inhibidor de GSK3 CHIR99021 imita fielmente la señalización WNT mediante la inhibición de GSK3. La señalización FGF active la ruta de las MAPK, llevando a la fosforilación de MEK, el cual fosforila y active ERK. ERK activado promueve la transición a un estado pluripotente *primed*, el cual se ve bloqueado mediante el uso del inhibidor de MEK PD0325901.

La presencia de estos factores en el medio de cultivo hace que las ESCs integren señales de las rutas LIF-STAT3 y BMP-SMAD, mostrando un estado celular heterogéneo en cultivo debido a la competición con la vía FGF4-ERK, que promueve la diferenciación celular [90,91].

También es posible mantener la pluripotencia de las PSCs en un estado homogéneo mediante la inhibición dual (2i) de las vías de señalización de las quinasas MEK/ERK y GSK3 mediante el uso de las

pequeñas moléculas PD0325901 y CHIR99021 (**Figura I7**, derecha), respectivamente [92]. Las ESCs mantenidas en este medio libre de suero en presencia de 2i contribuyen a la formación de quimeras y transmisión a la línea germinal y se asemejan a las células pluripotentes del estado *naïve* de la ICM embrionaria a nivel transcriptómico [92-94]. La inhibición dual de MEK/ERK y GSK, entre otras cosas, permite la estabilización de los niveles de KLF2 que resulta esencial para la pluripotencia *naïve* [79]. Además, ERK también fosforila NANOG, reduciendo su actividad y estabilidad [95], por lo que su inhibición mantiene la actividad de este TF clave [25].

2.3.2 Regulación epigenética de la pluripotencia

De manera general, la regulación epigenética puede definirse como los cambios fenotípicos, muchas veces heredables, producidos sin alteraciones en la secuencia de ADN (genotípicos). Estos cambios son mediados por una gran variedad de reguladores epigenéticos involucrados en modificaciones químicas sobre histonas y moléculas de ADN y ARN, así como por variantes de histonas y por ARNs no codificantes entre otros [96-98]. El desarrollo, la especificación y el mantenimiento de destino celular requieren una fina coordinación entre factores de transcripción y las modificaciones químicas epigenéticas subyacentes que forman en conjunto el epigenoma celular. [99]. La estructura, dinámica y función de la cromatina de células pluripotentes (PSCs) es distinta a la de las células diferenciadas [100]. La cromatina de las PSCs se encuentra activa, en una conformación abierta, con un ADN menos metilado a nivel global y presencia de un patrón de modificaciones en histonas muy particular. Estas características epigenéticas distintivas resultan en una cromatina más abierta, en un estado más plástico y dinámico, lo que contribuye a mantener su potencial de diferenciación [100-103]. Es importante resaltar la conservación de la preservación de estas características generales a nivel epigenético entre ESCs e iPSCs de origen murino y humano al ser comparadas con células diferenciadas.

2.3.2.1 Reguladores epigenéticos

La regulación de la expresión génica se lleva a cabo mediante la colaboración de TFs que se unen a motivos específicos en el ADN dentro de promotores y potenciadores (o *enhancers*) que, en trabajo conjunto con los reguladores epigenéticos lleva a la activación o represión de los genes diana [104]. Entre estos reguladores epigenéticos, nos encontramos factores que determinan el estado químico del epigenoma, ya que regulan la adición de la marca epigenética, la reconocen e interpretan y la retiran. Respectivamente y de manera general, nos referimos a estas proteínas epigenéticas como "escritoras" (*writers*), "lectoras" (*readers*) y "borradoras" (*erasers*) (**Figura I8**), [96-98]. Estos reguladores epigenéticos controlan el paisaje transcripcional específico de cada tipo celular mediante la deposición o retirada de modificaciones químicas reversibles sobre el ADN/ARN u otras proteínas como las histonas.

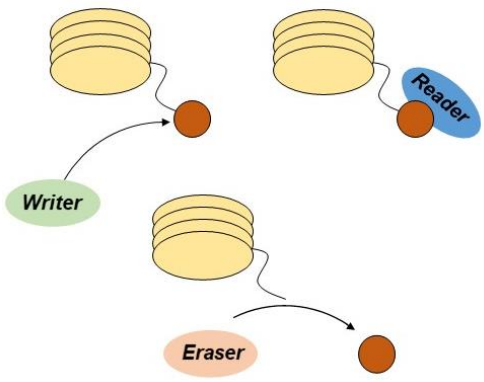


Figura I8. Factores epigenéticos y dinámica de establecimiento e interpretación del epigenoma. Esquema representativo ejemplificando modificaciones químicas (círculos ocres) sobre las colas de las histonas. La adición de marca es catalizada por las "escritoras" (globo verde) y su retirada por las "borradoras" (globo rosa). La interpretación de las modificaciones es llevada a cabo por las "lectoras" (globo azul).

Gran parte del efecto que presentan OCT4, SOX2 y NANOG sobre la modulación de la expresión génica se debe a su capacidad de interactuar y responder a reguladores epigenéticos [105,106] (**Figura I9**), entre los que se incluyen los complejos remodeladores de cromatina NuRD [106], SWI/SNF e ISWI [107] o TIP60-P400 [108,109] y los complejos Mediator asociados a los potenciadores de la transcripción [110].

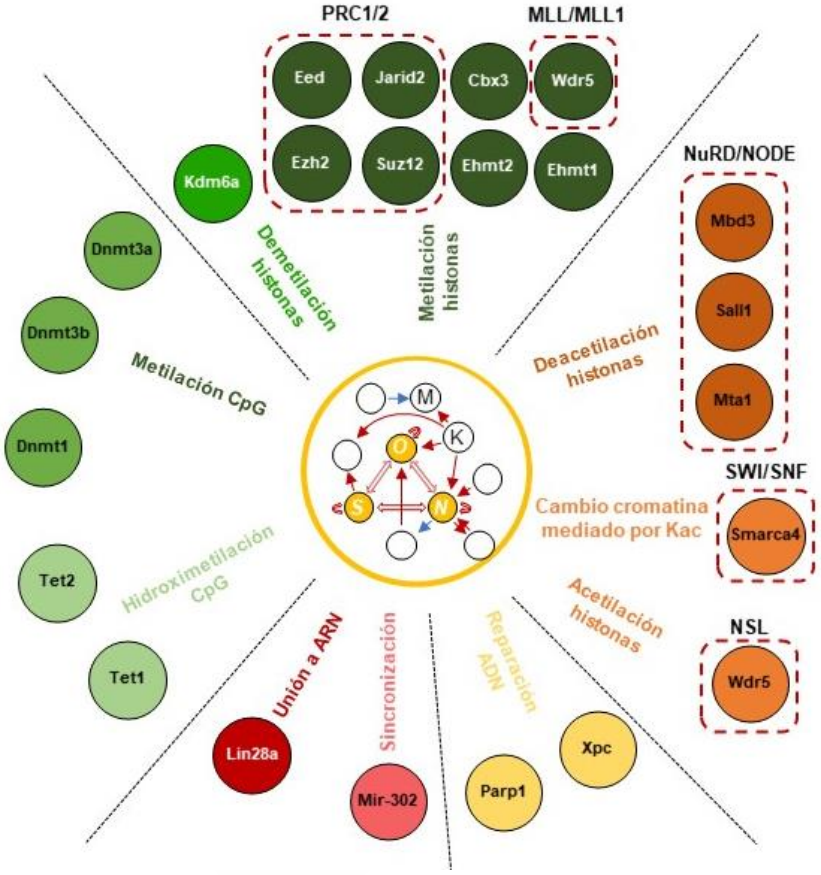


Figura I9. Principales interacciones entre la circuitería de transcripción central y reguladores epigenéticos. Principales factores epigenéticos (círculos de colores) interactuando con la red de transcripción central de pluripotencia (círculo amarillo central). El punteado rojo resalta los reguladores epigenéticos formando parte de los complejos explicitados. Las funciones más destacadas están resaltadas en color concordante a los factores. Colores pardos: factores relacionados con la acetilación de histonas; colores verdes: factores relacionados con la metilación de histonas y ácidos nucleicos.

Otros reguladores epigenéticos con funciones relevantes en el control del estado celular de la pluripotencia son los modificadores de histonas [64], como las deacetilasas de histonas (HDACs) [64,111], y las metiltransferasas de histonas (ej. SETDB1 y WDR5) [112], las proteínas MLL (SET1A/B) [64], la familia de demetilasas con dominio Jumonji C

(JMJC) [64] y los complejos Polycomb 1 y 2 (PRC1 y PRC2) que son esenciales tanto en el desarrollo embrionario temprano [64,113,114] como en el control adecuado de los programas de diferenciación [64,113,115].

2.3.2.2 Metilación en células pluripotentes

Existen diferencias claras y destacadas en el metiloma de las células pluripotentes y las somáticas. Por ejemplo, la cromatina de las ESCs muestra un mayor grado de marcas activadoras en las histonas (ej. H3K4me3) y un ADN globalmente hipometilado [116-118]. Esto sugiere una asociación hiperdinámica de las proteínas de la cromatina, reflejando la plasticidad del genoma pluripotente [103]. En las células diferenciadas la cromatina se presenta en una conformación más cerrada, menos activa y con marcas represivas en las histonas (ej. H3K27me3 y H3K9me3), alrededor de las cuales se empaqueta un ADN hipermetilado en los genes asociados con la pluripotencia.

La metilación del ADN es, de lejos, la modificación epigenética más estudiada hasta la fecha e implica la modificación dinámica y heredable de la propia molécula de ADN [64]. La adición de un grupo metilo en la quinta posición de un residuo de citosina (5mC) es una marca epigenética bien caracterizada con importantes funciones durante el desarrollo mamífero [64]. Las regiones con dinucleótidos CpG están enriquecidas en 5mC, pero la marca escasea en regiones de alta densidad CpG o "islas CpG" [64,119]. Sin embargo, aproximadamente el 25% de los lugares de 5mC en ESCs humanas se encuentran en otras disposiciones, sugiriendo la existencia de mecanismos de metilación alternativos exclusivos de ESCs [120-122].

Los patrones de metilación del ADN suelen asociarse a represión de la expresión génica [64]. La dinámica de la 5mC (**Figura I10**) viene marcada por las acciones de las metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B [64]. La demetilación activa es mediada principalmente por las enzimas TET (TET1, TET2 y TET3) que catalizan la oxidación de 5mC a 5hmC y sus intermediarios/subproductos [123]. El genoma de la PSCs se encuentra hipometilado a nivel global en comparación con el genoma de las

células somáticas [64,116,118,124-126]. TET1 y TET2 son las principales demetilasas de ADN que participan en el control de la pluripotencia [64,127 128,129], aunque se ha reportado que ejercen funciones específicas [130].

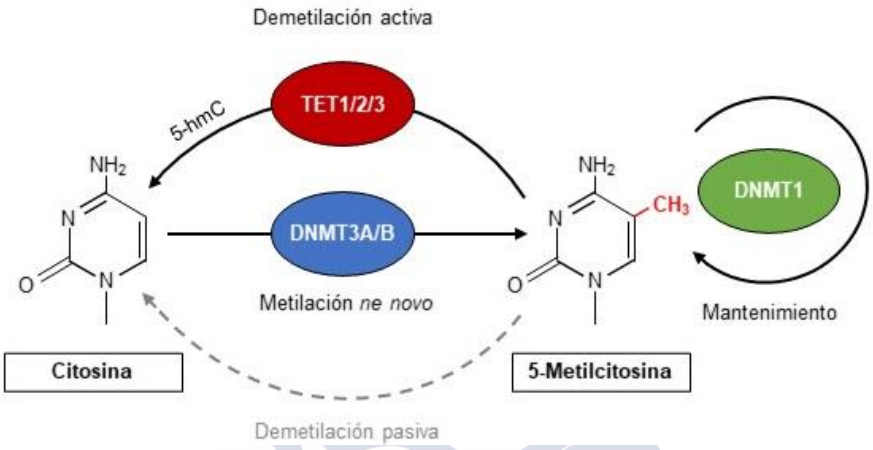


Figura I10. Factores epigenéticos principales en la metilación del ADN. En eucariotas, la deposición del grupo metilo en el quinto carbono de las citosinas es catalizada por DNMT3A y DNMT3B (flecha recta). Los patrones de metilación introducidos son preservados por DNMT1 durante la replicación. Se considera que la demetilación pasiva (curva de puntos) ocurre durante las divisiones celulares en ausencia de DNMT1. La retirada activa mediante oxidación (o hidroximetilación) de la marca (flecha curvada) es llevada a cabo en mamíferos por la familia de proteínas TET, que convierten la 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina.

En cuanto a la metilación en histonas (**Figura I11**), cabe destacar que en ESCs las marcas H3K4me3 (asociada con cromatina transcripcionalmente activa) y H3K27me3 (reguladora a la baja de la transcripción) suelen encontrarse en los mismos promotores, operando como una "marca bivalente" que parece presentarse en genes clave en desarrollo [131,132] manteniéndolos preparados para activarse mediante su asociación con la forma transcripcionalmente competente (fosforilada en serina 5) de la RNAPolII [133-135].

En definitiva, las células pluripotentes presentan una mayor proporción de eucromatina que las células diferenciadas [100] y ésta se presenta en distintas regiones [136]. La formación de eucromatina incluye

la metilación de las lisinas 4 y 79 de la histona H3 [137,138], en cooperación con otros eventos epigenéticos que incluyen el cambio de la histona H2A por la H2A.Z [139], y la acetilación de la lisina 16 en la histona 4 [140]. Además, cabe destacar que los cuerpos génicos de las regiones transcripcionalmente activas están enriquecidos en la marca H3K36me3 [141], ligada con la elongación transcripcional [142].

2.3.2.2 Acetilación de histonas

Entre las principales y más estudiadas modificaciones post-traduccionales (PTMs) epigenéticas en eucariotas encontramos la acetilación en residuos de lisina (Kac) en las colas de las histonas [143] (**Figura I12**). La Kac en histonas desempeña un papel clave tanto en la remodelación de la cromatina como en la transcripción [144-146] y resulta esencial en el control del metabolismo y la señalización celular [147-149]. La Kac en las colas de histonas neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina afectando a las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA, la estabilidad y localización subcelular de las proteínas [150]. Generalmente la Kac de histonas está asociada con el establecimiento de eucromatina y, por tanto, con activación transcripcional [150]. Hace años se demostró *in vitro* que los nucleosomas hiperacetilados mostraban una reparación mayor del ADN que los menos acetilados [151] y actualmente ya se han establecido distintos mecanismos relacionadas con vías de reparación y estabilidad del ADN regulados por acetilación [152-155]. Normalmente, los lugares de comienzo de transcripción y los potenciadores activos, tanto clásicos como superpotenciadores (conocidos como "*superenhancers*" en inglés) presentan la marca de acetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac) [156,157]. Las ESCs muestran niveles elevados de acetilación en los residuos de lisina 9 y 14 de la histona H3 (H3K9ac y H3K14ac) que disminuyen durante la diferenciación celular [158-161].

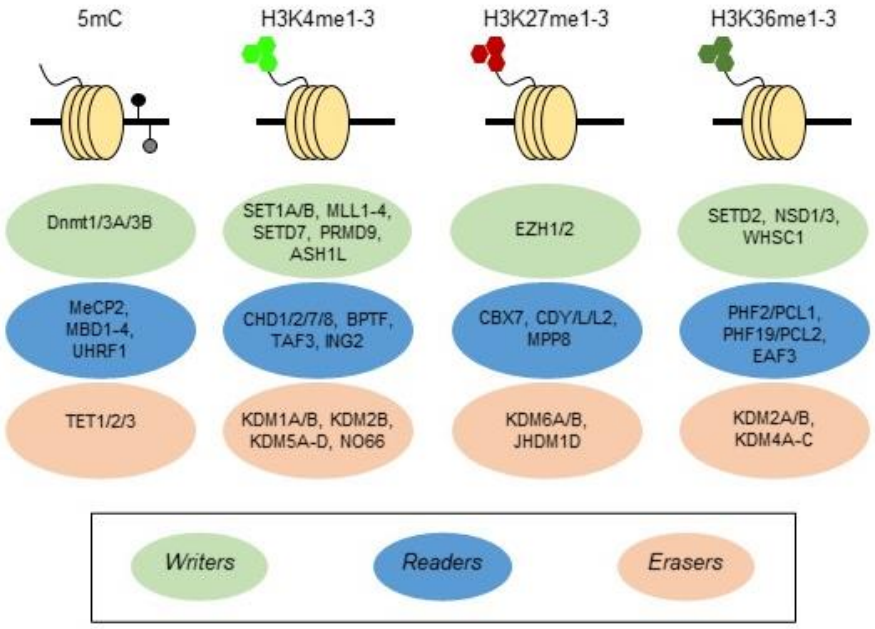


Figura I11. Proteínas involucradas en la regulación de los niveles de marcas de metilación importantes en el estado celular pluripotente. Los niveles globales de las marcas explicitadas (arriba) vienen dados por el juego dinámico entre los reguladores epigenéticos que las depositan ("*writers*"), las retiran ("*erasers*") y las interpretan ("*readers*").

La Kac de histonas está catalizada por las acetiltransferasas de histonas (HATs o KATs, por sus siglas en inglés) y retiradas por las deacetilasas de lisinas de histonas (HDACs o KDACS, *por sus siglas en inglés*) (**Figura I12**). Estas encimas actúan como coactivadores o correpresores esenciales durante la generación de iPSCs, bien manteniendo el estado somático o bien ayudando al establecimiento de pluripotencia inducida por factores de transcripción [60]. Estos factores, acetiltransferasas y deacetilasas, son respectivamente los "*writers*" y "*erasers*" de la acetilación de histonas, regulando los niveles de acetilación a nivel celular. Las proteínas epigenéticas "lectoras" (*readers*) de la acetilación son las proteínas que contienen dominios proteicos denominados bromodominios (BRDs) de los que hablaremos

más adelante con más detalle, por ser el objetivo principal de estudio en esta tesis doctoral (ver apartado **2.5**).

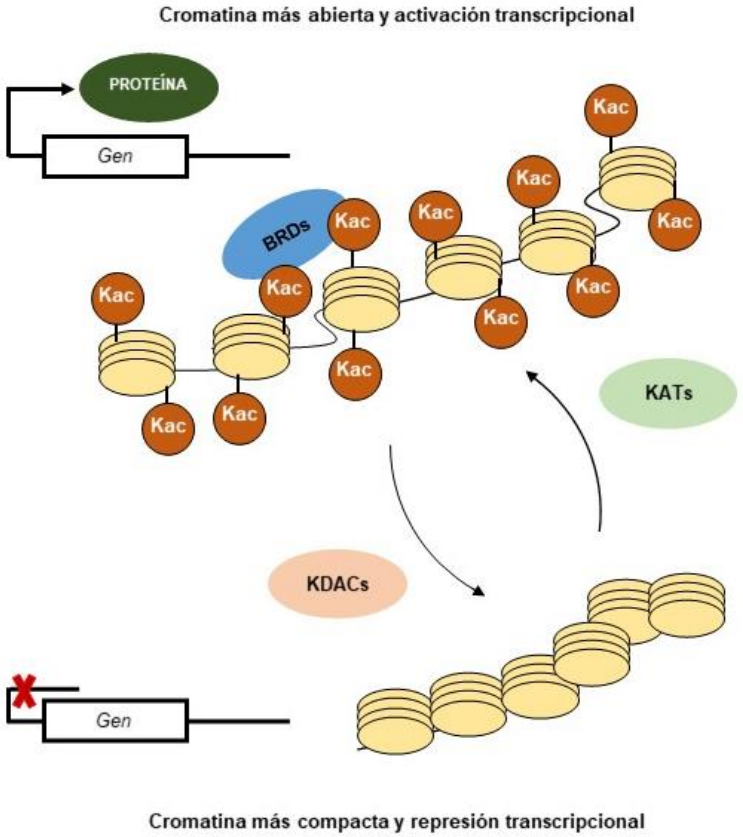


Figura I12. Esquema de la dinámica de la conformación de la cromatina de acuerdo con el balance entre las actividades KATs/KDACs. Nos niveles de acetilación de las colas nucleosomales en residuos de lisina (Kac) vienen determinados por la interacción dinámica que establecen KATs y KDACs, estableciendo las primeras una conformación más abierta y permisible a la transcripción de la cromatina, mientras las segundas hacen todo lo contrario al retirar la marca.

2.3.3 Estudio de la química epigenética de la acetilación de histonas

La primera caracterización molecular de las KDACs [162] y KATs [144] como reguladores transcripcionales marcó la era moderna del estudio epigenético de la acetilación de histonas. El trabajo en esta área ha

resultado en la aprobación de cinco inhibidores de KDACs para el tratamiento del cáncer, especialmente linfoma de células T [163].

Compilaciones y sumarios que incluyen detalles mecanísticos de la enzimática de la acetilación y deacetilación (**Figura I13**) pueden ser encontrados en detalle en varios trabajos de revisión [145,164-168].

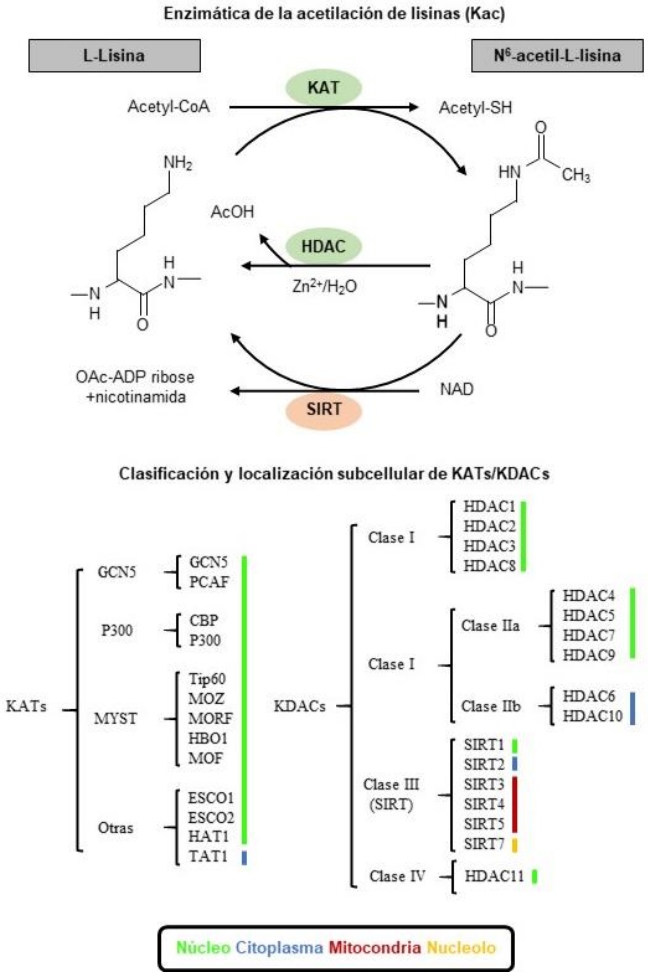


Figura I13. Dinámica de la acetilación de histonas. Esquema representando la enzimática de la acetilación de lisinas (arriba) y clasificación de los enzimas involucrados en los niveles de esta marca en las colas de las histonas (abajo) y su localización subcelular (código de colores).

Debido a la importancia que esta marca epigenética (Kac) tiene en el control transcripcional, se han hecho muchos esfuerzos en investigar el papel de la química enzimática de la acetilación en pluripotencia, principalmente mediante el uso de inhibidores de HDACs [169,170]. Sin embargo, el papel del reconocimiento de la acetilación por las proteínas que contienen BRDs ha sido comparativamente hablando menos explorado y muchas cuestiones clave sobre su relevancia en el control del estado celular pluripotente aguardan por ser aclaradas.

2.4 La inducción de pluripotencia mediada por factores de transcripción

La aplicabilidad universal de los cuatros factores de transcripción OSKM ("factores de Yamanaka") para obtener iPSCs se ha demostrado en múltiples especies a partir de diversos tipos celulares somáticos, principalmente fibroblastos [171]. Así, aunque existen otras combinaciones de TFs solos o en combinación con reguladores epigenéticos y/o pequeñas moléculas que resultan útiles para generar iPSCs [172-174], no es de extrañar que la reprogramación celular somática (SRC) por medio de OSKM siga siendo la aproximación más utilizada por la comunidad científica tanto para fines de investigación básica como traslacionales [175].

2.4.1 Trayectorias celulares durante la reprogramación celular somática

Numerosas evidencias han puesto de manifiesto que la SCR para la obtención de iPSCs es un proceso lento e ineficiente que conlleva numerosos cambios en identidad celular. Así, en base a distintas caracterizaciones moleculares durante el proceso de generación de iPSCs se ha identificado la existencia de distintas trayectorias celulares que dan lugar a tipos celulares que son "permisivos" a una reprogramación exitosa y otros tipos celulares que resultan "refractarios" para la inducción de pluripotencia [38,175-182] (**Figura I14**). Por ejemplo, durante la generación de iPSCs mediada por OSKM a partir de células mesenquimales (ej. fibroblastos) se produce en primer lugar una transición mesenquimal-epitelial (MET, por sus siglas en inglés) que se caracteriza por un aumento de la proliferación celular y

el cambio de identidad celular mesenquimal a un tipo celular "permisivo" con características epiteliales [183-189]. Sin embargo, en esta etapa inicial de la SCR también se originan intermediarios celulares que son "refractarios" a continuar el proceso de reprogramación originando un estado celular denominado estromal caracterizado por una extensa reorganización de la matriz extracelular, senescencia y fenotipo secretorio, además de aberraciones genómicas [179].

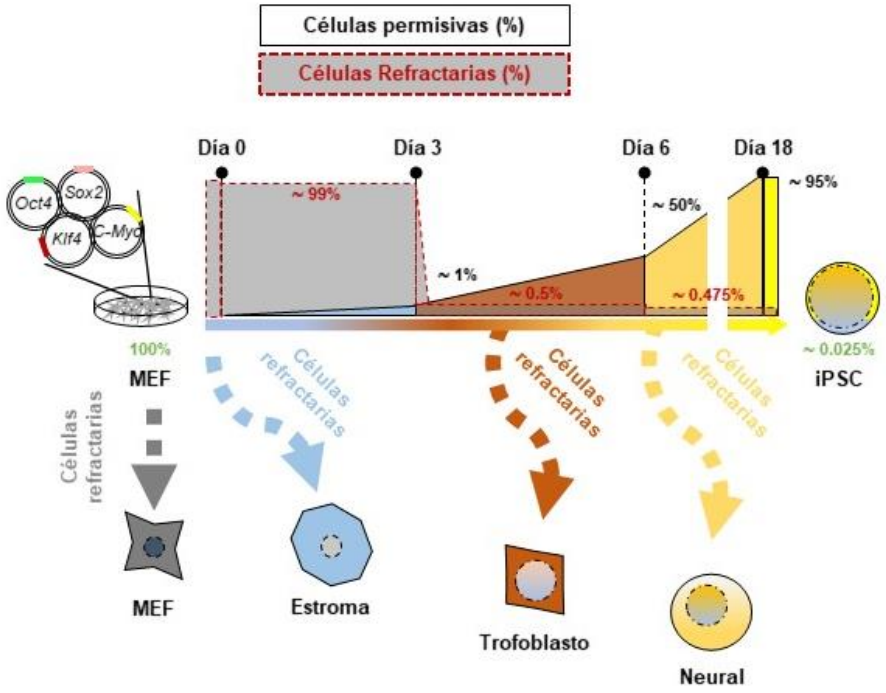


Figura I14. Esquema de las distintas trayectorias celulares durante la reprogramación celular somática de MEFs. Tras la inducción de SCR con OSKM, existen poblaciones celulares refractarias (~99% del total poblacional) que mantienen (flecha gris) o despliegan (flecha azul) un programa transcripcional mesenquimal. Del pequeño porcentaje (~1% inicial) de células permisivas para superar esta primera etapa, la mitad despliegan un programa transcripcional trofoblástico (flecha parda) y la otra mitad superan esta etapa. Existe una última población refractaria muy minoritaria (~0.475%) que despliega un programa transcripcional neural muy indiferenciado (línea crema), y la población celular que llega hasta esta etapa presenta ~95% de células permisivas que completan la SCR y

acaban formando iPSCs. La población de iPSCs obtenida representa ~0.025% de la población inicial de MEFs.

Esta etapa inicial de la SCR que constituye la MET supone uno de los principales cuellos de botella para alcanzar el estado celular pluripotente. Por otro lado, sólo un pequeño porcentaje de células que alcanzan la MET albergan el potencial de generar células pluripotentes transitando por una segunda etapa permisiva denominada de maduración caracterizada principalmente por la reactivación de la expresión de genes asociados con pluripotencia [179,190-192].

Por otro lado, se ha caracterizado que incluso durante esta segunda etapa de la SCR a pesar de activarse reguladores clave del estado celular pluripotente, existen otros intermediaros de reprogramación "refractarios" a generar iPSCs entre los que se encuentran tipos celulares con características trofoblásticas o neuronales [179,193-196]. Finalmente, los estadios celulares parcialmente reprogramados que resultan permisivos a formar iPSCs deben de transitar por una última fase de estabilización que confiera la reactivación completa de los programas moleculares endógenos que sostienen el estado celular pluripotente en ausencia de los factores exógenos de reprogramación (ej. OSKM) [179,196].

2.4.2 Mecanismos moleculares en la formación de iPSCs

En esta sección se abordará de manera breve los principales cambios a nivel transcripcional que ocurren durante la generación de iPSCs mediada por OSKM a partir de células mesenquimales (ej. fibroblastos), lo que nos facilitará el poder adentrarnos en los mecanismos epigenéticos que resultan claves durante la SCR (ver sección **2.4.3**)

2.4.2.1 Silenciamiento del programa somático

Durante la primera fase de la reprogramación somática (SCR) se produce el silenciamiento de los programas transcripcionales somáticos como consecuencia entre otras causas moleculares de la pérdida de accesibilidad de reguladores que median la activación de genes que codifican para proteínas que gobiernan la identidad celular

somática [197-199]. Además, se ha mostrado que los TFs OCT4, SOX2 y KLF4 participan de manera colaborativa en el silenciamiento de estos genes "somáticos" [200]. En particular, estos TFs junto con cMYC median el proceso de reprogramación participando tanto en el reclutamiento de represores transcripcionales (ej. HDAC1) como en el desplazamiento de otros TFs de las regiones potenciadoras ("*enhancers*" en inglés) que regulan la activación de la transcripción somática [175,197-202].

2.4.2.2 Activación del programa pluripotente

La activación de los genes que median el conocido como programa pluripotente es considerada, de manera general, un proceso estocástico y que resulta limitante para la formación de iPSCs [175]. Existen barreras en este proceso (**Figura I15**) que pasan por la imposibilidad de los factores de reprogramación de acceder a determinadas regiones genómicas y la unión insuficiente de estos para inducir la activación génica en ausencia de coactivadores críticos [175].

A pesar de que existen regiones refractarias para los factores de transcripción, algunos estudios apuntan a que la unión temprana de OSK y en menor grado cMYC, se produce preferentemente en elementos regulatorios genómicos que favorecen la accesibilidad de otros factores y cofactores transcripcionales que resultan claves en la activación de los genes "pluripotentes" [198,201]. Esta capacidad de unión depende de la habilidad de estos TFs de actuar como pioneros y ser capaces de reconocimiento parcial de motivos específicos en la cromatina [201,203]. En concreto, se ha postulado su alta afinidad por secuencias en el ADN que se encuentran metiladas y su capacidad de establecer bucles sinérgicos entre ellos [175,200,201,204]. Este efecto sinérgico de OSKM y también con otros reguladores de pluripotencia que se activan más tarde durante la SCR, como ESRRB o NANOG, resulta en un paso que limita la velocidad del proceso y que puede verse favorecido mediante la expresión forzada de estos factores [200,205]. Mientras que se encuentra bien documentado que OSKM pueden actuar en ESCs como activadores en *trans*, su actividad durante la SCR es probable que sea dependiente de contexto celular, por lo que su unión

cooperativa temprana no significa activación inmediata de los genes diana [175].

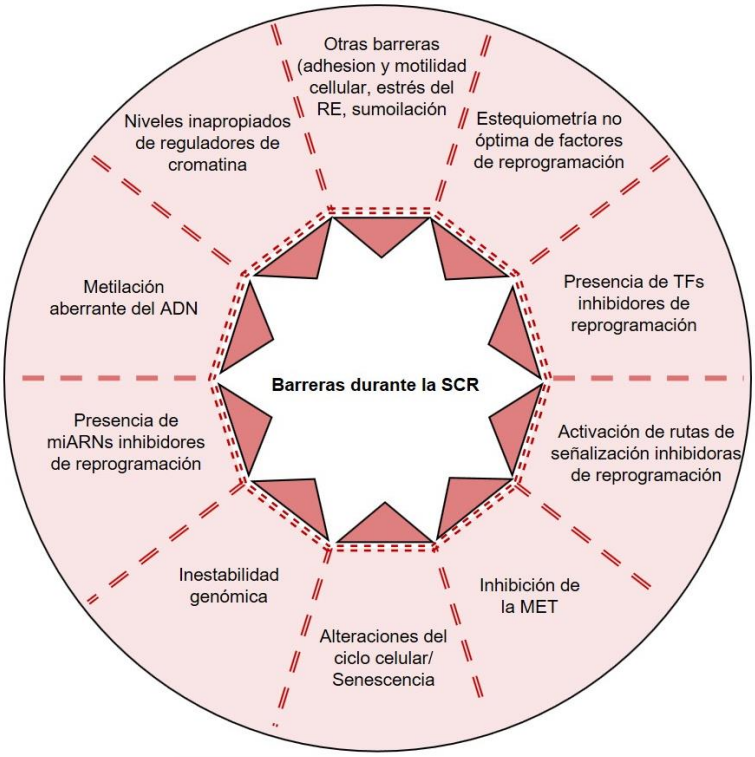


Figura I15. Principales barreras en la generación de iPSCs. Diagrama mostrando las principales barreras moleculares que se presentan durante la SCR, las células que superan todas estas barreras activan la red de pluripotencia endógena y acaban formando iPSCs.

2.4.2.3 Reorganización de la estructura de la cromatina.

El papel a nivel de la configuración de la cromatina que ejercen los cuatro factores de reprogramación (OSKM) han sido evidenciados mediante multitud de diferentes aproximaciones experimentales que incluyen desde experimentos de pérdida de función hasta integraciones bioinformáticas de los resultados obtenidos por una amplia variedad de ensayos ómicos [206-210]. De esta forma, se ha podido demostrar que la presencia de diversas modificaciones químicas en la cromatina, como

H3K4me2 [210], preceden a los cambios conformacionales para reconfigurar la cromatina durante el proceso de SCR. Además, la adición o retira de determinadas marcas epigenéticas suele conllevar la alteración a nivel local de las propiedades biofísicas en la cromatina lo que contribuye a una reorganización global de la misma en fases que condiciona el paisaje transcripcional durante la SCR [211].

2.4.3 Reprogramación epigenética durante la inducción de pluripotencia

Los reguladores epigenéticos resultan claves en el complicado proceso de toma de decisiones moleculares que determina la identidad celular. Hasta la fecha, se han identificado tanto reguladores epigenéticos que actúan como facilitadores del proceso de SCR como otros que actúan como barreras para la obtención de células pluripotentes [212]. En este sentido, numerosas evidencias han mostrado que la inhibición de ciertos reguladores epigenéticos (ej. complejos represores con actividad deacetilasa de histonas o con actividad metilasa tanto en histonas como moléculas de ADN) puede facilitar la generación de iPSCs [201,213-217].

2.4.3.1 Control epigenético sobre el programa somático

Además de los factores de transcripción, los reguladores epigenéticos juegan papeles fundamentales en la represión del programa somático [175]. Por ejemplo, OSKM induce la activación temprana del gen que codifica *Sap30*, un componente del complejo represor SIN3A con actividad deacetilasa de histonas, que resulta importante para el silenciamiento temprano durante la SCR de genes "somáticos" [175]. Sin embargo, este mismo complejo represor SIN3A parece ser dispensable durante estadios tardíos en la formación de iPSCs [197]. En este sentido, se ha mostrado que la pérdida de la marca activadora H3K27ac por el complejo SIN3A en los potenciadores de genes somáticos resulta importante durante las etapas tempranas de la reprogramación [197,200]. Cabe destacar que la existencia de fallos en la reconfiguración parcial del epigenoma en estas etapas iniciales impiden que la SCR pueda continuar para finalmente formar iPSCs [175,218].

2.4.3.2 Epigenética y activación del programa pluripotente

Las regiones de heterocromatina represiva transcripcionalmente que se encuentran enriquecidas en metilación de residuos de lisina 9 en histona H3 (H3K9me3), donde residen genes críticos en pluripotencia [175], se han mostrado como refractarias a la unión de OSKM en los estadios tempranos de la SCR [201], apuntando a la necesidad de un remodelado previo de la cromatina para su relajación y accesibilidad [175]. En este sentido, se ha visto que ensayos de pérdida de función de las metiltransferasas de H3K9me3 (ej. G9A, SETDB1, SUV39H1 y SUV39H2) facilita la SCR a partir tanto de fibroblastos de origen humano como murino [201,219,220]. También, la pérdida de función del complejo CAF-1 facilita la relajación de la cromatina somática y aumenta la accesibilidad y unión de SOX2 a potenciadores, tanto clásicos como los conocidos como "*superenhancers"*, que resultan críticos en la activación del programa transcripcional asociado al estado celular pluripotente [216]. Por otro lado, la regulación fina de los patrones de metilación en el ADN es esencial para la activación de genes "pluripotentes", y en este sentido se ha visto que la activación forzada de las enzimas TET con actividad demetilasa facilitan la reprogramación en una manera que resulta dependiente del contexto celular [175,221]. También se han descrito otros reguladores epigenéticos que son necesarios para el papel transcripcional de OSKM entre los que se incluyen los complejos SWI/SNF, NuRD y MLL [222-224].

2.4.3.3 Impacto epigenético sobre la arquitectura de la cromatina.

Numerosas evidencias sugieren que la estructura tridimensional de la cromatina y su reorganización resulta esencial para las decisiones de destino celular (revisado en detalle en [100,225]. Aunque todavía estamos comenzando a comprender el grado de reorganización y los mecanismos y relaciones moleculares envueltos, cada cambio de identidad celular que sucede durante la SCR tiene asociada una arquitectura de la cromatina determinada [206-209,226,227]. Por ejemplo, se ha descrito que, precediendo o coincidiendo con la reescritura epigenética y cambio transcripcional en genes relacionados con la pluripotencia se producen bucles en la cromatina [206,207]. Además, se ha

caracterizado con detalle los cambios en la estructura tridimensional de la cromatina que suceden durante la SCR y su correlación con cambios transcripcionales [210], lo que apoya un papel causal de la reorganización de la cromatina sobre éstos, ya que suceden a la par o ligeramente antes del cambio en la transcripción [175]. Otros hallazgos sugieren que la remodelación inapropiada de la cromatina representa otra barrera epigenética que puede actuar como cuello de botella para el establecimiento del programa pluripotente [175].

Mientras ciertos reguladores epigenéticos salvaguardan la identidad celular somática principalmente mediante la prevención de la activación de los "genes de pluripotencia", también existen reguladores epigenéticos que participan en la arquitectura de la cromatina que salvaguardan la identidad celular mediante la perpetuación de los programas de transcripción somáticos específicos. Una cuestión importante en el tintero es qué reguladores que determinan la estructura de la cromatina contrarrestan el silenciamiento de la expresión génica específica de linaje mediado por OSKM durante la SCR.

2.4.4 Aplicaciones y retos actuales de la tecnología iPSC

Desde el trabajo original dirigido por el Dr. Yamanaka [38], hemos sido testigos de cómo la generación de iPSC ha revolucionado el campo de la pluripotencia no sólo evitando los problemas éticos asociados a la destrucción de embriones para la obtención de células pluripotentes (PSCs), sino probando que es una tecnología muy poderosa a la hora de crear nuevas oportunidades para el estudio de enfermedades humanas, descubrimiento de fármacos y medicina regenerativa entre otras (revisado en detalle en [228-230] (**Figura I16**). Por ejemplo, podríamos destacar resultados muy esperanzadores en más de cien ensayos clínicos utilizando iPSCs con fines de terapia celular regenerativa y modelado de enfermedades humanas (para más detalle, ver https://clinicaltrials.gov/). Además, el proceso de SCR conducente a la obtención de iPSCs también ha demostrado ser una aproximación muy valiosa para investigar los mecanismos moleculares involucrados en los cambios de identidad celular [216,231-235], lo que continúa siendo una de las principales preguntas abiertas en la biología moderna.

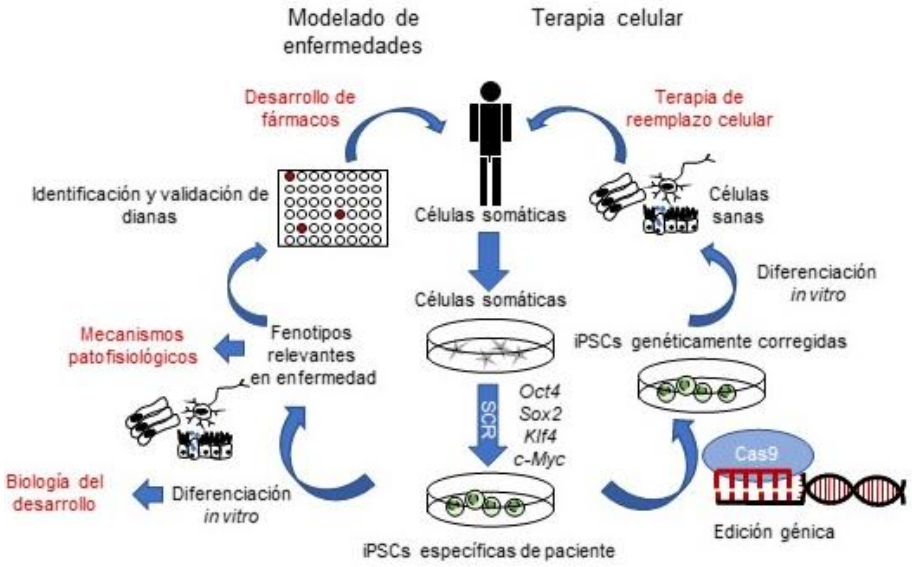


Figura I16. Principales aplicaciones de las iPSCs. Las iPSCs específicas de paciente tienen el potencial de modelar enfermedades (parte izquierda) de manera personalizada. También permiten el estudio de los mecanismos fisiopatológicos y del desarrollo de las células derivadas, así como el cribado y desarrollo de fármacos adecuados para medicina de precisión. Además, en terapia celular (parte derecha), la conjunción de la tecnología iPSC con la de edición génica, podría generar iPSCs genéticamente corregidas que, tras diferenciarse a células "sanas", podrían reimplantarse de nuevo en el paciente.

Desde una perspectiva más traslacional, uno de los grandes avances ha sido las distintas aproximaciones realizadas para lograr iPSCs sin integración en el genoma de los factores de reprogramación [52-58] (**Figura I5**).

Sin embargo, a pesar de los grandes progresos realizados a escala mundial en la reprogramación celular somática (SRC) para generar iPSCs, todavía existen grandes desafíos (ej. baja eficiencia, inestabilidad genómica, potencial tumorigénico, rechazo inmunológico, heterogeneidad y pérdida de madurez entre otras) [229,236-238] (**Figura I17**), que necesitan ser solventados para desatar el potencial completo de esta prometedora tecnología con fines clínicos. Así, aunque ya ha transcurrido más de una década de estudio del proceso de SCR proporcionado gran cantidad de datos acerca de cómo la pluripotencia

puede ser inducida, principalmente usando fibroblastos murinos para inducir reprogramación por razones históricas, la imagen completa de los fundamentos moleculares implicados en la generación de iPSCs aguarda ser proporcionada, lo que limita su prometedor potencial terapéutico. Por eso, esta tesis doctoral tiene como meta principal proporcionar un conocimiento más a fondo de la función de los reguladores epigenéticos que contienen bromodominios durante la inducción del estado celular pluripotente.

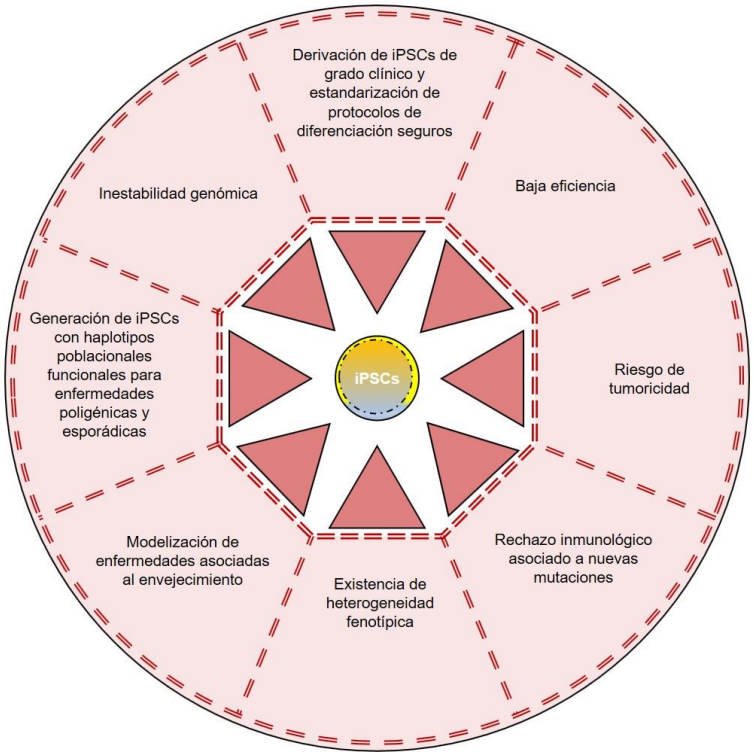


Figura I17. Retos que presenta actualmente la aplicación clínica de la tecnología iPSC. La figura muestra los problemas principales que presenta a hoy en día la tecnología iPSC para su posible utilización con fines terapéuticos.

2.5 LAS PROTEÍNAS QUE CONTIENEN BROMODOMINIOS

El bromodominio (de aquí en adelante denominado BRD para simplificar) es el único dominio proteico con reconocimiento selectivo

y capacidad de unión a residuos de lisina químicamente modificados con un grupo acetilo (monoacetil-lisina o Kac) [239,240]. Los BRDs están presentes de forma individual o múltiple en número en un amplio rango de proteínas diferentes tanto en estructura como en función [241]. El genoma humano codifica 61 BRDs que están contenidos en 46 proteínas [241] mientras que el genoma murino codifica 53 BRDs presentes en 40 proteínas. Las proteínas con BRDs están presentes en casi todos los tejidos y la desregulación de varias de éstas o de su actividad lectora de Kac ha sido implicada en enfermedades humanas tales como cáncer o autoinmunidad entre otras (revisado en detalle en [150,242,243].

2.5.1 La arquitectura del dominio BRD

El BRD es un dominio proteico modular evolutivamente conservado de aproximadamente 110 aminoácidos primeramente identificado en 1992 como un nuevo motivo estructural por J.W. Tamkun y colegas en *Drosophila melanogaster* [244]. El plegamiento estructural del BRD consiste en un empaquetamiento de cuatro hélices α levógiras (hélices α_Z, α_A, α_B y α_C) y dos bucles (bucles ZA y BC) conectando respectivamente las hélices α_Z con α_A y α_B con α_C [143]. Existe una gran variación en la secuencia de los bucles ZA y BC, tanto en longitud como en composición aminoacídica, sin embargo, el reconocimiento y unión a Kac está conservada [143].

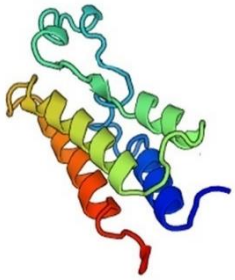


Figura I18. Estructura tridimensional del BRD. Estructura simplificada del BRD C-Terminal (BD1) de BRD2 mostrando las hélices αZ, αA, αB y αC y los bucles ZA y BC. Estructura basada en modelo humano con un 100% de identidad de secuencia (*6fff.1.A "Human BRD2 C-terminal bromodomain with (S)-5-(1-acetyl-2-cyclopropyl-4-(2-(hydroxymethyl)-benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-6-yl)pyrimidine-2-carboxamide" P25440*).

2.5.2 El reconocimiento de residuos de lisina acetilados

El dominio BRD, mediante los bucles ZA y BC estabilizando las hélices α, forma una estructura hidrofóbica que reconoce la Kac [143,245-247]. La variabilidad entre los bucles ZA y BC de los distintos BRDs es

lo que les otorga preferencia de reconocimiento por distintos sitios de Kac en las histonas [143]. A pesar de esto, la unión BRD-Kac está conservada, y en 48 de los 61 BRDs en humanos conlleva la formación de dos puentes de hidrógeno, uno entre el oxígeno carbonilo de la Kac y la cadena lateral NH_2 del aminoácido Asn y otro entre el mismo oxígeno y la cadena lateral OH de la Tyr [240]. En los 13 restantes BRDs, denominados Bromodominios atípicos (aBRDs, por sus siglas en inglés), cuya función es todavía desconocida, no se conserva la Asn sino que está reemplazada por una Tyr, un Thr o una Asp, lo cual sugiere que estos aBRDs, a pesar de conservar el plegamiento típico de los BRDs, no presentan capacidad de unión a Kac [143].

Como proteínas "lectoras" (*readers*) de la acetilación, las proteínas con BRDs juegan papeles cruciales sobre la regulación de la expresión génica vía interpretación epigenética y reclutamiento de complejos regulatorios [143,150]. Así, el reconocimiento e interacción BRD-Kac resulta esencial para la correcta remodelación de la cromatina. Este impacto en la cromatina se puede dar de modo directo o mediante el reclutamiento y direccionamiento de otras enzimas remodeladoras, así como cooperando con otros factores lo que resulta en un alto orden de complejidad y especificidad [143,150]. Esta unión BRD-Kac se produce principalmente en las colas N-terminales de las histonas [248]. La afinidad y selectividad de los BRDs por histonas acetiladas es normalmente débil, pero se incrementa mediante la interacción entre BRDs con regiones donde existen múltiples lugares de acetilación en proximidad [241].

2.5.3 Clasificación de las proteínas BRDs

En 2012 se presentó la primera clasificación de las 46 proteínas humanas que contienen BRDs (por simplicidad a partir de este punto denominadas proteínas BRD) realizada en base al grado de similitud de las secuencias aminoacídicas de estos dominios dando como resultado ocho subfamilias [241]. Por otro lado, en 2019 Zaware y Zhou propusieron una clasificación funcional de estas 46 proteínas BRD en nueve grupos y cuatro subgrupos [143]. A pesar de que incluso existe bastante solapamiento entre ambas clasificaciones, la clasificación funcional [143] muestra de manera más clara los papeles celulares diversos

que tienen las proteínas BRD, y es en la que nos centraremos en esta sección.

Entre las diversas funciones que muestran las proteínas BRD se incluyen la modificación de histonas, el reclutamiento de factores de transcripción, el remodelado de la cromatina y el ensamblaje de complejos mediadores o potenciadores, afectando tanto en la iniciación como en la elongación de la transcripción [143]. Además, la mayor parte de las proteínas BRD contienen en su estructura otros dominios modulares conservados que funcionan independientemente o en conjunto con los BRDs mediando otras interacciones proteína-proteína o interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos [143].

2.5.3.1 Grupo I: HAT

Subgrupo Ia: HATs

En este grupo lo forman coactivadores transcripcionales que incluyen las histonas acetil transferasas (HATs) PCAF, GCN5L2, EP300 (p300) y CREBBP (p300/CBP) además de las subunidades del complejo factor de transcripción IID (TFIID, por sus siglas en inglés) TAF1 y TAF1L (**Figura I19**, arriba). En los primeros, los BRDs se sitúan adyacentes al dominio catalítico HAT que desempeña un papel clave en la variedad de funciones de estas proteínas. En estas proteínas (PCAF, GCN5L2, CREBBP y EP300) el BRD promueve la activación transcripcional ayudando en el reclutamiento del sustrato, facilitando así la acetilación mediada por HAT en múltiples residuos de lisina tanto en histonas como en factores de transcripción [249]. Además, el BRD puede controlar la activación de la HAT p300 mediante interacciones inter o intramoleculares con el bucle autoinhibitorio de p300, que es rico en lisina y sufre hiperacetilación [250]. El complejo TFIID consiste en las subunidades TAF y TBP (*TATA-Binding Protein*), y mediante los dos BRDs de TAF1, une la Kac en histonas con el reconocimiento de factores de transcripción basales a promotores clave [251]. A través de esta función de acoplamiento entre la acetilación por medio del dominio HAT y la unión a Kac por medio de los BRDs, TAF1 puede reclutar otras HATs para trabajar cooperativamente en el ensamblaje y

activación de complejos potenciadores o mediadores en genes diana y en el inicio de la transcripción [143].

Subgrupo Ib: HATs MOZ

Este grupo está formado por BRPF1/2/3 y BRD8, y todas las subunidades accesorias de la familia de HATs MYST (MOZ/MORF, MOF, TIP60 y HBO1) que se encuentran conservadas en eucariotas [143] (**Figura I19**, abajo).

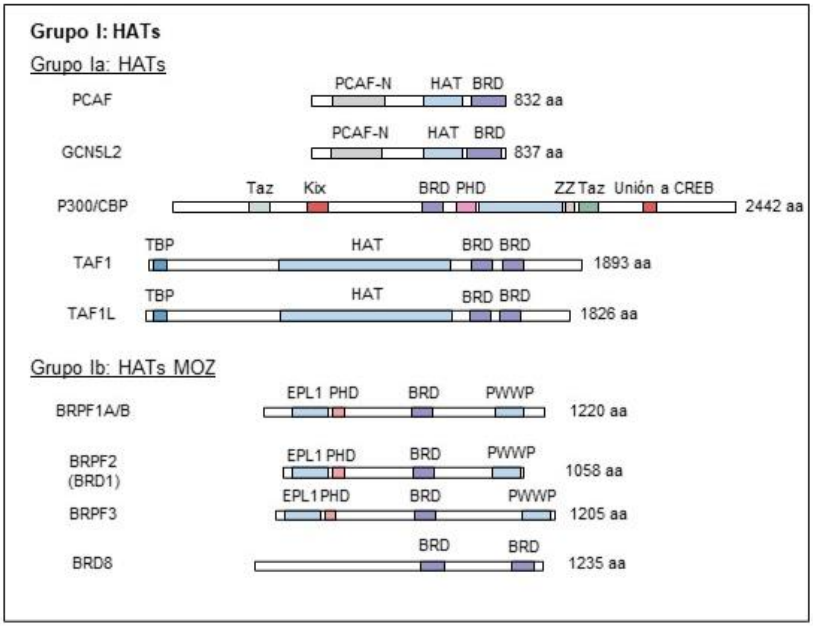


Figura I19. Esquema simplificado del grupo I de proteínas BRD. Se representa cada uno de los miembros que componen los subgrupos de las proteínas BRD con actividad HAT. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; PCAF-N: dominio PCAF; HAT: dominio acetiltransferasa de histonas; Taz: dominio dedo de zinc; Kix: dominio de interacción inducido por quinasa; PHD: homeodominio planta; ZZ: dominio dedo de zinc de unión a dos iones; TBP: Dominio de unión a TATA; EPL1: dominio potenciador de similares a polycomb; PWWP: dominio con motivo Pro-Trp-Trp-Pro conservado.

Estas HATs de la familia MYST son las responsables de la acetilación de histonas libres y están implicadas en cáncer [252].

Estructuralmente, BRPF1/2/3 contiene un dominio de dedo PHD (*Plant Homeodomain*) un BRD, y un dominio PWWP C-terminal [253]. En el complejo cuaternario HAT MOZ (*Monocytic Leukemic Zinc Finger*), BRPF1 potencia la actividad acetiladora de MOZ en histona H3 nucleosomal o libre y H4 libre [254] mediante su BRD potenciando así la expresión de los genes HOX [143]. Esta actividad HAT de MOZ es crítica para la proliferación de los precursores hematopoyéticos y la hematopoyesis [255]. MOZ también se ha relacionado con distintas fusiones y translocaciones génicas en un subtipo de leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) monocítica [256]. El complejo formado por HBO1-BRPF2 es la HAT responsable de la acetilación global de la lisina 14 de la histona H3 [257]. BRD8 es una subunidad accesoria el complejo HAT NuA4 [258] e interactúa con los heterodímeros PPARγ/RXR en sus elementos de respuesta actuando como coactivador transcripcional en respuesta a ligandos específicos [259].

2.5.3.2 Grupo II: Metiltransferasas de histonas.

El grupo II está conformado ASH1L y MLL, que son lisina-metiltransferasas de histonas (HKMTs, por sus siglas en inglés) con dominio SET [143] (**Figura I20**). ASH1L y MLL contienen un BRD en que no aparece el residuo conservado de Asn requerido para la unión a Kac o aBRD [143]. En ASH1L el aBRD está dispuesto en tándem como un dominio dedo PHD y un dominio BAH (*Bromo-Adjacent Homology*) o con un dominio dedo PHD y un dominio FYRN (*Phenylalanine- and tyrosine-rich*) en MLL [143]. El dedo PHD puede unirse a histonas de una manera sensible a modificaciones post-traduccionales, pero se desconocen las funciones de los dominios BAH y FYRN [143].

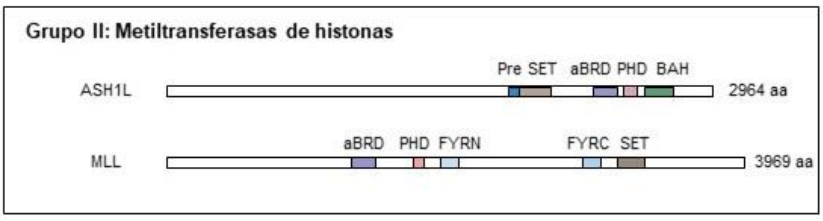


Figura I20. Esquema simplificado del grupo II de proteínas BRD. Se representa los dos miembros que componen este grupo de proteínas BRD con actividad

metiltransferasa en histonas. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. aBRD: bromodominio atípico; pre-Set: Dominio N-terminal previo a SET; SET: Dominio con actividad metiltransferasa (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Tritorax*); BAH: Dominio de homología adyacente a bromo; FYRN: Dominio rico en FY (fenilalanina/tirosina) N-terminal; FYRC: Dominio rico en FY (fenilalanina/tirosina) C-terminal.

2.5.3.3 Grupo III: Factores remodeladores de cromatina

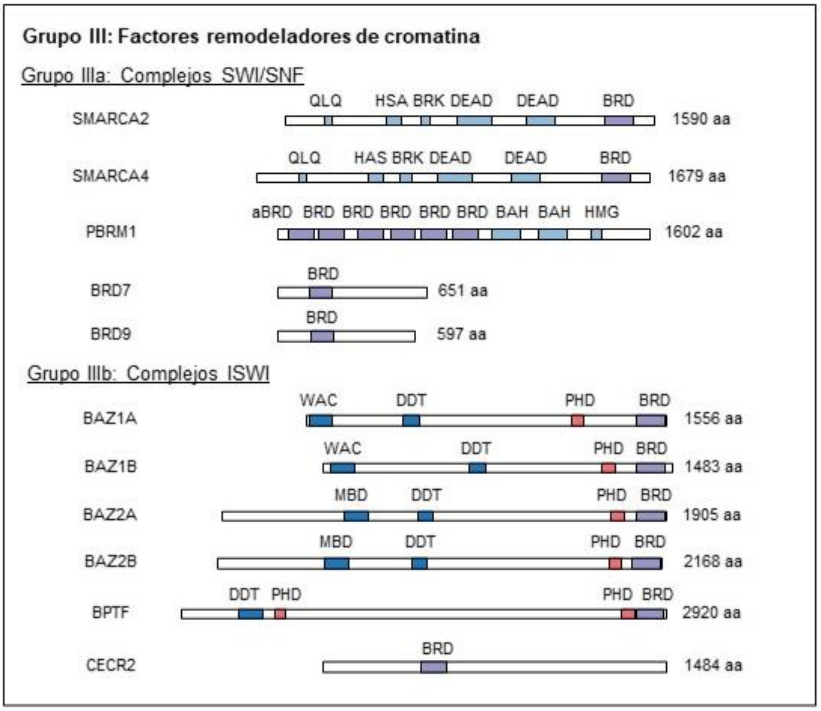


Figura I21. Esquema simplificado del grupo III de proteínas BRD. Se representa cada uno de los miembros que componen los subgrupos de las proteínas BRD con actividad remodeladora de cromatina. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; QLQ: dominio con motivo Gln, Leu, Gln conservado; HSA: dominio asociado a Helicasa/SANT. BRK: Dominio de función desconocida comúnmente asociado a helicasas y factores de transcripción. DEAD: dominio helicasa caja DEAH; aBRD: bromodominio atípico; WAC: Dominio WSTF/Acf1/Cbp146; DDT: dominio presente en proteínas conteniendo dominio homeocaja ADN y distintos factores de transcripción y factores remodeladores de cromatina; MBD: dominio de unión a metil-CpG; PHD: homeodominio planta.

Subgrupo IIIa: Complejos SWI/SNF

En este grupo nos encontramos subunidades críticas de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP SWI/SNF en mamíferos (mSWI/SNF), que se corresponden con los factores remodeladores de cromatina SMARCA2 (BRM), SMARCA4 (BRG1), BRD7, BRD9 y PBRM1 (BAF180) [143] (**Figura I21**, arriba). El componente ATPasa del complejo mSWI/SNF es BRG1/BRM, con una organización modular multifuncional y actividad helicasa gracias a su dominio DEAD además de la capacidad de unión a histonas mediante su BRD [143]. Recientemente se ha demostrado que existen tres clases de complejos mSWI/SNF que, según su organización modular, serían los complejos con el factor canónico asociado a la ATPasa BRG1/BRM (BAF), BAF asociado a polibromo (PBAF) y el complejo recientemente descrito ncBAF [260]. El complejo PBAF contiene BRD7 y un componente PBRM1, que contiene cuatro BRDs en tándem con un aBRD en cada flanco, mientras ncBAF contiene BRD9 [143]. El BRD otorga a estos complejos la capacidad de unión a Kac, contribuyendo a múltiples aspectos funcionales tales como la facilidad de ensamblaje de PBAF y ncBAF (mediante BRD7 y BRD9, respectivamente), ayudando en el movimiento producido por la ATPasa a lo largo de la cromatina o coordinando de manera espaciotemporal distintas interacciones proteína-proteína para el remodelado de la cromatina gracias PBRM1 [143].

Subgrupo IIIb: Complejos ISWI

Formado por los remodeladores de cromatina de la familia ISWI [107] BAZ1A (ACF1), BAZ1B (WSTF), BAZ2A, BAZ2B, BPTF y CECR2 [143] (**Figura I21**, abajo). En los complejos de mamíferos, la ATPasa central de ISWI puede ser SNF2H o SNF2L, formando complejos remodeladores con distintas subunidades accesorias y diversidad funcional [261]. El BRD de CECR2 o el tándem dedo PHD con módulo BRD de BPTF pueden contribuir en la activación y represión transcripcional [143,262]. Por otro lado, los tándems dedo PHD y módulos BRD de BAZ1A y BAZ1B o BAZ2A y BAZ2B pueden

contribuir a las actividades de ensamblaje y espaciado nucleosomal, a la replicación del ADN y a la segregación cromosómica [262,263].

2.5.3.4 Grupo IV: Proteínas ATPasa AAA

En este grupo están las proteínas de la familia de ATPasas con dominio AAA (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares) ATAD2 y ATAD2B [143] (**Figura I22**). Se ha demostrado que, mediante interacción directa con H4K5ac y H4K12ac de nueva síntesis, ATAD2 es reclutada a sitios de replicación del ADN [264], lo cual demuestra una función del BRD en el reensamblaje de la cromatina acoplado a replicación [143]. Por otro lado, se ha mostrado que ATAD2 (ANCCA) media ciertas funciones del receptor de andrógenos y de realizar acciones importantes en la supervivencia y proliferación de células de cáncer de próstata [265,266].

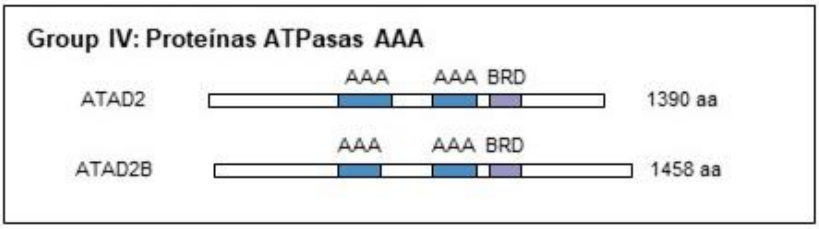


Figura I22. Esquema simplificado del grupo IV de proteínas BRD. Se representa los dos miembros que componen este grupo de proteínas BRD con actividades ATPasas asociadas con diversas actividades celulares. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; AAA: domino presente en ATPasas asociadas a una variedad de actividades celulares.

2.5.3.5 Grupo V: Familia de coactivadores transcripcionales BET

En este grupo lo conforma la familia de proteínas BET (*Bromodomain and Extraterminal Domain*), conformada por BRD2, BRD3, BRD4 y la forma específica de testículos BRDT [143] (**Figura I23**). Estas proteínas muestran de manera característica dos BRDs en tándem seguidos de un dominio extraterminal o ET [267]. Estas proteínas tienen múltiples papeles en la regulación de la transcripción génica y son posiblemente las proteínas con BRDs más caracterizadas, en

particular BRD4 [143]. Sus BRDs se unen a la Kac de las histonas y factores de transcripción y su dominio ET aumenta esta acción y además interacciona con otras proteínas [268-270]. Las proteínas de la familia BET facilitan la apertura de la cromatina, el reclutamiento de factores de transcripción y coactivadores a promotores y potenciadores de genes diana y activan los complejos RNA Pol II pausados, promoviendo la elongación de la transcripción [271]. Los BRDs de los miembros de la familia BET, al contrario que otros BRDs, muestran preferencia por residuos de lisina diacetilados próximos en la secuencia proteica [241,272,273]. Por ejemplo, en la estructura cristalina de una histona H4K5acK8ac se ha comprobado que la H4K5ac es reconocida por el primer BRD de BRD4 (BD1) de manera canónica (unión a Kac por interacciones de hidrógeno con los residuos conservados Asn140 y Tyr97), mientras la H4K8ac adyacente se une a residuos hidrofóbicos y aromáticos aumentando el reconocimiento de H4K5ac [143]. Esta especificidad diferencial permite a BRD4 reclutar factores de transcripción y la ciclina T1, del complejo de elongación pTEFb, a través de su segundo BRD (BD2) [143]. Además, BRD4 interactúa con los complejos ARN Pol II pausados en regiones diana marcados con H4K5acK8ac, que reconoce su BD1, llevando a la activación por fosforilación de la ARN Pol II y a una elongación transcripcional productiva [274]. BRD4 participa de manera importante en el reclutamiento de factores de transcripción, ensamblaje de complejos mediadores y potenciadores de elongación transcripcional de oncogenes [274]. La interacción entre BRD4 y TWIST, un activador transcripcional de la transición epitelio mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), ha mostrado ser crítico para la progresión del cáncer de mama de tipo basal (BLBC, por sus siglas en inglés) [273], conocido comúnmente como cáncer de mama triple negativo (ER^-, PR^-, $HER2^-$). BRD4 se encuentra regulado a la baja por hipermetilación aberrante de su promotor en tumores primarios y líneas de cáncer de colon humanos, dónde su expresión ectópica reduce notablemente el crecimiento tumoral [275].

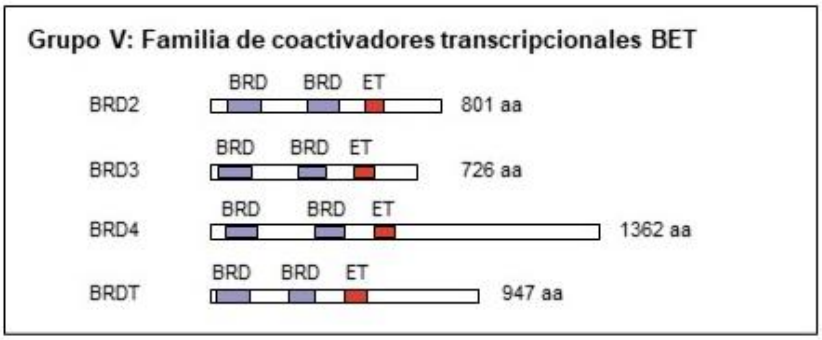


Figura I23. Esquema simplificado del grupo V de proteínas BRD. Se representa los cuatro miembros que componen este grupo de proteínas BRD con actividad coactivadora transcripcional. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; ET: dominio extraterminal.

2.5.3.6 Grupo VI: SUMO/Ubiquitín ligasas E3

Este grupo lo componen la familia de proteínas TRIM (*Tripartite-Motif-Containing*) TRIM24 (TIF1α), TRIM28 (TIF1β, KAP1), TRIM33 (TIF1γ) y TRIM66 (TIF1δ), también conocidas como proteínas TIF1 (*Transcriptional Intermediary Factor 1*) [143] (**Figura I24**). Estas proteínas se caracterizan por un dominio TRIM N-terminal y la presencia de un dedo PHD y un BRD (aBRD en el caso de TRIM28) C-terminales [143]. Todas estas proteínas muestran una organización similar, pero presentan funciones muy diversas en la regulación de la expresión génica. TRIM24/TIF1α es un corregulador de receptor nuclear dependiente de ligando y juega un papel en la regulación de la estabilidad de p53 [276]. TRIM28/TIF1β (KAP1) forma parte del complejo correpresor N-CoR1 y el complejo remodelador de nucleosoma NuRD y, mediante su interacción con la proteína HP1, promueve la formación de heterocromatina [143]. El dedo PHD de TRIM28/TIF1β no une histonas [277], sino que forma con el aBRD en tándem un módulo que actúa como E3 SUMO ligasa mediando el silenciamiento transcripcional [278,279]. El módulo dedo PHD-BRD de TRIM33/TIF1γ se une a marcas H3K9me3 y H3K18ac en la cola de la misma histona H3, reclutando de este modo TRIM33-Smad2/3 a los promotores de *Gsc* y *Mixl1*, reguladores de mesendodermo, para su activación transcripcional [280]. TRIM33/TIF1γ también presenta

actividad E3 ubiquitina ligasa y marca la β-catenina nuclear para su degradación, lo que conlleva arresto de la proliferación celular y le permite actuar como gen supresor de tumores [281]. TRIM66/TIF1δ interacciona con HP1γ y es específica de testículos [282].

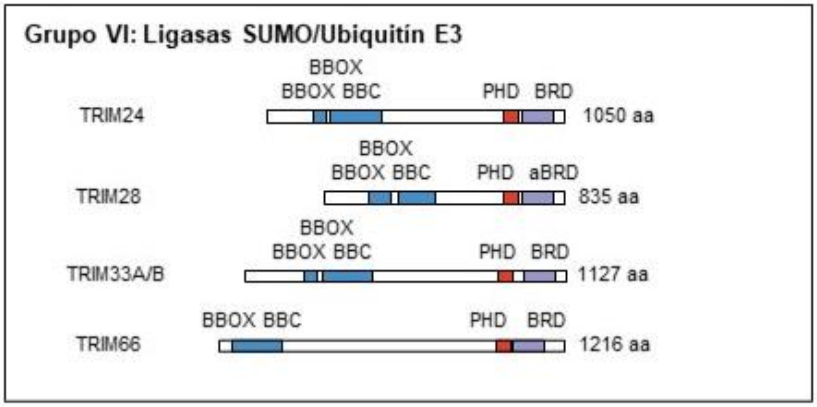


Figura I24. Esquema simplificado del grupo VI de proteínas BRD. Se representa los cuatro miembros que componen este grupo de proteínas BRD con actividad SUMO/Ubiquitín E3. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; BBOX: dominio dedo de zinc tipo caja B; BBC: dominio caja B C-terminal; PHD: Homeodomino planta.

2.5.3.7 Grupo VII: Familia de proteínas SP de los cuerpos nucleares PML

El grupo VII está formado por la familia de proteínas SP SP100, SP110, SP140 y SP140L [143] (**Figura I25**). Estas proteínas presentan una alta similitud de secuencia con el regulador autoinmune AIRE [283], aunque sus funciones moleculares todavía se desconocen [143]. Esta familia de proteínas son componentes de los cuerpos nucleares de la leucemia promielocítica (PML) subnuclear o PML-NBs [284,285]. Estos PML-NBs se forman en respuesta a diversos tipos de estrés celular tales como infección viral, señalización de interferón y daño en el ADN [143]. La estructura de SP140 y SP140L presenta un aBRD en tándem con un dominio SAND (SP100, AIRE, NucP41/P75 y DEAF) [286] y un dedo PHD, los cuales pueden unirse a ADN e histonas, sugiriendo que estas proteínas pueden estar mediando interacciones proteína-proteína y

proteína-ADN involucradas en la regulación de la estructura de la cromatina [143].

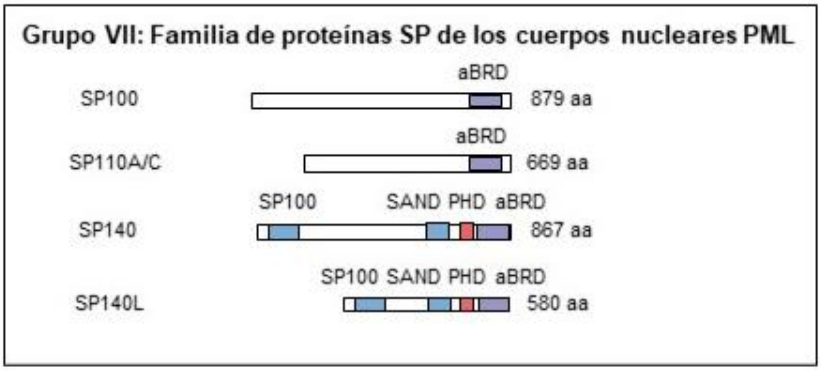


Figura I25. Esquema simplificado del grupo VII de proteínas BRD. Se representa los cuatro miembros que componen este grupo de proteínas BRD que forman parte de los cuerpos nucleares PML. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. aBRD: bromodominio atípico; SP100: Dominio HSR (región homogéneamente teñida) de SP100; SAND: dominio presente en la familia Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1; aBRD: bromodominio atípico.

2.5.3.8 Grupo VIII: Correpresores transcripcionales

El grupo VIII está formado por las proteínas MYND (por sus siglas en inglés de *Myeloid, Nervy and DEAF-1*) ZMYND8 (PRKCBP1, RACK-7 o SPIKAR) y ZMYND11 (BS69) [143] (**Figura I26**), ambas reportadas como supresores tumorales [287]. Estas proteínas presentan una organización en dominios consistente en una secuencia de señalización nuclear N-terminal, un módulo PHD-BRD-PWWP y dominio MYND C-terminal [143]. ZMYND11 se une mediante su módulo BRD-PWWP a la histona H3.3K36me3 [288]. ZMYND8 es una proteína de unión a quinasa C [289] y regulador transcripcional [290]. ZMYND8 es reclutada a sitios de daño en el ADN y para el control de la transcripción mediante la interacción coordinada del módulo PHD-BRD-PWWP con H3K4me1, H3K14ac y el ADN [291]. ZMYND8 también se une a proteínas no histonas a través de su módulo PHD-BRD-PWWP N-terminal, particularmente con la proteína de unión a Actina citoplasmática DEBRINA [292], aunque este secuestro citoplasmático de

ZMYND8 por DEBRINA requiere mayor investigación, ya que las acciones de los BRDs se dan mayoritariamente en el núcleo [143].

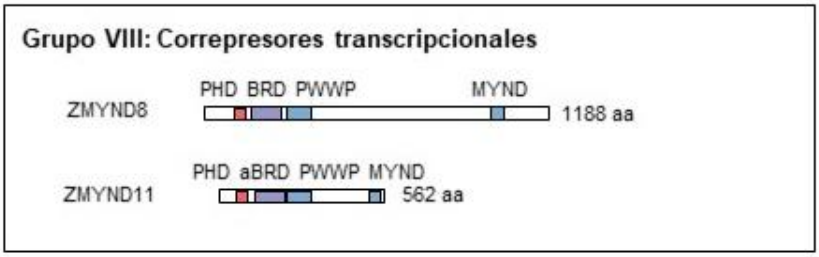


Figura I26. Esquema simplificado del grupo VIII de proteínas BRD. Se representa los dos miembros que componen este grupo de proteínas BRD con actividades correpresoras transcripcionales. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; PHD: homeodominio planta; PWWP: dominio con motivo Pro-Trp-Trp-Pro conservado; MYND: dedo de zinc tipo *myeloid*, *nervy* y DEAF-1; aBRD: bromodominio atípico.

2.5.3.9 Grupo IX: Proteínas con repetición WD

Este grupo lo componen las proteínas con repetición WD BRWD1 (WDR9), BRWD3 y PHIP (WDR11) [143] (**Figura I27**). Estas proteínas han sido implicadas en una amplia variedad de funciones celulares tales como la transcripción, el procesamiento del ARN, la transducción de señales, en ensamblaje del citoesqueleto y la regulación del ciclo celular [293]. Estas proteínas presentan un tándem BRD-aBRD, con un BRD que muestra unión a Kac canónica y un aBRD de función desconocida [143].

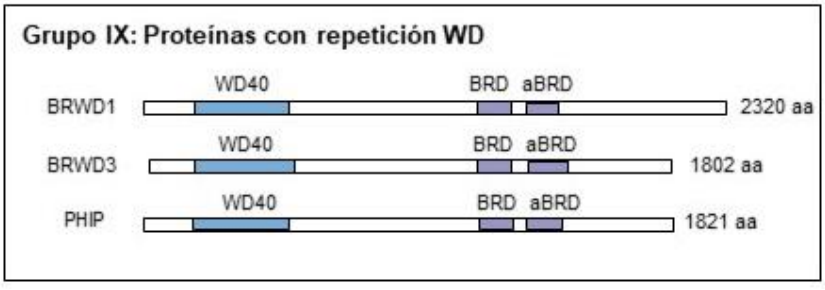


Figura I27. Esquema simplificado del grupo IX de proteínas BRD. Se representa los tres miembros que componen este grupo de proteínas BRD que contienen repeticiones WD. Se indica la longitud en aminoácidos de cada proteína, así como los

principales dominios funcionales que contienen. BRD: bromodominio; aBRD: bromodominio atípico; WD40: dominio repetido de beta-transducina comúnmente terminado en un dipéptido WD (triptófano-ácido aspártico).

2.5.4 Moléculas inhibidoras de los BRDs

La importancia que tienen los BRDs en el reconocimiento, modificación de histonas y en la estructura de la cromatina, así como sus papeles directos en la regulación de la transcripción génica, los hace muy interesantes para el desarrollo de pequeñas moléculas capaces de modular selectivamente las interacciones entre proteínas mediadas por acetilación. Desde que el descubrimiento de la estructura de PCAF (KAT2B) reveló que tenía un bolsillo de unión a Kac bien definido y adecuado para la unión de pequeñas moléculas [239], y el descubrimiento en 2005 del primer inhibidor de BRD, el NP1 específico de PCAF [294], se han desarrollado pequeñas moléculas ligando para una amplia variedad de bromodominios [243,295-299]. Los BRDs han suscitado un enorme interés desde que un cribado fenotípico identificó a la familia BET como potenciales dianas terapéuticas en diversas situaciones oncológicas [300]. Así, el desarrollo de compuestos relacionados con la Kac ha sido rápido y estas pequeñas moléculas moduladoras de la actividad BRD han probado su valor para estudiar de manera profunda, precisa y selectiva la química epigenética de la Kac y las funciones de los BRDs tanto en procesos fisiológicos como patológicos, proporcionando nuevas estrategias con fines terapéuticos [143,150,300]. A continuación, de manera resumida, se desglosarán los distintos inhibidores disponibles comercialmente de las proteínas BRD que han sido utilizados a lo largo de esta tesis doctoral.

2.5.4.1 Inhibidores de la familia BET

Los residuos de unión a ligando son comunes en los dos BRDs (BD1 y BD2) de la familia, siendo todos sus miembros inhibidos por las diazepinas, como la tienotriazolodiazepina JQ1 [301] y sus relacionadas [143] (**Figura I28**). Se ha demostrado que JQ1 [301] desplaza de la cromatina a las oncoproteínas de fusión BRD4-NUT, resultando en regresión tumoral, diferenciación de células escamosas y arresto del crecimiento en modelos de ratón de carcinoma de línea media NUT con xenoinjertos derivados de paciente [143,302]. La benzodiazepina I-BET762

[303] ha demostrado intervenir en la expresión de genes inflamatorios clave en macrófagos activados mediante la disrupción de los complejos de la cromatina responsables [143,303]. La tienotriazolodiazepina MS147 ha mostrado mayor potencia que JQ1 [143] y bloquea la activación del factor de transcripción NF-κB inducida por el VIH en la nefropatía asociada a VIH [304]. CPI-203 ha mostrado efectos sinérgicos con la lenalidomida contra linfoma de células del manto resistente [305] y potenciar los efectos antiproliferativos de la rapamicina en tumores pancreáticos neuroendocrinos humanos [306]. La diazepina OTX015, ha demostrado ser eficaz en la inhibición de la proliferación en una variedad líneas celulares de cáncer humano de pulmón de células pequeñas y no pequeñas con diferentes mutaciones oncogénicas [307]. La última de las diazepinas, CPI-0610 ha demostrado eficacia antitumoral in vivo en un modelo de xenoinjerto de ratón utilizando células de leucemia mieloide aguda MV-4-11 [308].

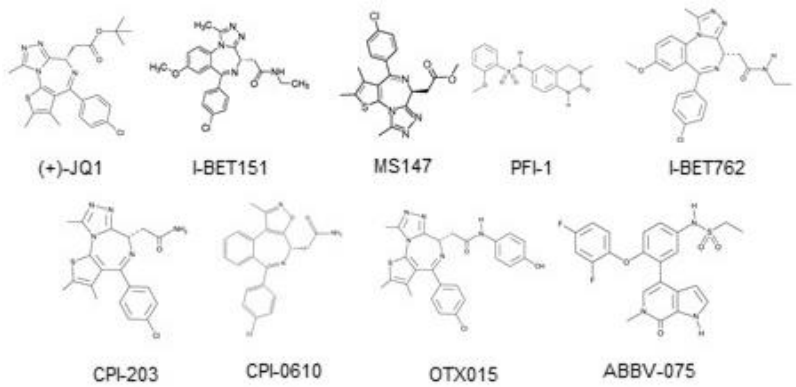


Figura I28. Inhibidores de los BRDs de la familia BET. Representación bidimensional de las estructuras moleculares de las principales moléculas inhibidoras del reconocimiento de acetilación por BRDs de la familia BET.

Además de las diazepinas, se han utilizado otros quimiotipos como base para el diseño de inhibidores de BET y otros BRDs. El anillo de isoxazol de I-BET-151 es una de sus principales características, reemplazando el núcleo basado en diazepina por un núcleo con características de quinolina [143,309]. I-BET151 ha demostrado bloquear el crecimiento de las células de leucemia de fusión MLL [309]. Además, se ha comprobado que I-BET151 inhibe la progresión de neoplasmas

mieloproliferativos dirigidos por la mutación JAK2V617F [310]. Otro importante inhibidor de BET basado en quinolina es la dihidroquinazolinona PFI-1 [311]. PFI-1 ha demostrado tener efectos antiproliferativos en líneas celulares de leucemia, además, las líneas sensibles muestran arresto celular en la fase G1, regulación a la baja de la expresión de MYC e inducción de apoptosis y la diferenciación de blastos primarios de leucemia [311]. El primer ensayo clínico en humanos con etanosulfonamida ABBV-075 o Mivebresib, ha demostrado efectos esperanzadores en tratamiento de leucemia mieloide aguda recidivante o refractaria siendo este compuesto bien tolerado por los pacientes [312]. Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de los BRDs de BET bloquea la expresión oncogénica de *cMyc* en mieloma múltiple [313,314], leucemia de fusión MLL [309] y AML [315]. Además, la inhibición farmacológica de la familia BET ha sido mostrada como potencial tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración [316].

2.5.4.2 Inhibidores de otros grupos

El inhibidor de BRDs de amplio espectro bromosporina (BSP) ha sido desarrollado por SGC (*Structural Genomics Consortium*) (https://www.thesgc.org/chemical-probes/Bromosporine) y es muy útil para estudiar las funciones de los BRDs en su conjunto [317] (**Figura I29**).

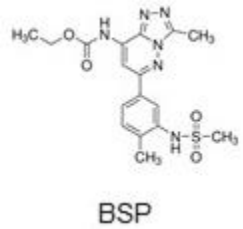


Figura I29. Inhibidor de BRDs de amplio espectro. Estructura bidimiensional de la estructura molecular del ligando de unión no específica a BRDs bromosporina (BSP) que actúa como un inhibidor de amplio espectro contra todos los BRDs.

Recientemente, también se han desarrollado pequeñas moléculas inhibidoras para otros BRDs distintos de la familia BET (**Figura I30**), incluso para algunos BRDs para los cuales se había reportado una baja capacidad de generación de ligandos debido a la

unión superficial o a una hidrofobia subóptima de su bolsillo de unión a Kac [143,318,319].

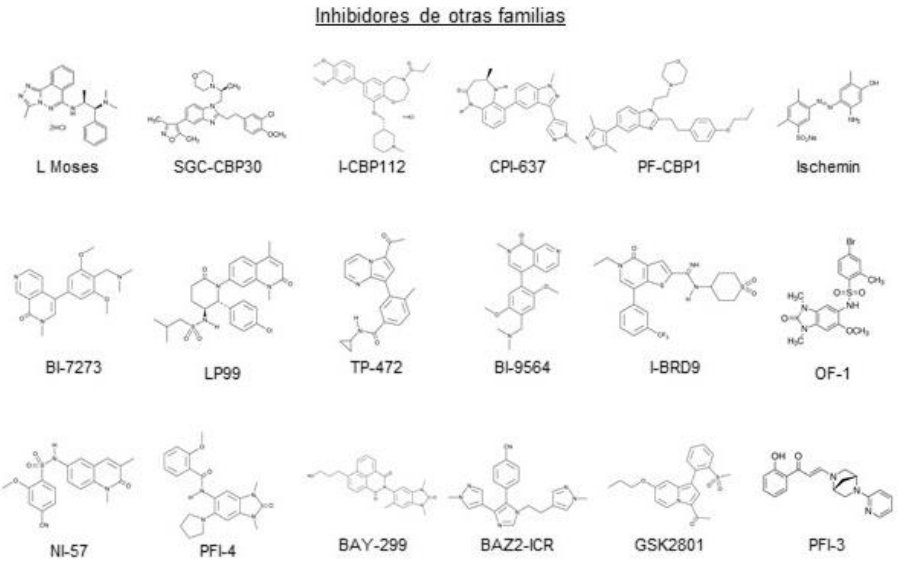


Figura I30. Otros inhibidores de BRDs. Representación bidimensional de las estructuras moleculares de los principales ligandos específicos de los BRDs de miembros de las familias distintas de BET.

Los inhibidores de CREBBP son, tras los de BET, los más estudiados de entre las pequeñas moléculas inhibidoras de BRDs [317]. Se ha reportado que la Isquemina (*Ischemin*) es un inhibidor selectivo del BRD de CREBBP capaz de inhibir la interacción de CREBBP con p53, alterando los genes diana de p53 en apoptosis y reparación del ADN [320]. PF-CBP1, otro inhibidor selectivo de CREBBP, ha demostrado regular a la baja genes inflamatorios clave en macrófagos y también el gen RSG4, diana ligada a la enfermedad de Parkinson, en neuronas [321]. El consorcio SGC y la compañía GSK (*GlaxoSmithKline*) han reportado I-CBP112 como un inhibidor selectivo para los BRDs de CREBBP y EP300 que actúa en rangos nanomolares [143]. El tratamiento con I-CBP122 debilita la autorrenovación de las células iniciadoras de leucemia tanto *in vitro* como *in vivo* [322]. Junto a la Universidad de Oxford, el consorcio SGC reportó en 2014 el compuesto SGC-CBP30

[323], también selectivo contra los BRDs de CREBBP y EP300 en rangos nanomolares [143]. Sin embargo, este inhibidor no es adecuado para uso *in vivo* debido a su rápida metabolización [317]. Se ha reportado que ambos CBP112 y SGC-CBP30 suprimen la respuesta Th17 crítica para varias enfermedades autoinmunes humanas [317,324]. Además, también suprimen el factor de transcripción IRF4 y su red, incluyendo c-MYC, crítico para la viabilidad de las células de mieloma [325]. Por último, el inhibidor de CREBBP y EP300 CPI-637 también ha reportado alta potencia y selectividad sobre otros BRDs *in vitro* [326].

También se han reportado inhibidores para BRDs menos caracterizados [240] [143]. Por ejemplo, GSK2801 y BAZ2-ICR han mostrado alta afinidad y selectividad por BAZ2A y BAZ2B [143,327,328]. El consorcio SGC ha desarrollado un inhibidor selectivo contra PCAF y GCN5L2 (KAT2B y KAT2A, respectivamente) llamado L-Moses, con gran permeabilidad celular, ninguna citotoxicidad observable en PBMCs y estabilidad metabólica en microsomas de hígado de ratón y humano, lo cual, lo haría viable para su potencial uso *in vivo* [329] (https://www.thesgc.org/chemical-probes/L-Moses). Por otro lado, se han desarrollado inhibidores para los BRDs de BRD9 y BRD7 como la lactama fusionada con quinolona LP99 [330], que muestra una actividad ligeramente menor para BRD7 pero ninguna o despreciable contra otros BRDs [143]. Otros dos inhibidores de BRD9, BI-7273 y BI-9564 [331], han demostrado ejercer acciones antitumorales en un modelo de xenoinjerto de leucemia mieloide aguda [331]. Además, el inhibidor de BRD9 y BRD7 TP-472, también ha mostrado una alta selectividad y actividades *in vivo* (https://www.thesgc.org/chemical-probes/TP-472). La tienopiridina I-BRD9 es el inhibidor de BRD9 más potente y selectivo hasta ahora desarrollado [143]. I-BRD9 muestra una selectividad de 200 a 700 veces mayor sobre BRD7 que los BRDs de la familia BET [332]. Se han desarrollado también inhibidores para las BRPFs como el OF-1, que muestra una alta selectividad en la inhibición de BRPF1B, BRPF2 y PRPF3 (https://www.thesgc.org/chemical-probes/OF-1). Junto con Pfizer, el consorcio SGC ha reportado también PFI-4, un inhibidor selectivo de BRPF1B y una isoforma de BRPF1 que se une a histonas acetiladas de una forma opuesta a BRPF1B [317] (https://www.thesgc.org/chemical-probes/PFI-4). También este mismo

consorcio, en colaboración con la Universitiy College of London, ha descubierto el inhibidor NI-57, que inhibe selectivamente todas las BRPFs [317], https://www.thesgc.org/chemical-probes/NI-57). El consorcio SGC también ha desarrollado un inhibidor de SMARCA2, SMARCA4 y los 6 BRDs de PBRM1 llamado PFI-3, que ha demostrado una alta selectividad en comparación con otros BRDs [333]; (https://www.thesgc.org/chemical-probes/PFI-3). De hecho, la inhibición de SMARCA 2 y SMARCA4 con PFI-3, ha demostrado que la actividad ATPasa de su dominio catalítico tiene un papel crítico en cáncer mientras sus BRDs no [334]. BAY-299 es un inhibidor de BRD1 y del segundo bromodominio de TAF1 reportado también por el consorcio SGC en colaboración con Bayer (https://www.thesgc.org/chemical-probes/BAY-299); [317].

2.6 Funciones moleculares de las proteínas BRD

Las proteínas BRD tienen diversas funciones moleculares que ejercen en solitario o formando parte de complejos mayores. Tal como se ha mencionado anteriormente, están involucradas en la regulación génica a través de la modulación transcripcional, mediante modificación y remodelación de la cromatina e incluso actuando sobre la propia maquinaria transcripcional. Por otro lado, las proteínas BRD pueden reconocer específicamente histonas y actuar como andamiaje, controlando la transcripción mediante el reclutamiento de otros reguladores transcripcionales a la cromatina.

2.6.1 Los BRDs y la remodelación de la cromatina

Las proteínas con BRDs se asocian normalmente en complejos que controlan la compactación y descompactación de la cromatina mediante distintos mecanismos que llevan a su remodelación [150]. Por ejemplo, la apertura de la estructura de la cromatina dependiente de ATP que produce una de las subunidades centrales del complejo, SMARCA4 (BRG1) o SMARCA2 (BRM) en los complejos SWI/SNF humanos, resulta en la estimulación de la transcripción [150]. Los complejos remodeladores de cromatina ISWI con sus subunidades BRDs también regulan la replicación y transcripción de la cromatina mediante su remodelado [150,335,336] y mediando diversos procesos que incluyen desde

la respuesta a daño en el ADN [263], el silenciamiento dependiente de ARN no codificante [337] y actividades de ensamblaje nucleosomal [143,150] entre otras.

También se han propuesto papeles en la remodelación de la cromatina para algunas proteínas con repetición WD. Por ejemplo, BRWD1 (WDR9) ha sido propuesto como regulador transcripcional involucrado en el remodelado de la cromatina mediante su interacción con el componente del complejo mSWI/SNF SMARCA4 (BRG1) [338,339].

2.6.2 Los BRDs y la modificación de histonas

Como ya se ha descrito, varias proteínas con BRD muestran actividad catalítica que participa en la deposición de diversas marcas epigenéticas en histonas que forman parte de la cromatina. Por ejemplo, es el caso de ciertas proteínas BRD que poseen actividad acetiltransferasa (HAT) (ej. KAT2B, CREBBP, EP300, GCN5L2 (KAT2A), BRD8) o actividad metiltranferasa (ej. de KMT2A y ASH1L) [143,150]. Así, estas proteínas BRD actúan como "escritoras" epigenéticas añadiendo grupos acetilo o metilo sobre histonas lo que impacta en la estructura de la cromatina [150]. En el caso de BRD8, que se encuentra formando parte del complejo NuA4 y es responsable de la acetilación de las histonas H4 y H2A en levaduras [258], también se ha mostrado que participa en un complejo de pre-deposición de la variante histónica H2A.Z favoreciendo su intercambio en los nucleosomas [340,341]. Sin embargo, la función y actividad biológica exacta de BRD8 no han sido resueltas por ahora [150].

MLL metila H3K4 en regiones regulatorias importantes y, mediante la modulación de la estructura de la cromatina y la accesibilidad del ADN, regula la expresión génica [150,342]. La acetilación de la histona H3 estimula la actividad metiltransferasa de MLL sobre H3K4 [343].

Por otro lado, proteínas BRD sin actividad catalítica propia pueden participar en la modificación de histonas mediante el reclutamiento de

otros reguladores epigenéticos. Por ejemplo, BRPF1 recluta el complejo MOZ-MORF a la cromatina dirigiendo su actividad HAT hacia las histonas [150,344,345]. BRPF3 se asocia con el complejo HAT HBO1 y es requerido para la acetilación de H3K14 alrededor de los sitios de comienzo de transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) [346].

2.6.3 Los BRDs y el reconocimiento de histonas

Distintas subfamilias de proteínas con BRDs, mediante su capacidad de reconocimiento y unión a Kac, actúan como andamiaje regulando el reclutamiento y disociación de componentes de la maquinaria transcripcional a regiones concretas del genoma. Por ejemplo, la familia de proteínas BET ha sido ampliamente estudiada debido a la disponibilidad reciente de inhibidores contra sus dos módulos BRD, BD1 y BD2 [150,301,303], y sus funciones han sido revisadas en profundidad durante los últimos años [143,347,348]. Las BET actúan de andamiaje mediante su unión a Kac con sus BRDs y el reclutamiento de la maquinaria transcripcional a través de su dominio ET [143,150]. del ciclo celular [150].

Otro ejemplo sería el de TAF1, la subunidad mayor y central del complejo TFIID, que mediante sus dos BRDs en tándem reconoce y se une a múltiples residuos Kac en la cola de la histona H4 [349]. TAF1 también se asocia directamente con BRD4 y juntos ejercen un control sinérgico sobre la expresión génica en un mecanismo que todavía no ha sido determinado [350]. TAF1L, el homólogo específico de testículos podría estar actuando como sustituto funcional de TAF1 durante la meiosis [351].

ZMYND8 es un factor de respuesta a daño en el ADN reclutando al complejo NuRD a estos lugares de daño en el ADN, resultando en la represión transcripcional y promoviendo la reparación por recombinación homóloga [352]. También se ha propuesto que ZMYND8 recluta la demetilasa específica de H3K4 KDM5C, coocupando muchos potenciadores y la mayoría de los superpotenciadores, y regulando un intercambio dinámico entre H3K4me1 y H3K4me3 en potenciadores activos que rebaja su actividad [353]. ZMYND11 (BS69) se une específicamente a H3.3K36me3, que actúa como correpresor de la

elongación transcripcional y regula el corte y empalme (*splicing*) del pre-mARN [288,354].

Finalmente, ATAD2 está implicada en la corregulación transcripcional de genes que están regulados por el receptor de estrógenos α [265] y MYC [355]. Se ha demostrado que ATAD2 sirve como factor pionero y actúa de andamiaje reclutando a la cromatina a los factores de transcripción E2F [356]. ATAD2B se expresa de manera transitoria en las neuronas en desarrollo de ratones, sin embargo, su función biológica sigue siendo desconocida [150,357].

2.6.4 Los BRDs y la modulación de la transcripción

Teniendo en cuenta los distintos papeles descritos en los que participan las proteínas BRD en la regulación de la cromatina no es de extrañar que los miembros de esta familia de reguladores epigenéticos desempeñan funciones clave en el control de la expresión génica actuando como correguladores transcripcionales de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, en el caso de TRIM28 suele actuar como represor transcripcional modulando la estructura de la cromatina mediante su asociación con la familia HP1 [358], o mediante su actividad sumoilasa que resulta necesaria para el reclutamiento del complejo represor NuRD [278,279]. En el caso de TRIM33 ejerce un control transcripcional indirecto a través de la regulación de la ruta de señalización de TGFβ modulando negativamente la actividad del factor de transcripción SMAD4 por medio de su actividad ubiquitina ligasa E3 [359]. También se ha mostrado que en ausencia de metilación en H3R2 y H3K4, TRIM33 se une específicamente a las colas acetiladas de la histona H3 [360], sugiriendo un fino ajuste como corregulador transcripcional directo [150]. TRIM66, otro miembro de esta familia puede actuar como represor transcripcional mediante su asociación con las proteínas HP1 [150,282].

2.7 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS PROTEÍNAS CON BROMODOMINIOS

Como hemos visto, las proteínas BRD ejercen sus funciones moleculares de diversas maneras tanto en solitario o formando

complejos. Numerosas evidencias han mostrado que la desregulación de varias proteínas BRD se encuentra asociada con la aparición de numerosos procesos fisiopatológicos entre los que se incluyen desórdenes metabólicos y cardíacos, enfermedades autoinmunes y neurológicas, y cáncer (revisado en [143,150,242,347]. Sin embargo, comparativamente hablado, todavía queda mucho por explorar acerca de las funciones de las proteínas BRD en el contexto de desarrollo embrionario y la pluripotencia celular.

2.7.1 Los BRDs en desarrollo embrionario

Durante los últimos años, numerosos grupos han contribuido a que conozcamos el papel individual de varios miembros BRD en el desarrollo embrionario, principalmente utilizando modelos murinos con pérdida de función. Por ejemplo, la ausencia de función de *Brd2* [361], *Brd4* [362], *Brpf1* [363], *Crebbp* [364], *Ep300* [365], *Gcn5L2* [366,367], *Bptf* [107] Smarca*4* [150,368,369], y *Trim33* [370] resulta en letalidad embrionaria temprana en ratón (**Tabla I1**).

También se ha mostrado que la pérdida de función de otros miembros de esta familia BRD conlleva la aparición de graves alteraciones durante el desarrollo embrionario (**Tabla I1**). Por ejemplo, ratones *Prbm1* KO manifiestan defectos en el desarrollo cardíaco [371]. Ratones *Cecr2* KO muestra defectos en el tubo neural [372]. El KO de *Pcaf* afecta al remodelado de la cromatina necesario para la formación de memoria y la respuesta al estrés [373]. BRPF2 es necesario para la activación transcripcional de genes reguladores del desarrollo eritroide y requerido para la eritropoyesis en hígado fetal [257]. La metiltransferasa ASH1L regula los genes HOX [374] que codifican factores de transcripción que controlan la angiogénesis, la motilidad, la apoptosis, la diferenciación y la señalización por receptor durante la hematopoyesis y otros procesos del desarrollo [150,375]. BRD3 está involucrado en la eritropoyesis [376]. También se ha sugerido que BRD2 y BRD4 pueden tener funciones no redundantes en la expresión de genes eritroides [377]). BRDT es un regulador esencial en la espermatogénesis y en la diferenciación de las células germinales

masculinas [378] y mutaciones en sus BRDs producen esterilidad [379], pudiendo ser dianas válidas para la contracepción masculina [150,380]. Finalmente, BRWD1 parece que desempeña un papel crucial tanto en la espermatogénesis como oogénesis [339,381].

Impacto de proteínas BRD durante el desarrollo de ratón			
Gen	Modelo	Efecto	Referencias
Brd2	KO	Letal embrionario E11.5	361
Brd4	KO	Letal embrionario E5.5-E6.0	362
Brpf1	KO	Letal embrionario E9.5	363
Crebbp (Cbp)	KO	Letal embrionario E10.5-E12.5	364
Ep300	KO	Letal embrionario E9.0-E11.5	365
Gcn5L2	KO	Letal embrionario E8.5	366,367
Bptf	KO	Letal embrionario E7.5-E8.5	107
Smarca4	KO	Letal embrionario ~E5.0	368
Trim33	KO	Letal embrionario E8.0	370
Pbrm1	KO	Defectos en desarrollo cardíaco a partir de E11.5	371
Cerc2	KO	Defectos en el desarrollo del tubo neural con exencefalia	372
Pcaf	KO	Capacidades memorísticas y respuesta al estrés alteradas	373
Brpf2 (Brd1)	KO	Anemia severa por eritropoyesis hepática fetal defectuosa	257
Brdt	Mutante actividad BRD	Esterilidad masculina	379
Brdw1	KO	Defectos en espermatogénesis, oogénesis, transición oocito-embrión y estabilidad cromosómica meiótica femenina	339,381

Tabla I1. Funciones conocidas de proteínas BRD en desarrollo. Gen: nombre oficial del gen codificante de proteína BRD. Modelo: aproximación metodológica para el estudio de la función BRD en desarrollo murino. Efecto: fenotipo reportado durante desarrollo para la pérdida de función indicada. Se indica el día de desarrollo embrionario tras fecundación.

2.7.2 Los BRDs en pluripotencia

A pesar de la importancia de las proteínas BRD en el control de la expresión génica, nuestro conocimiento sobre las funciones de esta compleja familia de proteínas sobre los programas moleculares que intervienen en el control de pluripotencia, incluyendo su adquisición, mantenimiento y diferenciación, dista mucho de ser completo. Además,

la mayoría de los estudios realizados hasta el presente sobre proteínas individuales BRD en este campo de estudio no discriminan entre funciones dependientes o independientes de actividad "lectora" BRD. Entre las proteínas BRD más estudiados hasta el inicio de esta tesis doctoral en el contexto de pluripotencia se encuentran varios miembros del grupo Ia de HATs, del grupo IIa de factores remodeladores de cromatina pertenecientes a los complejos SWI/SNF, del grupo IV de proteinasas ATPasas AAA y del grupo V de coactivadores transcripcionales BET.

Se ha observado que la inhibición de los BRDs de CBP y EP300 con I-CBP112 o CBP30 aumenta la eficiencia de reprogramación con OSKM en presencia de inhibidores de DOT1L [99]. Estos hallazgos sugieren un papel central de CBP/EP300 en el control de la toma de decisiones de identidad celular, pero todavía se desconoce cómo se organizan estas funciones dependientes de actividad lectora BRD o independiente de la misma mediada por la actividad HAT.

Se sabe que el complejo SWI/SNF es un componente de la red transcripcional de pluripotencia central en ESCs que juega un papel esencial en el control de la proliferación y diferenciación celular y que facilita la reprogramación celular mediada por SCR OSKM [382]. Se ha descrito que varios miembros BRD de este complejo (SMARCA2, SMARCA4 y BAF180) pertenecen también a un complejo específico de ESCs denominado NODE (*Nanog and Oct4-associated deacetylase*) que se encarga de la regulación transcripcional de los genes asociados a desarrollo [106]. Por otro lado, as ESCs presentan un complejo BAF con una composición especial de subunidades no vista en otros tipos celulares denominado esBAF [383,384]. En este complejo esBAFs, la pérdida de SMARCA4 altera la sincronización de la replicación [385]. Además, este complejo parece actuar en un estadio intermedio de la SCR ende fibroblastos y se ha comprobado que la transducción de SMARCA4 junto a OSKM u OSK aumentan la eficiencia del proceso [382]. Además, en este complejo esBAF BRD7 parece ser indispensable para la activación y represión génica y la proliferación en ESCs [107,386].

ATAD2, un miembro de la familia IV de BRDs, es un modulador muy importante facilitando la dinámica de la cromatina en ESCs de manera generalista [387], debido a su dominio AAA [150].

Finalmente, con respecto a los miembros del grupo V de coactivadores transcripcionales BET, el más estudiado ha sido BRD4. Se ha demostrado que BRD4 interactúa con OCT4 y juega papeles críticos en el mantenimiento de pluripotencia [388] y en la identidad de las células troncales mediante la promoción de la transcripción de los genes de pluripotencia asociados a superpotenciadores [224,389]. En cuanto a BRD3, se ha identificado en humanos una isoforma truncada de esta proteína, denominada BRD3R, con diferente actividad de unión a Kac de las histonas [170]. Esta variante de *splicing* alternativo (sin dominio ET), actúa como un factor de reprogramación mediante la regulación al alza de genes mitóticos [170].

Aunque el papel de la familia de proteínas en reprogramación y mantenimiento de la pluripotencia se encontraba en sus inicios al comienzo de esta tesis doctoral, numerosas evidencias científicas han surgido a lo largo de estos años mostrando funciones esenciales de varios miembros BRD en este campo de estudio. Por esto, varios de estos trabajos serán referidos y discutidos de manera acorde a lo largo de este trabajo de investigación.

3. OBJETIVOS E IMPACTO

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El presente proyecto de tesis doctoral pretende diseccionar nuevos mecanismos transcripcionales y epigenéticos subyacentes a la inducción de pluripotencia. Más concretamente, *la meta principal de este trabajo consiste en entender cómo la actividad BRD que reconoce acetilación en residuos de lisisna (Kac) participa en el proceso de reprogramación y pluripotencia.*

Numerosas evidencias científicas indican que la función de reconocimiento BRD-Kac durante reprogramación y pluripotencia desempeña funciones importantes en el control de la expresión génica en diversos contextos fisiológicos y patológicos. *La hipótesis de partida es que el reconocimiento BRD-Kac es un mecanismo clave para la generación eficiente y segura de iPSCs.*

En este trabajo de investigación se realizará un estudio exhaustivo del mecanismo molecular subyacente a la actividad de reconocimiento BRD-Kac durante la generación de iPSCs, con especial foco en el papel de la actividad BRD en la composición de la cromatina y la regulación transcripcional, y cómo esta actividad influye en el control de destino celular. Con este fin, el presente trabajo fue diseñado con cuatro objetivos principales que se enumeran a continuación.

Objetivo 1: Identificar el impacto de la actividad BRD en reprogramación.

Mediante cribados químicos, se identificarán el efecto de actividades BRD durante la generación eficiente de iPSCs. Para esto, se llevarán a cabo ensayos de reprogramación en presencia de inhibidores tanto de la actividad BRD global como de inhibidores ligandos específicos de BRDs concretos presentes en las distintas familias de proteínas que los contienen.

Objetivo 2: Establecer la conexión física entre actividad BRD, estado de la cromatina y regulación transcripcional.

Nuestra hipótesis de partida es que la actividad de alguno o varios de los miembros de las distintas familias de BRDs resulta imprescindible en la regulación apropiada de la cromatina y control de la expresión génica que interviene durante la toma de decisiones celulares en

reprogramación. Para este fin, se utilizará una amplia variedad de aproximaciones celulares y moleculares, así como análisis ómicos y bioinformáticos.

Objetivo 3: Diseccionar los mecanismos de acción específicos de proteínas BRD en reprogramación

Nosotros hipotetizamos que incluso proteínas BRD de la misma familia podrían ejercer funciones específicas en la inducción de pluripotencia. Para examinar la función específica de proteínas BRD con actividad esencial en reprogramación identificados en el objetivo 2, se utilizarán ensayos de ganancia y pérdida de función de manera conjunta con una amplia variedad de técnicas moleculares y ensayos celulares.

Objetivo 4: Analizar el efecto de la actividad BRD en el mantenimiento de pluripotencia.

Teniendo en cuenta la complejidad de los programas moleculares que gobiernan la reprogramación y los que controlan la pluripotencia, nuestra hipótesis de partida se enmarca en la posible existencia de mecanismos alternativos, compensatorios o diferenciales entre ambos procesos. Por esto, se estudiará el impacto de la actividad BRD-Kac global y específica identificada en objetivos 2 y 3 sobre la capacidad de autorrenovación de iPSCs y ESCs. Para este fin, se utilizarán manipulaciones químicas y genéticas combinadas con una amplia variedad de técnicas estándar en el campo de pluripotencia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 REACTIVOS Y KITS

Todos los reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron de grado de investigación. Los reactivos utilizados aquí se indican en la **Tabla Suplementaria 1**. Las concentraciones utilizadas para cada tratamiento se indican en las correspondientes secciones de este apartado y a lo largo de Resultados. Los kits utilizados a lo largo de este estudio se indican en la **Tabla Suplementaria 2**.

4.2 MODELOS EXPERIMENTALES

Modelos Experimentales: Líneas Celulares		
NOMBRE	FUENTE	IDENTIF.
iOSKM MEF (fibroblastos embrionarios murinos)	Dr. Jianlong Wang (Columbia Univ., USA)	n/a
Oct4-GFP MEF (fibroblastos embrionarios murinos)	Dr. Jianlong Wang (Columbia Univ., USA)	n/a
NSO4G (células progenitoras neurales)	Dr. Jianlong Wang (Columbia Univ., USA)	n/a
CCE (ESCs murinas)	Dr. Jianlong Wang (Columbia Univ., USA)	n/a
J1 (ESCs murinas)	ATCC	SCRC-1010
Oct4-ΔPE-GFP (ESCs murinas)	Dr. Jianlong Wang (Columbia Univ., USA)	n/a
Nanog-GFP (ESCs murinas)	Dr. Konrad Hochedlinger (Harvard Univ., USA)	n/a
NG4 (ESCs murinas)	Dr. Christoph Schaniel (ISMMS, USA)	n/a
rOSKMN TNGA (pre-iPSCs murinas)	Este estudio	n/a
rOKMN NSO4G (pre-iPSCs murinas)	Este estudio	n/a
Brd2 KO (pre-iPSCs murinas)	Este estudio	n/a
Brd3 KO (pre-iPSCs murinas)	Este estudio	n/a
Brd4 KO (pre-iPSCs murinas)	Este estudio	n/a
HEK293T	ATCC	CRL-3216
Plat-E	Cell Biolabs	RV-101

O4G-MEF. Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés) conteniendo un transgén reportero estabilizador de la proteína

verde fluorescente (eGFP, por sus siglas en inglés) bajo el control de la expresión del gen *Oct4*.

iOSKM MEFs. MEFs con sistema inducible de reprogramación OSKM en presencia de doxiciclina (Col1a1-tetO-OSKM).

NSO4G. Células progenitoras neurales conteniendo un transgén reportero eGFP bajo el control de la expresión del gen *Oct4*.

rOKMN. Células parcialmente reprogramadas (referidas como pre-iPSCs) obtenidas a partir de la población negativa para OCT4 de NSO4G transducidas con OKM y NANOG (N).

rOSKMN. Células parcialmente reprogramadas (pre-iPSCs) obtenidas a partir de la población negativa para *Nanog*-GFP de TNGA MEFs transducidos con OSKMN.

rOKMN KO. Se generaron líneas pre-iPSC *knock out* para los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* mediante tecnología CRISPR-Cas9.

Células troncales embrionarias de ratón (ESCs). En este estudio se utilizaron las líneas CCE y J1.

ESCs con reporteros. Se utilizaron líneas ***Nanog*-GFP** y **NG4** con reportero GFP bajo el control del gen *Nanog*, y la línea *Oct4*-ΔPE-GFP con un reportero GFP bajo el control del potenciador distal del gen *Oct4*.

Hek293T. Células de Riñón Embrionario Humano 293T transfectadas de manera estable con el antígeno largo T de SV40. Esta línea celular es competente para replicar vectores que portan la región de replicación SV40. Esta línea produce titulaciones altas cuando es utilizada para generar retrovirus. Estas células fueron utilizadas para la generación de partículas lentivirales conteniendo shARNs contenidos en el vector pLKO.pim

Plat-E (*The Platinum Retroviral Packaging Cells*). Esta línea está basada en la línea 293T. Exhibe una estabilidad más larga y produce

mayores cantidades de proteínas estructurales retrovirales. Estas células contienen los genes Gag, Pol y Env, permitiendo el empaquetamiento lentiviral con transfección de plásmido único. Estas células fueron utilizadas para la producción de partículas retrovirales conteniendo factores de reprogramación.

4.3 CULTIVO CELULAR

Medio somático. Este medio utilizado para el cultivo celular de MEFs, Kek293T y Plat-E contiene un 88% de DMEM alto en glucosa (Sigma-Aldrich, D6429), un 10% de FBS (Gibco™, 10270106) inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco™, 15140122) y 2mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich, G7513).

Medio pluripotente SL. Este medio contiene un 80% de DMEM alto en glucosa (Sigma-Aldrich, D6429), 15% de FBS inactivado por calor (Gibco™, 10270106) ,100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina (Gibco™, 15140122), 1% de mezcla de nucleósidos (Sigma-Aldrich: Adenosine, A4036; Guanosine, G6264, Uridine, U3003; Cytidine, C4654; Thymidine, T1895), 2mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich, G7513), 100µM de aminoácidos no esenciales (Gibco™, 11140050) 8ng/mL 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M6250) y factor inhibidor de leucemia recombinante (rLIF) (producido en el laboratorio y testado para un mantenimiento eficiente de la autorrenovación). Este medio se caracteriza por la presencia de suero y la citoquina LIF (referido en este trabajo como medio SL) y es el medio que se utiliza de manera estándar para el mantenimiento y cultivo de células pluripotentes de origen murino (ESC y iPSCs). También se ha utilizado este medio de cultivo para el mantenimiento de pre-iPSCs y durante reprogramación de MEFs a lo largo de este trabajo.

Medio pluripotente SL+2i. Este medio tiene de base el medio SL al que se le añaden los inhibidores de las quinasas Gsk3β (3µM CHIR99021; Sigma-Aldrich, SML1046) y MEK (1 µM PD 0325901; Sigma-Aldrich, PZ0162). Empleado en ensayos de mantenimiento y

adquisición de pluripotencia para evaluar la independencia de la actividad BRD de BET en presencia del inhibidor JQ1.

Medio pluripotente 2iL. Contiene de base el medio N2B27 compuesto de un 50% de DMEM con mezcla de nutrientes F-12 Ham (DME/F-12; Sigma-Aldrich, D6421) y 50% de medio Neurobasal™ (Gibco™, 21103049), suplementado con: 1x B-27 (Gibco™, 17504044), 1x N-2 (Gibco™, 17502048), 2mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, G7513), 110 U/mL de penicilina y 110µg/mL estreptomicina (Gibco™, 15140122) y 9.125ng/mL 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M6250). Para obtener el medio 2iL, este medio N2B27 fue suplementado con 3µM del inhibidor de Gsk3β CHIR99021 (Sigma-Aldrich, SML1046), 1 µM del inhibidor de Mek PD0325901 (Sigma-Aldrich, PZ0162) y rLIF (producido y testado en el laboratorio). Este medio permite ha sido utilizado en los experimentos de reprogramación de pre-iPSCs (rOKM+NANOG, rOKM+ESRRB, rOKM+KLF2 y rOSKM+NANOG).

4.4 TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES QUÍMICOS CONTRA BRDS

A continuación, se muestran los distintos inhibidores contra bromodominios utilizados en este trabajo, así como sus concentraciones en los ensayos de reprogramación y mantenimiento de pluripotencia. La tabla también muestra la proteína o proteínas diana de cada inhibidor en particular.

INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS		
INHIBIDOR	**CONC. TRABAJO**	**PROTEÍNA(S) DIANA**
Bromosporine (BSP)	1 µM	Inhibidor BRD específico de amplio espectro
(+)-JQ1	0,1-0,5 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)
I-BET151	10 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)
PFI-1	2 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)
I-BET762	2 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)
CPI-203	1 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)
CPI-0610	2 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)
MS147	1 µM	Familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT)

OTX015	1 µM	Familia BET (BRD2, BRD3 y BRD4)
ABBV-075	2 µM	Familia BET (BRD2, BRD4 y BRDT)
L Moses dihydrochloride	2 µM	KAT2A (GCN5L2) y KAT2B (PCAF)
SGC-CBP30	2 µM	CREBBP (CBP/p300)
I-CBP112	2 µM	CREBBP (CBP/p300) y EP300
CPI-637	1 µM	CREBBP (CBP/p300) y EP300 (BRD4 BD-1)
PF-CBP1	1 µM	CREBBP (CBP/p300) y EP300
Ischemin sodium salt	10 µM	CREBBP (CBP/p300)
BI-7273	2 µM	BRD9
LP99	2 µM	BRD7 y BRD9
TP-472	2 µM	BRD7 y BRD9
BI-9564	1 µM	BRD9
I-BRD9	0,1 µM	BRD9
OF-1	0,2 µM	BRPF1, BRPF3 y BRD1
NI-57	0,5 µM	BRPF1, BRPF3 y BRD1
PFI-4	1 µM	BRPF1, BRPF3 y BRD1
BAY-299	0,01 µM	BRD1 y TAF1
BAZ2-ICR	2 µM	BAZ2A y BAZ2B
GSK2801	2 µM	BAZ2A y BAZ2B
PFI-3	2 µM	SMARCA2, SMARCA4 y PBRM1

4.5 CLONACIÓN DE VECTORES PLASMÍDICOS

Vectores plasmídicos de sobreexpresión

Para los estudios de ganancia de función de los genes murinos *Nanog*, *Esrrb*, *Klf2*, *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* se utilizó el vector de sobreexpresión PiggyBac (pPB-CAG-3XFLAG-pA-pgk-hph; Addgene, #48753), que contiene el gen de resistencia a Higromicin B para células de mamífero. De manera resumida, las secuencias codificantes de los genes de interés fueron amplificadas a partir de ARN total (para más detalle, ver apartado **4.24**) mediante el uso de oligonucleótidos específicos conteniendo secuencias específicas de enzimas de restricción (**Tabla suplementaria 5**). Posteriormente se clonaron en el vector pJET1.2 utilizando el kit CloneJet PCR cloning (Thermo Scientific™, K1231) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las secuencias

clonadas fueron verificadas por secuenciación Sanger antes de su posterior clonaje en el vector de sobreexpresión *PiggyBac*. La clonación hacia *PiggyBac* se realizó mediante el uso de enzimas de restricción preservando la correcta pauta de lectura tal y como se ha descrito previamente [390].

Vectores plasmídicos de interferencia de ARN

Para los estudios de pérdida de función mediante interferencia de RNA se utilizó el vector pLKO.pim (Addgene, #32682), que contiene el gen de resistencia a puromicina para células de mamífero. De manera resumida, los ARNs de horquilla corta (shRNAs, por sus siglas en inglés) específicos para los genes indicados en la Tabla suplementaria 3 fueron diseñados, sintetizados y subclonados en vectores pLKO.pim tal como se ha descrito previamente [391]. Cada vector conteniendo un shRNAs fue confirmado por secuenciación Sanger. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para elaborar los shRNAs utilizados en este estudio son proporcionadas en la **Tabla suplementaria 5.**

La validación de todos los constructos de sobreexpresión y de pérdida de función obtenidos fue realizada mediante técnicas de *western blot* (para más detalle, ver apartado **4.32**), con el uso de anticuerpos específicos (**Tabla suplementaria 4**), y/o RT-qPCR (para más detalle, ver apartado **4.26**), con oligonucleótidos específicos (**Tabla suplementaria 5**).

4.6 TRANSFORMACIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Obtención de bacterias competentes

Para este fin, se realizó una adaptación de "*Molecular Cloning 3rd edition", por Sambrook y Russell*" (*Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001*). En primer lugar, se preparó el tampón Inoue (MnCl2•4H2O a 55mM, CaCl2•2H2O a 15mM, KCl a 250mM y PIPES 10mM pH 6.7). Una colonia bacteriana fue recogida de una placa previamente incubada a 37ºC por 16-20 horas

y transferida a medio Luria Broth (LB) e incubada durante la noche a 37ºC y 225rpm. Se transfirieron 0.5, 1 y 2mL de cultivo en tres frascos con 100mL de LB y la OD600 de los tres cultivos fue medida hasta que una OD de 0.55 fue alcanzada en uno de los cultivos (descartando los otros dos). El recipiente de cultivo fue transferido a un baño de agua con hielo por 10 minutos. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 4ºC y 2500 x g por 5 minutos. El medio fue vertido y la botella de centrífuga colocada abierta boca abajo sobre toallas de papel durante 2 minutos retirando cualquier resto residual. Las células fueron suavemente resuspendidas en tampón de transformación *Inoue*, previamente enfriado en hielo para luego ser recogidas por centrifugación a 2500 x g y 4ºC por 10 minutos. Tras verter el medio, el tubo de centrífuga fue nuevamente colocado boca abajo sobre toallas de papel durante 2 minutos, asegurándose de retirar cualquier medio residual. Las células fueron nuevamente resuspendidas suavemente en tampón *Inoue* frío. El volumen exacto fue medido y se añadió DMSO para una concentración final del 7%. La suspensión bacteriana fue arremolinada para mezclarla y depositarla en hielo durante 10 minutos. Tras esto, se dispensaron rápidamente alícuotas de 100µL de esta suspensión en tubos de microcentrífuga estériles previamente enfriados y las células competentes fueron inmediatamente congeladas mediante inmersión de los tubos cerrados en un baño de hielo seco y etanol y almacenados luego a -80ºC. La competencia del lote fue testada mediante la transformación de células con cantidades diferentes de plásmidos (ej. pUC19) y su siembra en una placa con el antibiótico específico. La eficiencia se determinó mediante el contaje de colonias resistentes. Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo fueron DH5alpha y STBL3 (esta última se utilizó para disminuir la tasa de recombinación en plásmidos virales).

Transformación de bacterias competentes

El ADN del vector plasmídico de interés fue añadido a la mezcla de células competentes (máximo 10% v/v del volumen de bacterias a transformar). Se mezcló mediante remoción evitando pipeteo para

maximizar la viabilidad celular. Las bacterias en presencia de plásmido fueron incubadas en hielo durante 25 minutos. Luego, las mezclas fueron incubadas a 42ºC durante un minuto en un baño de agua y atemperadas en hielo por 5 minutos. Se añadieron 400µL de S.O.C. a cada muestra y estas fueron incubadas por una hora a 37ºC y 225rmp. Se extendieron 100-200µL de suspensión bacteriana sobre placas para cultivo de bacterias con medio LB sólido suplementado con antibiótico apropiado, según la resistencia contenida en el plásmido, y el resto de las muestras almacenado a 4ºC. Las placas fueron incubadas durante toda la noche (~16h) a 37ºC.

Purificación del ADN plasmídico

Se picaron colonias únicas conteniendo el ADN del vector plasmídico de interés en 8mL medio LB líquido, suplementado con el antibiótico apropiado, a 37ºC y 225rpm. Al día siguiente, se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante el uso del Kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (Sigma-Aldrich, NA0150) siguiendo las instrucciones del fabricante. En caso de ser necesario una mayor cantidad de ADN plasmídico, se procedió a partir de un cultivo 100-150mL en las mismas condiciones indicadas anteriormente. Al día siguiente, se realizó se aisló el ADN plasmídico por medio del kit *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit* (Invitrogen™, K210015) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN plasmídico se determinó mediante espectrometría utilizando un Nanodrop™ 2000 (Fisher Scientific, ND-2000).

4.7 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Los constructos basados en PiggyBac fueron co-transfectados con la transposasa pBASE (proporcionado por Dr. Jose C. Silva, Cambridge University, UK) mediante transfección con *JetPrime® Reagent* (Polyplus Transfection™, 114-07) en pre-iPSCs. De manera resumida, se sembraron 100.000 células por pocillo de MW12 (Corning™, 3513) pretratado con gelatina 0,1% en medio estándar pluripotente SL (para

más detalle, ver apartado **4.3**). 24 horas tras la siembra, el medio fue cambiado por medio fresco y se procedió a realizar el proceso de transfección utilizando *jetPrime*® (Polyplus Transfection™, 114-07): De manera resumida, preparar una solución de *JetPrime*® *Buffer* y añadir 0,8µg de ADN recombinante (0,3µg del constructo basado en *PiggyBac* y 0,5µg de pBASE) en un volumen final de 75µL. Luego, añadir 1.6µL de *jetPrime*® *Reagent* (relación 1:2 ADN/ *JetPrime*®), mezclar e incubar esta mezcla durante 10 min a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés), para luego añadirla gota a gota al medio celular fresco y homogeneizar moviendo la placa. A las cuatro horas, el medio fue retirado y se comenzó la selección con Higromicina B (Corning™, 30-240-CR) hasta que el control de células sin transfectar presentaba un porcentaje de muerte celular del 100%.

4.8 GENERACIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES Y TRANSDUCCIÓN

Generación de partículas lentivirales

Para la generación de las partículas lentivirales conteniendo el ADN recombinante de interés, el constructo conteniendo factores de reprogramación OSKM (pHAGE2-EF1aFull-hOct4-F2A-hKlf4-IRES-hSox2-P2A-hcMyc-W-loxP) o los constructos basados en pLKO junto con los vectores de empaquetamiento lentivirales (psPAX2 y pMD2G) fueron transfectados en las células HEK293T con el reactivo *Polyethylenimine* (PEI) utilizando nuestro protocolo optimizado. De manera resumida, se cultivaron ocho millones de células HEK293T por placa de 150x25mm (Corning™, 430599) en medio somático (ver 4.3). 24 horas tras la siembra, el medio fue cambiado por 30 mL de medio somático fresco. Preparar la solución de transfección consistente en: a) solución JetPei: 16µL de JetPei 5x (Sigma-Aldrich, 408727) en 150mM de NaCl a un volumen final de 1,6 mL; b) solución de ADN recombinante: 40µg (10µg de cada vector de empaquetamiento y 20µg del vector plasmídico de interés) en 1,6 mL de NaCl 450mM; c) Añadir la solución JetPei gota a gota sobre la solución de ADN recombinante (paso crítico: muy importante realizar la mezcla en el orden indicado);

d) agitar de manera suave y centrifugación breve; e) Incubar esta mezcla durante 30 min a RT. Añadir gota a gota la solución de transfección sobre el medio de la placa de 150x25mm. Cambiar el medio somático a las 24 horas tras la transfección. Recolectar el medio de cultivo conteniendo las partículas lentivirales a las 48 y 72 horas después de la transfección por centrifugación. De aquí en adelante realizar todos los sucesivos pasos a 4ºC. Concentrar las partículas lentivirales para ser posteriormente filtrado a través de membranas *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter* Unit (Millipore, UFC9030) mediante centrifugación (3500 x g durante 30 minutos a 4ºC). Almacenar las partículas lentivirales a -80ºC hasta su uso. Evitar ciclos de congelación y descongelación.

Transducción

Las partículas lentivirales obtenidas se usaron para la transducción en los experimentos de reprogramación y pluripotencia. De manera general, se realizó la infección con 150-200 µL de partículas lentivirales concentradas por 50.000 MEFs, 150.000 pre-iPSCs o PSCs (ESCs y iPSCs) por pocillo de placa MW-6. Según el respectivo tipo celular el medio de cultivo adecuado fue suplementado con polibreno (SIGMA-ALDRICH, H9268) a razón de 6µg/mL en el caso de MEFs o 8µg/mL en los otros tipos celulares. El concentrado viral fue añadido y mezclado con las células en suspensión en un volumen final de 1mL del medio de cultivo apropiado y estas células mantenidas en condiciones estándar por 24 horas. Pasado ese tiempo, en el caso de las células transducidas con los shRNA fueron seleccionadas añadiendo 2µg/mL de puromicina al medio de cultivo cada dos días hasta que el porcentaje de muerte celular observada en las células sin infectar alcanzó el 100%.

4.9 GENERACIÓN DE LÍNEAS *KNOCK-OUT* MEDIANTE CRISPR-CAS9

Las líneas pre-iPSCs (rOKMN) con pérfida de función (*knock-out*) para los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* fueron generadas mediante el sistema de edición genómica CRISPR-Cas9. De manera resumida, dos guías ARN (sgRNAs, por sus siglas en inglés) independientes por gen (**Tabla**

suplementaria 6) fueron diseñadas y sintetizadas para dirigirse al lugar de inicio de transcripción de *Brd2, Brd3 o Brd4*, utilizando las pautas descritas en la herramienta de libre acceso del grupo del Dr. Zhang del MIT (EEUU) (https://zlab.bio/guide-design-resources). Su posterior clonación se realizó en el vector pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene, #62988). Una vez validadas las secuencias clonadas por secuenciación Sanger, las pre-iPSCs fueron transfectadas con el plásmido conteniendo cada sgRNA y seleccionadas de manera transitoria en presencia de 2 µg de puromicina durante 48 horas (para más detalle, ver sección **4.7**). La validación de las líneas generadas fue realizada mediante la técnica de *western blot* (para más detalle, ver apartado **4.32**) con el uso de anticuerpos específicos contra BRD2, BRD3 y BRD4 (**Tabla suplementaria 4**).

4.10 ENSAYOS DE REPROGRAMACIÓN EN FIBROBLASTOS

Para los ensayos de reprogramación realizados en MEFs en este estudio con los cuatro "factores de Yamanaka" (OSKM) se utilizaron las siguientes dos aproximaciones complementarias:

1.-Sistema de reprogramación OSKM inducible

Para este fin, se utilizaron las células somáticas iOSKM MEFs (para más detalle, ver apartado **4.2**) que contienen un casete OSKM (Col1a1-tetO-OSKM) que se activa en presencia de doxiciclina (SantaCruz Biotechnology, sc-337691). De modo resumido, 50.000 células se sembraron por pocillo de MW-6, pretratados con gelatina al 0.1% (Sigma-Aldrich, G9391), en medio somático fresco (para más detalle, ver apartado **4.3**). Al día siguiente, el medio fue reemplazado por medio de reprogramación consistente en medio pluripotente SL (para más detalle, ver apartado **4.3**) en presencia de 2 µg/mL de doxiciclina (Dox). Cada 48 h el medio pluripotente SL conteniendo Dox fue reemplazado hasta el final del proceso de reprogramación. El número de colonias iPSCs generadas se estimó mediante contaje de colonias positivas para el marcador de pluripotencia fosfatasa alcalina (para más detalle, ver apartado **4.12**).

2.- Sistema de reprogramación OSKM constitutivo

Para este fin, se utilizaron células somáticas O4G-MEFs (para más detalle, ver apartado **4.2**), que contienen un reportero GFP bajo el control del gen *Oct4*. De manera resumida, 20.000 células fueron sembradas por pocillo de placa MW-12 (Corning™, 3513), pretratados con gelatina al 0.1% y cultivados en medio somático (para más detalle, ver apartado **4.3**). Al siguiente día, los fibroblastos se infectaron en presencia de 6ug/mL de polibreno (Sigma-Aldrich, H9268) con partículas lentivirales concentradas conteniendo OSKM generadas a partir del vector de reprogramación pHAGE2-EF1aFull-hOct4-F2A-hKlf4-IRES-hSox2-P2A-hcMyc-W-loxP) (para más detalle ver apartado **4.8**). Veinticuatro horas tras la infección, el medio fue remplazado por medio pluripotente SL (para más detalle, ver apartado **4.3**). A lo largo del proceso de reprogramación el medio pluripotente SL fue reemplazado cada 48 h. La valoración de la eficiencia de reprogramación se realizó mediante contaje de colonias positivas para *Oct4*-GFP por microscopía de fluorescencia y/o mediante citometría de flujo (para más detalle, ver apartado **4.14**).

4.11 ENSAYOS DE REPROGRAMACIÓN EN PRE-IPSCS

Para los estudios de reprogramación sobre intermediarios avanzados de reprogramación (referidos de aquí en adelante como pre-iPSCs) obtenidos a partir de MEFs con rOSKM o progenitores neurales con rOSK (para más detalle, ver apartado **4.2**) tal como se describió previamente [390]. De manera resumida, 50.000 o 100.000 células rOKM (+NANOG, +ESRRB o+KLF2) o rOSKM (+NANOG) fueron sembradas en placas pocillos de placa MW-12 pretratados con 0.1% de gelatina en medio pluripotente SL (para más detalle, ver apartado **4.3**). Tras 24 horas en condiciones estándar, el medio de cultivo fue cambiado por medio fresco pluripotente SL, medio pluripotente SL+2i (para más detalle, ver apartado **4.3**). El medio de cultivo fue cambiado cada 24h o 48h y la eficiencia de reprogramación se valoró mediante el contaje de colonias positivas para Oct4-GFP (rOKM) o Nanog-GFP

(rOSKM) por microscopía de fluorescencia y/o mediante citometría de flujo (para más detalle, ver apartado **4.14**).

4.12 DETECCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA

La actividad fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés) en las células analizadas fue ensayada mediante tinción para dicho marcador utilizando *Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit* (Sigma-Aldrich, 86R) y siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones propias. Brevemente, antes de comenzar con la tinción AP se prepararon las soluciones requeridas (ver tabla de abajo). Las placas de cultivo a teñir fueron enjuagadas con DPBS 1x completo con Ca^{+2} y Mg^{+2} (Sigma-Aldrich, D8662) y fijadas con la solución de fijación durante 30 seg a RT. Luego lavadas con agua desionizada durante 1 min a RT. Las células se incubaron con solución de tinción durante 15 min a RT en oscuridad. Finalmente se realizó un lavado con agua desionizada durante 2 min a RT, para proceder finalmente con el secado de esta.

SOLUCIÓN DE FIJACIÓN (Volumen para 1xplaca de 6 pocillos)	
REACTIVO	VOLUMEN (mL)
Citrate	2,5
Acetona	6,5
Formaldehydo 37%	0,8
SOLUCIÓN DE TINCIÓN (Volumen para 1xplaca de 6 pocillos)	
REACTIVO	VOLUMEN (mL)
Sodium Nitrite Solution	0,2
FRV-Alkaline Solution	0,2
Mezclar mediante inversión suave. Dejar reposar por 2 minutos y añadirlo al agua.	
Agua desionizada	9
Mezclar enérgicamente	
Naphthol AS-BI Alkaline Solution	0,2

4.13 ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS PLURIPOTENTES

Para analizar el efecto del tratamiento con JQ1 con distintas condiciones de cultivo en la capacidad de autorrenovación de células pluripotentes (ESCs y iPSCs) se utilizó el ensayo de formación de colonias (CFA, por sus siglas en inglés), un ensayo estándar en el campo de pluripotencia, siguiendo las condiciones previamente descritas [130]. De manera resumida, se sembraron las células pluripotentes (ESCs o iPSCs) a baja densidad con 800 células por pocillo de MW-6 pretratados con gelatina 0.1% y en medio pluripotente SL (para más detalle, ver apartado **4.2**). 24 h más tarde, el medio fue cambiado los distintos medios pluripotentes ensayados (SL, SL+2i y 2iL) (para más detalle, ver apartado **4.2**) en presencia de 100 nM de JQ1 o DMSO como vehículo. Los medios fueron cambiados cada 48 h manteniendo las mismas condiciones. Tras 6 días de cultivo, las células fueron teñidas para detectar la actividad AP (para más detalle, ver apartado **4.12**) como marcador de pluripotencia y las colonias fueron clasificadas como: indiferenciadas (positivas para AP), parcialmente diferenciadas (de media a baja señal AP) y diferenciadas (tinción negativa para AP). Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado para cada condición experimental.

4.14 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), las células analizadas por citometría de flujo se individualizaron mediante Tripsina-EDTA 0.05% (Sigma-Aldrich, T3924) y posterior inactivación con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) (Gibco™, 10270106). Luego, se recolectaron mediante centrifugación durante 5 min a 300 x g a RT. Tras la inactivación de la tripsina, los pellets celulares fueron lavados con DPBS 1x (Corning™, 21-031-CV) y centrifugados nuevamente con los mismos parámetros. Las células contenidas en los pellets fueron individualizadas en 1 mL de DPBS mediante pipeteo suave y posteriormente se recolectaron en tubo con tamiz 35 µm (Falcon®, 352235). La suspensión celular se

mantuvo en hielo hasta su análisis por la técnica de FACS mediante un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences) o Accuri C6 (BD Biosciences). Las células con marcaje fluorescente fueron analizadas mediante la adquisición de 10.000-20.000 eventos totales y según los parámetros requeridos teniendo en cuenta el apropiado espectro de absorción/emisión. En todos los casos, se emplearon células sin marcaje fluorescente como controles negativos. Los datos recogidos por FACS se analizaron mediante el software FlowJo (v7.6.1) (para más detalle, ver apartado **4.35**).

4.15 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Para el análisis del ciclo celular entre condiciones diferentes se utilizó el mismo número de células individualizadas y se procedió a su permeabilización 0.1% (v/v) de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, G9391) en DPBS 1x, y se marcó el contenido de ADN con 10µM de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, D9542) durante 10 min a RT. La determinación del porcentaje de células en las fases G1, S y G2-M del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo (para más detalle, ver apartado **4.14**) y posterior análisis de los datos obtenidos con el software FlowJo (v7.6.1) utilizando el modelo de ciclo Dean-Jett-Fox.

4.16 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR MTT

Se infirió el porcentaje de proliferación celular a través del ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) [392], que determina el posible efecto citotóxico de un tratamiento químico basado en la reducción metabólica de este compuesto por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células tratadas en otro compuesto coloreado de color azul (formazan). La cantidad de células proliferando (células vivas) es proporcional a la cantidad producida de formazan. De manera resumida, se sembraron 5.000 células (somáticas, pre-iPSCs o pluripotentes) por pocillo de MW-96. Tras 48 h en presencia del compuesto químico ensayado se añadió un 10% de MTT (Sigma-Aldrich, M5655) y se incubaron las células durante 4 horas a

37ºC en oscuridad. Al finalizar la incubación, la absorbancia fue medida a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 650 nm y corregida por la absorbancia del blanco (pocillos sin células, incubados con medio) mediante un lector de placa Mithras LB 940 (Berthol Thecnologies).

4.17 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR

Ensayo de exclusión por DAPI

De manera resumida, las células individualizadas sin permeabilizar fueron incubadas durante 10 min a RT en presencia de 1µM de DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) en DPBS 1x con 0,5% de FBS. El porcentaje de muerte celular (células positivas para DAPI) fue determinado por citometría de flujo (para más detalle, ver apartado **4.14**) y posterior análisis con el software FlowJo (v7.6.1).

Ensayo de exclusión por azul tripán

De manera resumida, las células individualizadas fueron incubadas durante 2 min a temperatura ambiente en presencia de solución de azul de tripán al 0,08% (Amresco, K940). El porcentaje de células vivas comparado a células muertas (teñidas de azul) se calculó por contaje en el microscopio utilizando una cámara de Neubauer (Hirschmann™, 8100103).

4.18 INMUNOFLUORESCENCIA

De manera resumida, los diferentes tipos celulares analizados fueron primeramente fijadas con paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, P6148) en solución al 4% (p/v) durante 15 min a RT y en oscuridad. Tras esto, las células fueron permeabilizadas con un 0.25% (v/v) de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, G9391) en DPBS 1x durante 5 min a RT. Luego, se procedió a bloquearlas con un 10% de BSA (Fisher BioReagents™, BP1605) en DPBS 1x durante 30 min a 37ºC. La inmunotinción fue llevaba a cabo mediante la incubación durante toda la noche a 4ºC en presencia de los anticuerpos primarios (**Tabla**

suplementaria 4) diluidos en BSA 3% en DPBS 1x. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 15 min a RT con DPBS 1x. La detección de los inmunocomplejos se realizó con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos (**Tabla suplementaria 4**) y 1µM de DAPI durante 1 h a RT. Las células fueron visualizadas con un microscopio invertido Leica DMI 6000 (Leica Microsystems), con las magnificaciones apropiadas dependiendo del ensayo, y el software LAS X (Leica Microsystems).

4.19 INMUNOFLUORESCENCIA CUANTITATIVA DE CÉLULA ÚNICA

Para medir los niveles de fluorescencia de manera cuantitativa por célula individual se utilizaron condiciones similares a las descritas anteriormente [130]. De manera resumida, se sembraron 3.000 células por pocillo de MW-48 y al día siguiente se procedió a realizar el ensayo de inmunofluorescencia (para más detalle, ver apartado **4.18**) con los anticuerpos apropiados (**Tabla suplentaria 4**). Las inmunotinciones fueron visualizadas y fotografiadas con un microscopio invertido Leica DMI 6000 (Leica Microsystems) con magnificaciones de 10x y 20x, manteniendo los mismos parámetros de adquisición y autofoco para todas las imágenes a comparar. La intensidad de la señal de estas imágenes fue luego corregida de manera homogénea para el conjunto, utilizando el programa LAS X Life Science (Leica Microsystems). Las imágenes obtenidas fueron finalmente analizadas de manera individual mediante el software de análisis de imagen CellProfiler™ 2.1.1 (https://cellprofiler.org/). Para la cuantificación de cada marcador, las imágenes fueron cargadas de manera individual en el programa y agrupadas por este según la condición experimental. Luego se convirtieron a imagen las intensidades de la señal del anticuerpo específico (en el canal correspondiente distinto al canal de DAPI) y la de DAPI (canal propio). Posteriormente, se establecieron los núcleos como objeto primario a identificar mediante su asociación con la imagen obtenida a partir de la intensidad de DAPI (*Input image from ColorToGray:* DAPI) y adecuando los píxeles de captura de objeto

primario con el tamaño del núcleo (*Primary Objects to be idenfitied=Nuclei, Typical diameter of objects*=20-70), previamente asociado con la señal DAPI (*Iput image from ColorToGray:* DAPI). Finalmente, se correlacionan las otras señales de fluorescencia (no azul) para medir los niveles de intensidad en la señal de anticuerpo analizado *(Object= Color no azul=Proteína marcada)*. Los resultados obtenidos del procesamiento de las imágenes por el CellProfiler™ 2.1.1, fueron importados a Microsoft Excel (Microsoft), dónde la intensidad de la señal anticuerpo-específica de cada célula fue corregido por su valor de DAPI, obteniendo el valor relativo de fluorescencia específico detectado para esa célula.

4.20 ESTIMACIÓN DEL DAÑO EN ADN

La activación mediante fosforilación en residuo de serina 139 de la variante de histona H2AX (representada como γH2AX) se produce como primera respuesta a las roturas en cadena doble de ADN (DSB, por sus siglas en inglés), que constituyen una de las lesiones en el ADN más críticas con respecto a la integridad genómica (PMID: 18610740). Por esto, como medida de estimación indirecta del daño en el ADN que se produce en pre-iPSCs tratadas durante 24 h con JQ1 0,5 µM, se utilizó la técnica de cuantitativa de célula única con el uso de un anticuerpo específico contra γH2AX (Abcam, ab81299) siguiendo las condiciones anteriormente indicadas (para más detalle, ver apartado **4.19**).

4.21 ANÁLISIS DEL GRADO DE COMPACTACIÓN NUCLEAR

El análisis del grado de compactación nuclear, en los contextos celulares y condiciones de tratamiento indicadas a lo largo de este estudio, se realizó a partir de la determinación de la visualización del contenido de ADN nuclear mediante tinción con DAPI (para más detalle, ver apartado **4.18**). Los núcleos celulares teñidos con DAPI fueron visualizados y fotografiados de manera aleatoria con un microscopio invertido Leica DMI 6000 (Leica Microsystems), utilizando magnificaciones de 10x con los mismos parámetros de adquisición y autofoco del microscopio. para todas las imágenes. Las

imágenes obtenidas se analizaron mediante el software de análisis de imagen CellProfiler™ 2.1.1 (https://cellprofiler.org/). Se adecuaron los píxeles de captura de objeto primario con el tamaño del núcleo obtenido mediante la conversión a imagen de la intensidad de DAPI ce cada célula individualizada (para más detalle, ver apartado **4.19**). Se estableció el diámetro nuclear (*Nuclei Diameter*) y el grado de compactación nuclear (*Nuclei Compactness*), ofrecido por el CellProfiler™ 2.1.1 y delimitado por el propio programa como valor de la medida de tamaño nuclear y el grado de compactación respectivamente para cada una de las células individuales. Los resultados obtenidos del procesamiento de las imágenes por el CellProfiler™ 2.1.1, fueron importados en *Microsoft Excel* para su tratamiento. Posteriormente, se calcularon los valores de densidad nucleares de cada población en base a dicho valor utilizando el programa GraphPad Prism (v8.0.2).

4.22 ENSAYO DE ACCESIBILIDAD EN LA CROMATINA

Para valorar el impacto de la inhibición de actividad BRD de BET en la accesibilidad a la cromatina, $1x10^6$ pre-iPSCs fueron sembradas en placa de 100mm (Corning™, 3548) pretratadas con 0.1% gelatina y mantenidas por 24 h en condiciones de cultivo pluripotente SL (para más detalle, ver apartado **4.3**). Luego, las células fueron tratadas con vehículo DMSO o 0,5µM de JQ1 durante 24 h en medio pluripotente SL fresco. 48 horas tras la siembra, las células fueron individualizadas y repartidas en alícuotas de un millón de células para analizar el grado de accesibilidad en cromatina mediante el ensayo de micrococo nucleasa utilizando el *EZ Nucleosomal DNA Prep Kit* (Zymo Research, D5220) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon concentraciones de 0,1, 0,25 y 5 unidades de micrococo nucleasa durante 5 min para las células tratadas con JQ1 o DMSO. De manera resumida, $1x10^6$ células por condición se lavaron con DPBS 1x. Una vez retirado el sobrenadante se procedió al aislamiento de sus núcleos a 4ºC y con tampones fríos. 10µL de *Nuclei Prep Buffer* fueron añadidos al pellet celular que fue resuspendido mediante pipeteo suave. Tras una incubación de 5 min, los núcleos fueron peleteados por

centrifugación y el sobrenadante descartado. Los pellets celulares fueron lavados con *Atlantis Digestion Buffer* y los tubos invertidos suavemente 2-3 veces para ser nuevamente centrifugados. Tras repetir el paso de lavado, los núcleos precipitados fueron resuspendidos mediante la adición de 10µL de *MN Digestion Buffer* y DMSO o tratamiento enzimático con micrococo nucleasa usando 0,1, 0,25 y 0.5 unidades de la enzima. Los componentes fueron suavemente mezclados y la reacción se dejó incubar durante 5 min a RT, tras lo cual, la reacción fue parada mediante la adición *5X Stop Buffer*. Los componentes fueron mezclados y se procedió al aislamiento del ADN nucleosomal. Primeramente, un volumen relación 5:1 de DNA *Binding Buffer* fue añadido la reacción de "parada", los componentes mezclados por vórtex y la mezcla cargada en un *Collection Tube* dentro de una columna *Zymo-Spin™ IICR Column*. Luego, se centrifugaron los componentes por 30 seg. El filtrado fue descartado y la columna lavada con *DNA Wash Buffer* y centrifugado por 30 seg y se descartó el filtrado. Tras repetir el lavado, la columna fue transferida a un nuevo tubo limpio y procedió con el paso de elución mediante la adición de 30µL de *DNA Elution* Buffer a la matriz de la columna. Tras 1 min a RT, se procedió al paso final de centrifugación durante 30 seg. El ADN nucleosomal recogido fue almacenado a -20ºC hasta su uso. La visualización del grado de accesibilidad en la cromatina se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio (Fisher Bioreagents, BP1302-10).

4.23 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Para la extracción y purificación de ADN de alta calidad a partir de célula en cultivo se utilizó *Centra Puregene Cell Kit (*Qiagen, 158388) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. De manera resumida, $1x10^6$ células fueron resuspendidas en 200µL *Cell Lysis Solution* (Qiagen, 158908) e incubadas durante 1 h hora a RT para romper agregados celulares. Luego se procedió al tratamiento de esta solución con 3µL RNAse A (1 mg/ml) (Thermo Scientific™, EN0531) durante 1 h a 37ºC. Las muestras fueron llevadas a RT y se añadieron

200µL de *Protein Precipitation Solution* (Qiagen, 158912). Las muestras fueron centrifugadas a 14.000xg durante 3 min a RT para precipitar las proteínas y el sobrenadante transferido a un nuevo tubo precargado con 200µL 2-propanol, donde el contenido fue mezclado mediante inversión. Tras centrifugar las muestras a 14.000xg durante 5 min a RT, el sobrenadante fue retirado, dejando el pellet ADN lo más seco posible. Se añadió 266,6µL de etanol al 70% y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y transcurrido el tiempo se descartó, dejando secar las muestras sin que se deshidraten por completo. Luego, se añadió 66µL DNA *Hydration Solution* (Qiagen, 158916) sobre los pellets. Las muestras se incubaron a 65ºC durante 1-2 h y se dejaron rehidratándose toda la noche a RT, para finalmente ser almacenadas a 4ºC hasta su uso. 200µL. La concentración del ADN se determinó mediante espectrometría con un Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific™, ND-2000).

4.24 EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN de las células analizadas en las distintas condiciones a lo largo de este trabajo de tesis fue obtenido mediante el uso de un kit comercial *E.Z.N.A.® Total RNA I Kit* (Omega Bio-Tek, R6834-02) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para obtener ARN total, incluyendo pequeños ARNs, se empleó extracción fenol-cloroformo a partir de células lisadas con reactivo TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, 15596026) utilizando tubos especiales de extracción pura de ARN Phasemaker™ (Phasemaker™, A33248), y se siguieron condiciones optimizadas para este fin [393]. La concentración del ARN extraído y su calidad (una ratio de A260/280 aproximado a 2 es considerado ARN puro) se analizaron mediante espectrometría a través de NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™, ND-2000) y/o mediante Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen™, Q33226) utilizando kit de detección de alta sensibilidad (Qubit RNA HS Assay Kit; Invitrogen™, Q32855) y kit de valoración de integridad (Qubit RNA IQ Assay Kit; Invitrogen™, Q33222).

4.25 OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO

Para la obtención de ADN complementario (cDNA, por sus siglas en inglés), los ARN fueron retrotranscritos utilizando el kit *qScript® cDNA SuperMix* (Quanta, 95048). De manera resumida, un total de 500-750ng de ARN fueron mezclados con el *qScript® cDNA SuperMix* y agua ultrapura libre de endonucleasas (Invitrogen™, 10977035) de necesitarlo. Los componentes fueron mezclados y las muestras sometidas a centrifugación breve. Finalmente, se realizó la transcripción reversa de las muestras de ARN mediante la técnica de transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) utilizando un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems™, A24811) con las siguientes condiciones:

Temperatura (C°)	Tiempo (min)
25	5
42	30
85	5
4°C	∞

4.26 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR

La detección y cuantificación de los cambios de expresión génica a partir del cDNA obtenido (para más detalle, ver apartado **4.25**) se efectuó mediante transcripción reversa en cadena cuantitativa de la polimerasa (RT-qPCRm, por sus siglas en inglés). Para este fin se utilizó *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems™, A25742), mezcla de oligonucleótidos específicos (F y R) para los transcritos de interés (**Tabla suplementaria 5**), un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems™, A24811) y el software StepOne v2.3 (Thermo Fisher) para analizar las variaciones de Ct en las muestras. En todos los casos, los ciclos umbral necesarios fueron determinados a partir de los valores de reacciones por triplicado. Los niveles de expresión de los genes fueron normalizados con los valores de expresión de un gen *housekeeping* indicado. La información sobre cambios de expresión relativos a controles, barras de error o rangos de

cambio se facilitan en cada pie de figura. Brevemente, se mezclaron 10 nM de la pareja de oligonucleótidos cebadores y *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* en las proporciones adecuadas. 11µL de esta mezcla y 3 µL de cDNA diluido (rango variable entre 1/10 a 1/1000 según expresión de gen a analizar) fueron transferidos a cada pocillo de una placa *MicroAMP™ Fast Optical 96-well Reaction* (Applied Biosystems™, 4346907) que fue sellada con una película *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems™, 4360954). Finalmente, la placa fue centrifugada de manera breve e introducida en el termociclador con el programa especificado abajo. Al terminar la incubación, los datos en crudo obtenidos nos ofrecen los valores de Ct para cada muestra. Estos datos se llevaron a Microsoft Excel para hacer los cálculos necesarios (variación de Ct en los distintos triplicados y normalización contra los valores obtenidos para el gen *housekeeping*). Los datos representados en este estudio se obtuvieron empleando el software GraphPad Prism (v8.0.2) y/o Microsoft Excel.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	98ºC	10 min
2	95ºC	15 seg
3	55ºC	15 seg
4	72ºC	40 seg
5	Ir a paso 2 y repetir 39 veces más	
6	95ºC	5 seg
7	65ºC	1 min
8	Incremento desde 65ºC a 97ºC a razón de +5ºC/min	
9	97ºC	15 seg
10	4ºC	∞

4.27 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA MEDIANTE RNA-SEQ

Para determinar el impacto de ausencia de actividad BRD de BET en pre-iPSCs (rOKMN) se procedió a un análisis de los cambios de expresión global mediante secuenciación masiva de ARN (RNA-seq, por sus siglas en inglés). De manera resumida, el ARN total de pre-iPSCs tratadas con 0,5µM JQ1 o DMSO como control durante 24h fue

extraído y purificado mediante TRIZOL (para más detalle, ver apartado **4.24**). Dos replicados biológicos por condición fueron enviados para su secuenciación a la empresa Novogene (https://en.novogene.com). Los análisis bioinformáticos para determinar los cambios de expresión fueron realizados en nuestro laboratorio siguiendo los pasos descritos previamente [394]. De manera resumida, las lecturas fueron alineadas al genoma de ratón GRCm38 (mm10) utilizando los softwares ToHat (v2.1.1) y Bowtie (v2.3.0) con la configuración de parámetros predeterminada. No se permitió el ensamblaje de transcritos nuevos (-G) y se emplearon otros parámetros siguiendo la configuración predeterminada. El ensamblaje de transcritos y los análisis de expresión diferencial se realizaron mediante Cufflinks (v2.2.1) y la expresión de los transcritos compartiendo cada identificador (*Gene_ID*) fue cuantificada como fragmentos por millón de lecturas mapeadas (FPKM, por sus siglas en inglés). La significación de la expresión diferencial fue determinada mediante la corrección de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas. La agrupación jerárquica de las muestras de RNA-seq utilizadas fue realizada utilizando GENE-E 3.0.215. Los conjuntos de datos se agruparon utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (R), agrupando la distancia con la unión promedio. Los genes no expresados fueron filtrados y retirados.

A continuación, se indican los códigos de acceso de los datos de RNA-seq que se encuentran disponibles en *NCBI Gene Expression Omnibus* (GEO) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) y que fueron utilizados en este trabajo:

GSE ID	
GSE76233	Figura R4
GSE14012	Figura R21a
GSE91022	Figura R21a-c

4.28 ANÁLISIS *IN SILICO* MEDIANTE GO, KEGG Y GSEA

Los análisis de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés) y rutas de genes y genomas de la enciclopedia Kyoto (KEGG, por sus siglas en

inglés) fueron realizados utilizando la herramienta de anotación funcional DAVID (https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp) y la herramienta funcional de redes de asociación entre proteínas STRING (https://string-db.org/), utilizando una lista de referencia que incluye todos los genes de *Mus musculus* en NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). A continuación, se indican los GOs utilizados para los análisis comparativos realizados en **Figura R16a** y **Figura R17a**:

Término GO	GO ID
respuesta celular a daño en el ADN	GO:0006974
reparación de ADN	GO:0006281
daño ADN	GO:0000077
vía reparación DSB por recombinación homóloga	GO:0000724
reparación por escisión daño-UV	GO:0070914
organización de la cromatina	GO:0006325
ensamblaje nucleosomas	GO:0006334
organización cromosómica	GO:0051276
regulación de la organización cromosómica	GO:0033044

Los análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA; por sus siglas en inglés) se realizaron mediante el software disponible GSEA_4.0.3 (http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp). De manera resumida, para evaluar las diferencias de enriquecimiento estadísticamente significativas entre muestras tratadas con JQ1 o DMSO como vehículo, se realizaron 1.000 permutaciones y permutación tipo "gene_set". El análisis de enriquecimiento fue "weighted_p2" para el cálculo del valor de enriquecimiento y se utilizó el tTest para ordenar los genes. La parcela de enriquecimiento, el valor normalizado de enriquecimiento (NES, por sus siglas en inglés), la significación estadística (valor P) y la tasa de falso descubrimiento (FDR, por sus siglas en inglés) fueron determinados.

4.29 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Para la obtención de los extractos celulares completos, las células fueron lisadas utilizando *RIPA Lysis Buffer System* (Santa Cruz

Biotechnology, sc-24948) y la fracción proteica se obtuvo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron crecidas hasta subconfluencia y lavadas dos veces con DPBS 1x tras la retirada del medio de cultivo. Se individualizaron con tripsina 0.05% (Sigma-Aldrich, T3924) y se centrifugaron a 300xg durante 5 min a 4ºC. El pellet celular fue lavado con DPBS 1x y 300xg durante 5min a 4ºC. Todos los pasos siguientes fueron realizados a 4ºC para minimizar la acción de proteasas. Por cada millón de células se añadió 250 µL *RIPA Lysis Buffer* (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) frío con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) recién añadidos. Las células fueron resuspendidas por pipeteo y se homogeneizaron con la ayuda de una aguja de 21G y una jeringa, rompiendo el ADN genómico con cuidado de no incrementar la temperatura. Las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 min y vorteadas cada 5-10 min para ser finalmente centrifugadas 14.000xg a 4ºC. El sobrenadante, que contiene el extracto proteico total (WCE, por sus siglas en inglés), fue transferido a un nuevo tubo libre de proteasas almacenado a -80ºC hasta su uso.

4.30 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN PROTEICA UNIDA A CROMATINA

Para este fin, se obtuvieron en primer lugar distintas fracciones proteicas subcelulares por medio del kit de fraccionamiento subcelular de proteínas para células cultivadas (Thermo Scientific™, 78840) siguiendo las instrucciones de fabricante. Primeramente, las células fueron cultivadas y crecidas para luego ser recogidas mediante tripsinización y centrifugación. El sobrenadante fue retirado, el pellet resuspendido y $1x10^6$ células transferidas a nuevos tubos para centrifugar nuevamente. Los pellets fueron resuspendidos con volumen adecuado (ver tabla abajo) de CEB frío conteniendo inhibidores de proteasas recién añadidos. El fraccionamiento proteico subcelular comienza con la incubación de las muestras con CEB a 4ºC durante 10 min y agitación suave, centrifugación y transferencia del sobrenadante, que es el extracto citoplasmático, a un tubo limpio previamente

enfriado. Se añadió el volumen adecuado (ver tabla abajo) de MEB frío conteniendo inhibidores de proteasas al pellet y se vorteó el tubo durante 5 seg a máxima potencia para repetir la incubación a 4ºC durante 10 min con agitación suave. Tras centrifugación, el sobrenadante, que es el extracto membrana, fue transferido a un tubo limpio enfriado previamente. Tras esto, se añadió el volumen adecuado (ver tabla abajo) de NEB frío conteniendo inhibidores de proteasas al pellet y se vorteó a máxima potencia durante 15 seg para luego incubar el tubo a 4ºC durante 30 min con agitación suave. Tras la centrifugación, el sobrenadante, que es el extracto nuclear soluble, fue transferido a un tubo limpio enfriado previamente. Al pellet se le añadió el volumen adecuado (ver tabla abajo) de tampón de la fracción unida a cromatina (5µL de CaCl2 100mM y 3uL, o 300 unidades de *MNase*, por cada 100µL de NEB a temperatura ambiente) y se vorteó igual que en el paso previo para ser luego incubado durante 5 min en un baño a 37ºC. Se repite el vórtex y se centrifuga para finalmente el sobrenadante, que es el **extracto nuclear de fracción unida a cromatina**, fue transferido a un tubo pre enfriado. Finalmente, se añade al pellet el volumen adecuado (ver tabla abajo) de PEB a RT conteniendo inhibidores de protesasas y se vortea a máxima potencia durante 15 segundos para luego ser incubado durante 10 min a RT. Tras la centrifugación, el sobrenadante, que es el extracto citoesquelético, fue transferido a un tubo nuevo enfriado previamente. Todas las muestras fueron mantenidas almacenadas a -80ºC hasta su uso.

Vol.(µL) de reactivos utilizados según vol. calculado pellet celular					
Vol. del pellet (µL)	CEB (µL)	MEB (µL)	NEB (µL)	NEB (µL)*	PEB (µL)
10	100	100	50	50	50
20	200	200	100	100	100
50	500	500	250	250	250
100	1000	1000	500	500	500

*NEB con *MNase* (Micrococcal Nucleasa) y $CaCl_2$

Nota: escalar este protocolo dependiendo del volumen del pellet celular indicado en la tabla. Mantener una relación de volúmenes de los reactivos CEB:MEB:NEB:PEB a 1:1:0,5:0,5 de manera respectiva.

4.31 OBTENCIÓN DE HISTONAS

Las histonas fueron extraídas con el kit *Histone Extraction* (Abcam, ab113476) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cultivaron $1x10^6$ células. Las células cultivadas fueron lavadas con DPBS 1x a 4ºC suplementado con 5mM de butirato de sodio para preservar los niveles de acetilación. Las células fueron resuspendidas en TEB (*Triton Extraction Buffer*) conteniendo un 0,5% de TritonX-100 (v/v), 2mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 0.02% (p/v) NaN_3 a una densidad celular de $1x10^7$ células por mL y lisadas en hielo durante 10 min con agitación suave. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante descartado. Este paso se repitió con la mitad de volumen de TEB y el pellet celular fue resuspendido en 0.2N HCl a una densidad celular de $1x10^7$ células por mL. Las muestras se dejaron incubando durante la noche a 4ºC para la extracción ácida de las histonas. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante conteniendo las histonas traspasado a un tubo. La concentración fue determinada mediante ensayo de Bradford (Sigma-Aldrich, B6916) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20ºC hasta su uso.

4.32 ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT

Para observar las diferencias en los niveles de proteínas entre distintas muestras, la misma cantidad de proteína fue mezclada con tampón Laemmli 4x (casero) y cargado en *4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels* (BIO-RAD, 4561095S) o en geles de Acrilamida/Bis-acrilamida (Sigma-Aldrich, A3574) caseros, para ser luego separados electroforéticamente. La proteína fue transferida a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) *Immobilon-P PVDF Membrane* (Millipore, IPVH00010). Todas las transferencias se hicieron durante la noche, a 4ºC y 30mV. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas con agua miliQ, teñidas mediante tinción de

Ponceau, incubando con reactivo de Ponceau S (Sigma-Aldrich, P3504) durante 3 min a RT, y lavadas nuevamente con agua miliQ para tomar fotografías. Tras tomar las fotografías y cortar la membrana nuevamente, estas fueron lavadas tres veces durante 5 min con tampón salino tris (TBS) 1x (Fisher Bioreagents, BP2471-1) conteniendo un 0,1% del detergente no-iónico TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, P1379) (referido en adelante como TBS/T). Tras los lavados, las membranas fueron bloqueadas con un 5% de leche desnatada en polvo (LabScientific, M-0841) disuelta en TBS/T y posteriormente incubadas en agitación con anticuerpos primarios (**Tabla suplementaria 4**) diluidos en TBS/T con 0,5% leche en polvo, durante 1 h a RT o durante la noche a 4ºC. Tras 3 lavados de 15 min con TBS/T las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (**Tabla suplementaria 4**) durante 45 min a 4ºC y en agitación. Finalmente, tras 3 lavados de 15 min con TBS/T las membranas fueron incubadas con diferentes substratos ECL (**Tabla suplementaria 2**) dependiendo de la intensidad de señal obtenida durante 5 min, y posteriormente en sala oscura expuestas a placa radiográficas Fuji Super RX-N (Fujifilm, 16189949) empleando un hipercasete estándar y revelados para su visualización utilizando una máquina de revelado Fujifilm (FPM-100A).

4.33 INMUNOPRECIPITACIÓN DE NUCLEOSOMAS Y VISUALIZACIÓN

La inmunoprecipitación de nucleosomas se realizó a partir extractos nucleares preparados de la forma descrita anteriormente (para más detalle, ver apartado **4.30**) y estos fueron incubados con anticuerpo anti-Histona H3 (Abcam, ab1791) durante toda la noche a 4ºC. El segundo día, las *Dynabeads™ Protein G* (Invitrogen, 10009D) equilibradas fueron añadidas a cada reacción e incubadas en rotación por 4 horas a 4ºC. Los complejos nucleosomales-H3/bolas fueron lavadas con buffer de inmunoprecipitación (ver tabla abajo) y las proteínas visualizadas mediante *Western Blot* (para más detalle, ver apartado **4.32**) o mediante

tinción con nitrato de plata. Para este fin, los productos se corrieron electroforéticamente en un gel comercial del 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (BIO-RAD, 4561095S) y se visualizaron mediante el uso de *Pierce™ Silver Stain Kit* (Thermo Scientific™, 24612) siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera resumida, los geles fueron lavados por dos veces durante 5 min con agua miliQ y fijados en una solución 30% etanol y 30% ácido acético dos veces durante 15 min a RT. Los geles fueron posteriormente lavados con etanol 30% por dos veces de 5 min y mismos lavados con agua miliQ. El gel fue luego sensibilizado durante un minuto con la solución de sensibilización de trabajo (50µL *Sensitizer Solution* en 25mL agua) y lavado dos veces con agua miliQ durante 1 min. Se añadió a los geles la solución de tinción de trabajo (0.5mL *Enhancer* con 25mL de *Stain*) y se tiñó durante 30 min a RT. Los geles fueron nuevamente lavados dos veces con agua durante 20 seg y se añadió la solución desarrolladora de trabajo (0,5mL *Enhancer* con 25mL de *Developer*) y se dejaron desarrollar durante 2-3 minutos hasta que las bandas aparecieron. El desarrollo fue parado añadiendo la solución de parada (con ácido acético 5%) durante 10 min y posteriormente los geles fueron lavados varias veces con H2O mQ durante 2-4 h a RT.

4.34 IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS PROTEICOS POR SILAC-MS

Para identificar los cambios proteicos producidos en la fracción unidad a cromatina en pre-iPSC tratadas con JQ1 0,5 µM durante 24 h con respecto al vehículo control DMSO se utilizó la técnica cuantitativa de marcaje de aminoácidos en cultivo celular con isotopos (SILAC, por sus siglas en inglés) y su posterior detección por espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) tal y como se ha descrito anteriormente [395]. De manera resumida, las pre-iPSCs fueron cultivas en medio pluripotente utilizando *Mouse Embryonic Stem Cell SILAC Kit* (Thermo Scientific, 88206) en presencia de "aminoácidos ligeros" [L-arginina-HCL (Thermo Scientific, 88427) y L-lysine-2HCL (Thermo Scientific, 88429)] en el caso de las control o "aminoácidos

pesados" [L-arginine:HCL (U-13C6, 99%; U-15N4, 99%) (Cambridge Isotope Laboratories, CNLM-539-H-0.25) y L-lysine-2HCL (U-13C6, 99%; U-15N2, 99%) (Cambridge Isotope Laboratories, CNLM-291-H-0.25)] en el caso de las tratadas con JQ1. La fracción proteica nuclear unida a cromatina fue extraída como se describió anteriormente (para más detalle, ver apartado **4.30**). 250 µg de fracción unida a cromatina, procedente de cada una de las dos condiciones, fue combinada en una proporción 1:1. Ambos extractos fueron corridos en geles 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (BIO-RAD, 4561095S) que se tiñeron con *GelCode Blue Safe Protein Stain buffer* (Thermo Scientific™, 24594) y sujetos a análisis LC-MS/MS de línea completa. Los datos de MS fueron procesados por el software Proteome Discoverer™ (v.3.68, Thermo Scientific™) con el motor SEQUEST contra la base de datos *International Protein Index mouse protein sequence* (v.3.68). Las listas de proteínas fueron filtradas de acuerdo con el número mínimo de péptidos identificados (>1). Las proteínas contaminantes comunes (como tripsina, queratinas, actinas o tubulinas) fueron retiradas. Los registros duplicados fueron retirados sobre la base de símbolos (*Protein Symbol*) únicos. Luego, la relación de enriquecimiento proteico fue calculado sobre la base de la relación pesado/ligero (SILAC) para la obtención indirecta del valor de la relación JQ1/Vehículo.

4.35 Software y Algoritmos

A continuación, se indican los distintos programas informáticos (software) y algoritmos utilizados a lo largo de esta tesis doctoral.

NOMBRE	FUENTE	IDENTIFICADOR/DIRECCIÓN
Bowtie2 v2.3.0	Johns Hopkins Univ.	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
Bwa v0.5.9	(Li and Durbin, 2009) [396]	https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/files/
CellProfiler software v2.1.1	Broad Institute	https://cellprofiler.org

Cluster v3.0	Stanford Univ.	http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm#ctv
Cufflinks v2.2.1	Washington Univ.	http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/
DAVID	Laboratory of HRI	https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp
EndNote X9	The EndNote Team	https://endnote.com/
FlowJo v7.6.1	FlowJo, LLC	https://www.flowjo.com/
GENE-E v3.0.215	Broad Institute	https://software.broadinstitute.org/GENE-E/
GraphPad Prism software v8.0.2	GraphPad	https://www.graphpad.com/company/
GSEA v4.0.3, y MSigDB	Broad Institute	http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp
IGV software v2.7.2	Broad Institute	https://software.broadinstitute.org/software/igv/download
ImageJ v1.33	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/
Interactive Tree Of Life (iTOL) software v5.5.1	EMBL	[397]
LAS X Life Science Sotware	Leica Microsystems	https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/
Leica Application Suite v3.4.2.18368	Leyca Microsystems	https://www.leica-microsystems.com/
mfold v3.6	The RNA Institute	http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/download-mfold
Molecular Imager® Gel Doc™ XR Image Lab™ Software	BIO-RAD	https://www.bio-rad.com/es-es/sku/1708195-molecular-imager-gel-doc-xr-system-with-image-lab-software?ID=1708195
Morpheus software	Broad Institute	https://software.broadinstitute.org/morpheus/
OriginPro 2017 v9.4.0.220	OriginLab	https://www.originlab.com/Origin
OriginPro 2019b v9.6.5.169	OriginLab	https://www.originlab.com/Origin
PRIMER1	(Ye et al., 2001) [398]	http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html
Prism v8.0.2	GraphPad	https://www.graphpad.com/
Proteome Discoverer™ v.3.68.	Thermo Scientific™	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/OPTON-30812?ce
Samtools v0.1.18	(Li et al., 2009) [399]	https://github.com/samtools/samtools
Sequencher v5.4	Gene Codes Corporation	http://www.genecodes.com/

Serial Cloner software v2.6.1	Serial cloner	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
SOAPnuke v1.5.6	BGI	https://github.com/BGI-flexlab/SOAPnuke
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher™	https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/
The CLUSTAL_X	[400]	https://academic.oup.com/nar/article/25/24/4876/1747529
TMHMM Server v. 2.0	DTU Bioinformatics	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TopHat v2.1.1	Johns Hopkins Univ.	https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml

4.36 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis fueron ejecutados con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.), Excel o R (http://www.r-project.org). La significación estadística fue hallada mediante la prueba *T* de Student o ANOVA de dos colas con o sin Tukey's post test, tal y como se especifica en las leyendas de las figuras a lo largo de este trabajo. Los valores *P* menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

4.37 RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS

Para la revisión bibliográfica del presente trabajo, se usaron las plataformas digitales de libre acceso Google Académico (https://scholar.google.es/) y PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). La introducción de las referencias bibliográficas consultadas fue realizada mediante la utilización del software EndNote X9 (https://endnote.com/).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. RESULTADOS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN BRD EN REPROGRAMACIÓN CELULAR

5.1.1 La inhibición de la actividad BRD compromete la generación de iPSCs

Numerosas evidencias han mostrado la relevancia de la unión BRD con residuos de lisina acetilados en la orquestación de la biología de la cromatina y la expresión génica [143,150]. Sin embargo, hasta el momento no se disponía de un análisis comprehensivo del impacto de la actividad BRD en la adquisición de pluripotencia. Para interrogar las posibles conexiones entre el reconocimiento de residuos de lisina acetilados (Kac) por proteínas BRD durante la reprogramación celular somática (SCR) para generar iPSCs, se compararon en primer lugar los niveles de Kac presentes en células pluripotentes (ESCs y iPSCs) con células no pluripotentes (MEFs y NSO4Gs) mediante la técnica de inmunofluorescencia cuantitativa de célula única (**Figura R1a**). Se observó que tanto los niveles de acetilación global (PANac) como de acetilación en residuos específicos de histonas (H3K56ac y H3K27ac) fueron mayores en las células pluripotente que en las no pluripotentes (**Figura R1b**). Estos resultados sugieren que los dominios BRD presentes en las proteínas que los contienen podrían desempeñar una función importante durante la SCR para alcanzar el estado celular pluripotente.

Con el fin de determinar la relevancia real que la función de la unión BRD-Kac y la interpretación del acetiloma por los BRDs tienen en la formación de iPSCs, se procedió a evaluar el efecto de la inhibición de la actividad BRD durante la SCR. Para este fin, se utilizaron MEFs transgénicos conteniendo un casete OSKM inducible en presencia de doxociclina (Dox). El tratamiento con el inhibidor BRD de amplio espectro bromosporina (BSP) [317] o el vehículo DMSO como control se inició 24 horas tras la siembra de las células somáticas y se mantuvo, en presencia de medio de reprogramación con Dox, hasta que se valoró el número de colonias iPSC generadas mediante marcaje contra la fosfatasa alcalina (AP) (**Figura R2a**).

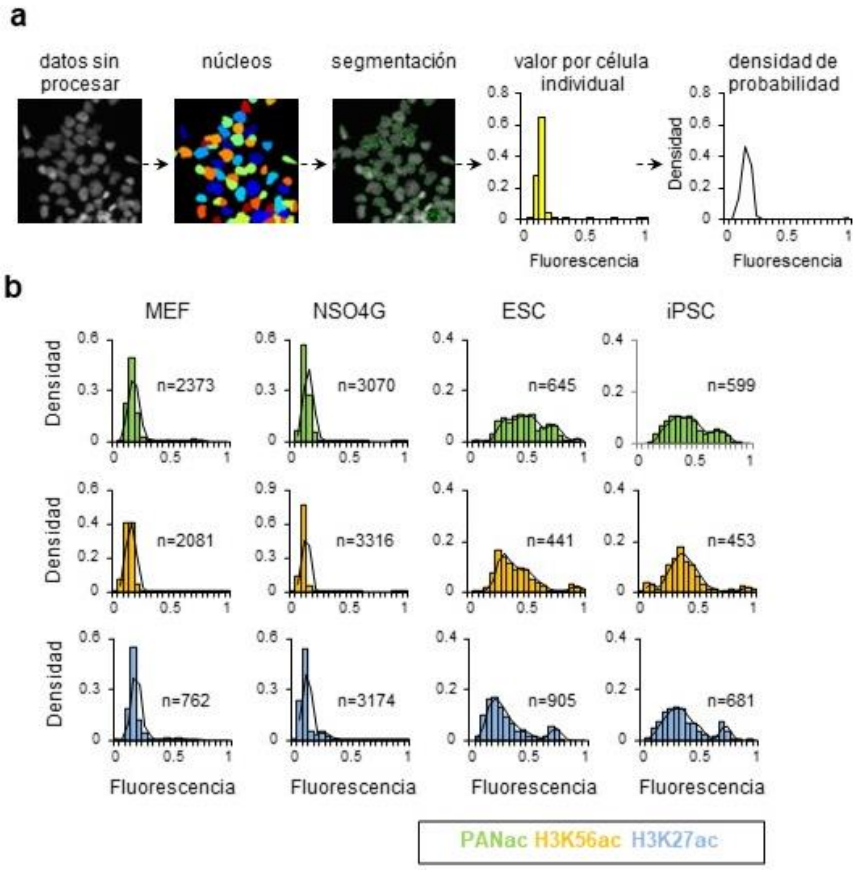


Figura R1. Caracterización de la presencia de acetilación en células pluripotentes y no pluripotentes. **a**, Esquema simplificado de la estrategia seguida para la determinación de los niveles relativos de marcaje fluorescente por célula individual. Tras la obtención por microscopía de fluorescencia de una imagen se procede a la identificación de cada núcleo celular (positivo para DAPI) y la separación de las células (segmentación). En cada célula se normalizan los niveles de intensidad de fluorescencia del marcaje específico con respecto a la intensidad de fluorescencia nuclear (DAPI). **b**, Valores de fluorescencia relativa de PANac (acetilación global), K3K56ac y K3K27ac en MEFs, NSO4G (progenitoras neurales), ESCs e iPSCs. n indica el número de células individuales analizadas. En los histogramas en **a** y **b** se representa la intensidad de fluorescencia (eje x) frente a la densidad poblacional (eje y).

Tras la tintición para detectactar los niveles de AP se observó que la presencia de BSP repercutía negativamente en el proceso de SCR ya

que las células tratadas presentaban a penas positividad para este marcaje, que se asocia a una reprogramación exitosa (**Figura R2b**). Además, el contaje al microscopio del número de colonias positivas para AP (AP+) mostró que la presencia de BSP reduce significamente la formación de iPSCs (**Figura R2c**). A este respecto, el impacto de la BSP sobre la formación de iPSCs no fue debido a un efecto sobre la capacidad proliferativa o viabilidad celular de las células reprogramándose, ya que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con BSP o Veh. (datos no mostrados).

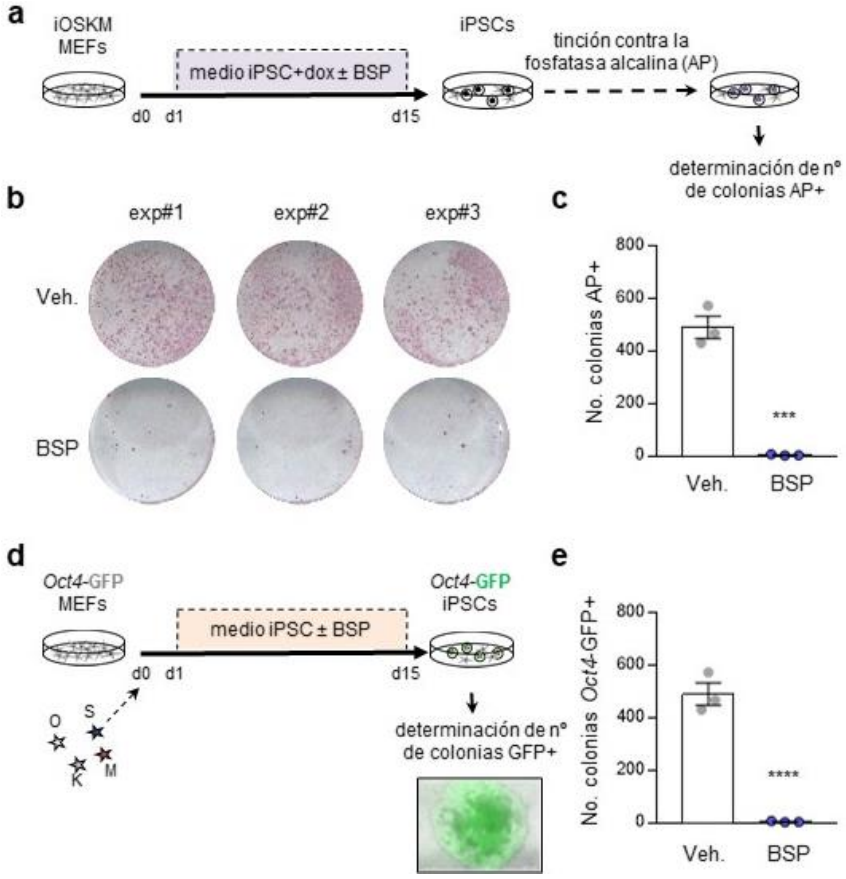


Figura R2. La actividad BRD es necesaria durante la SCR. a, Representación esquemática de la estrategia para evaluar el efecto de la BSP con respecto a su

vehículo (Veh.) en un ensayo de reprogramación mediante un sistema de reprogramación inducible (iOSKM) a partir de MEFs. El número de colonias formadas se determina tras el marcaje para la detección colorimétrica de la fosfatasa alcalina (AP). **b**, Imágenes representativas de los ensayos de reprogramación en presencia o ausencia de BSP (1μM). **c**, Cuantificación del número de colonias AP+ por microscopía visible en las condiciones indicadas. **d.** Representación esquemática de la estrategia de reprogramación utilizada a partir de *Oct4*-GFP MEFs transducidos con OSKM. Se muestra una imagen representativa, combinando imágenes obtenidas en microscopía de contraste de fases y de fluorescencia, de una colonia GFP+ generada en presencia de Veh. **e**, Cuantificación del número de colonias GFP+ por microscopía de fluorescencia en las condiciones indicadas. Los datos en c y d son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ***p<0.001; ****p<0.0001.

Por otro lado, se decidió confirmar el requerimiento de la actividad BRD durante la formación de iPSCs mediante otro ensayo alternativo de reprogramación. Para este fin, se utilizaron MEFs conteniendo un reportero GFP que se encuentra bajo el control del promotor del gen de pluripotencia *Oct4* que fueron transducidas con partículas lentivirales conteniendo los factores de reprogramación OSKM. Tras 24 horas el medio fue cambiado a medio de reprogramación en presencia o ausencia de BSP durante todo el ensayo, tras lo que se determinó el número de colonias positivas para GFP (GFP+), que refleja la activación de la expresión del gen pluripotente *Oct4* (**Figura R2d**). Tras la determinación del número de colonias GFP+ mediante microscopía de fluorescencia se pudo apreciar que la presencia de BSP durante la SCR impidió la formación de colonias pluripotentes (**Figura R2e**).

En su conjunto, estos resultados muestran que la actividad BRD de reconocimiento de residuos de lisina acetilados resulta esencial durante la formación de iPSCs.

5.1.2 Identificación de una firma de expresión BRD asociada a la adquisición de pluripotencia

Teniendo en cuenta nuestros resultados mostrando el papel crítico de la actividad BRD para generar iPSCs, decidimos explorar qué dominios BRD de los 53 dominios existentes en 40 proteínas de ratón podrían estar mediando este efecto en la reprogramación de fibroblastos

a pluripotencia. En primer lugar, mediante una aproximación *in silico* se exploró las posibles redes de interacciones entre las 40 proteínas BRD murinas usando la base de datos STRING. De este modo, fue posible no sólo separar estas proteínas atendiendo a su funcionalidad en 9 grupos, de un modo similar al realizado por Zhaware y Zhou con las 46 proteínas BRD humanas [143], sino que se pudo discernir que el 72,5% de éstas desempeñan funciones relevantes en procesos de control de biología de la cromatina y la regulación de la transcripción que resultan clave en la compleja toma de decisiones celulares que ocurren a lo largo de la SCR (**Figura R3**).

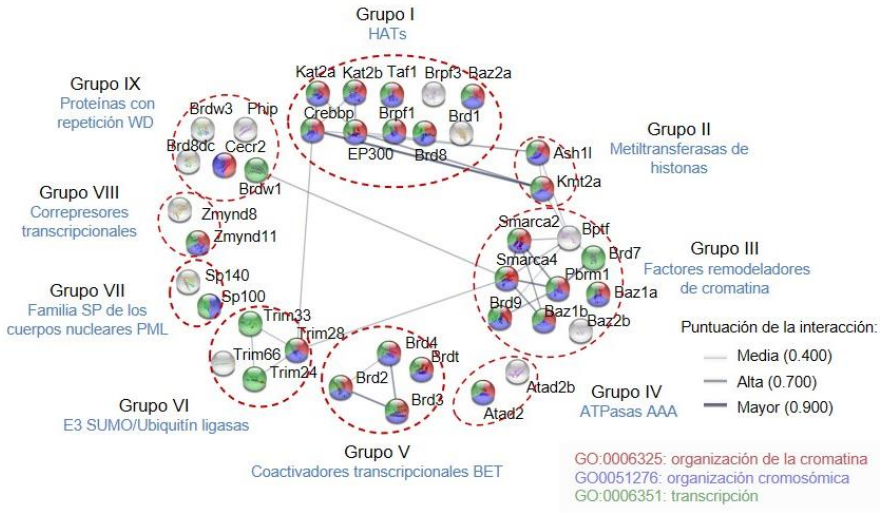


Figura R3. Paisaje funcional de las proteínas BRD. Análisis de posibles interacciones entre proteínas BRD de origen murino realizada mediante la herramienta bioinformática STRING. Las líneas y su grosor representan el análisis de confidencia de los valores de la interacción (media, alta o mayor). El código de colores representa el resultado de las principales ontologías génicas (GOs) analizadas que resultaron significativas.

Además, aunque se observa que la mayoría de las proteínas BRD están formando redes de interacción entre miembros pertenecientes a su mismo grupo funcional, también se aprecia un grado alto de confidencia en las interacciones entre proteínas BRD intergrupales (ej. miembros del grupo I con miembros de los grupos II y VI, así como miembros del grupo III con miembros de los grupos II, VI y IX) (**Figura R3**), algunas de las cuales podrían ser clave en el control de pluripotencia [401].

Luego, para avanzar en la deconstrucción del posible papel de la actividad BRD de cada grupo funcional o a nivel individual en la formación de iPSCs, se investigaron las dinámicas transcripcionales temporales de los genes que codifican las proteínas BRD a lo largo de la SCR. Para este fin se realizó un aproximación *in silico* no sesgada utilizando datos disponibles obtenidos mediante RNA-seq a lo largo de la reprogramación por OSKM de MEFs y selección celular positiva para SSEA1 excluyendo aquellas trayectorias refractarias no conducentes al estado pluripotente [402]. Este análisis por expresión diferencial reveló cambios sustanciales en la expresión de los genes que codifican las proteínas BRD en las fases principales de iniciación, maduración y estabilización durante la reprogramación OSKM (**Figura R4**). El análisis no sesgado de las expresiones diferenciales de estos genes reveló la existencia de 6 agrupaciones temporales principales a lo largo de este proceso de adquisición de pluripotencia: (A) genes que se encuentran regulados al alza en las etapas de iniciación y maduración; (B) genes cuya expresión máxima acontece en las células somáticas y se regulan a la baja a medida que transcurre la reprogramación; (C) genes que se comportan de manera similar a los de clase A pero muestran sus niveles de expresión mayores en el estado iPSC: (D) genes que se activan de manera progresiva durante las sucesivas fases principales de la reprogramación; (E) genes que muestran un patrón heterogéneo de expresión al alza en un periodo concreto de la reprogramación; y (F) genes que se encuentran regulados al alza en células somáticas y pluripotentes pero cuya expresión se regula a la baja durante la formación de iPSCs (**Figura R4**).

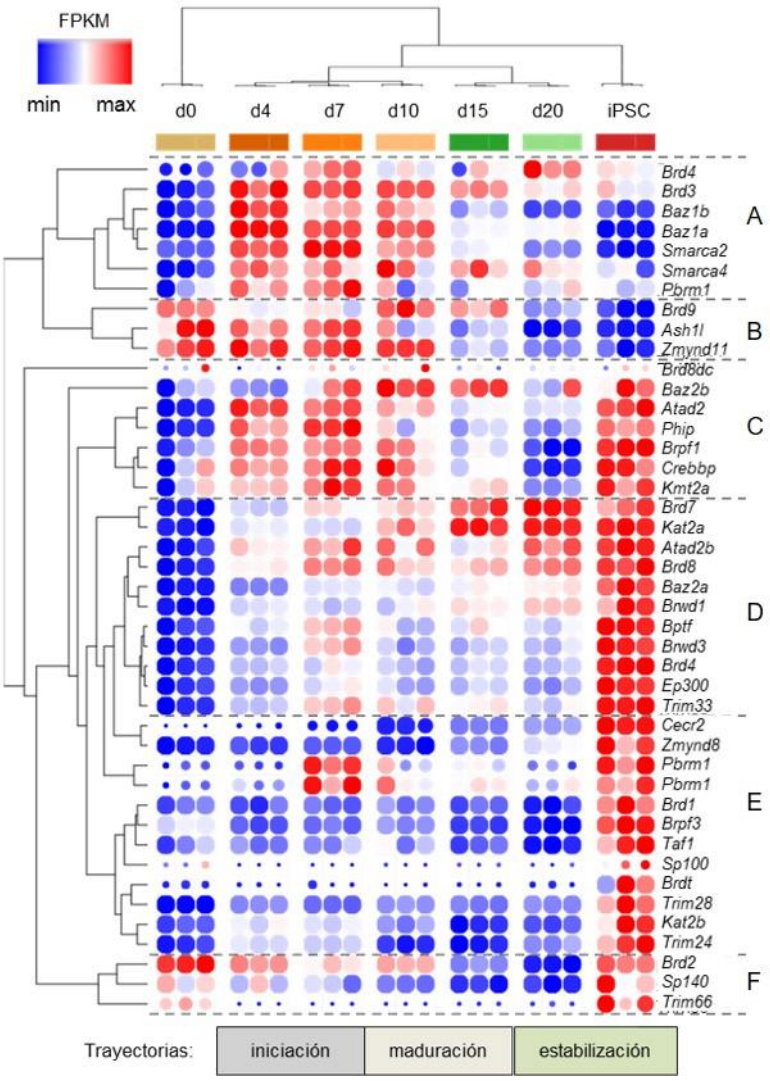


Figura R4. Análisis de los cambios dinámicos temporales de expresión de los genes que codifican proteínas BRD durante la SCR. Mapa de calor mostrando la expresión los genes que codifican las proteínas BRD a lo largo de la reprogramación de MEFs mediante el sistema inducible OSKM. La abundancia normalizada de la expresión de cada gen BRD se muestra representada por el tamaño de círculo. El color indicado en la escala representa el valor de expresión mínimo y máximo para cada gen BRD en unidades de fragmentos por millón de kilobases (FPKMs, por sus siglas en inglés).

En conjunto, estos datos revelan una nueva firma dinámica de expresión de genes que codifican las proteínas BRD asociada a la reprogramación exitosa por OSKM que resulta heterogénea y no dependendiente de actividad funcional [143] o conservación estructural [241]. Esta firma BRD puede servir como una herramienta para interrogar los mecanismos moleculares en los que intervienen las proteínas BRD, a nivel individual o mediante posibles interacciones con otros miembros de esta familia (**Figura R3**), durante las diferentes trayectorias celulares que se suceden para alcanzar el estado celular pluripotente. Estos resultados añaden una mayor complejidad a la hora de diseccionar la relevancia de la actividad BRD durante la SCR ya que cada proteína BRD podría participar diferencialmente en la regulación de cada una de las diferentes entidades celulares surgidas en el proceso de adquisición de pluripotencia.

5.1.3 Determinación de la función de los dominios BRD en SCR mediante cribado químico

Debido a la heterogeneidad funcional que presentan las proteínas que contienen BRDs, para determinar el papel del reconocimiento de residuos de lisina acetilados (Kac) por proteínas BRD específicas durante la generación de iPSCs se utilizaron inhibidores selectivos de actividad BRD. Debido a la naturaleza química de esta aproximación, primero se elaboró una clasificación estructural de los 53 dominios BRD existentes en ratón mediante un análisis filogenético de similitud a partir de las secuencias aminoacídicas de estos dominios (NCBI, UniProt, PFAM). Los resultados de este análisis *in silico* reveló la existencia de ocho familias estructurales de BRDs en ratón (**Figura R5**). Teniendo en cuenta la organización basada en dominios en proteínas BRD realizada por el grupo del Dr. Filippakopoulos en 2012 utilizando los 61 BRDs existentes en la especie humana [241], se observa desde una perspectiva evolutiva una gran conservación estructural basada en dominios BRD entre estas dos especies de mamíferos.

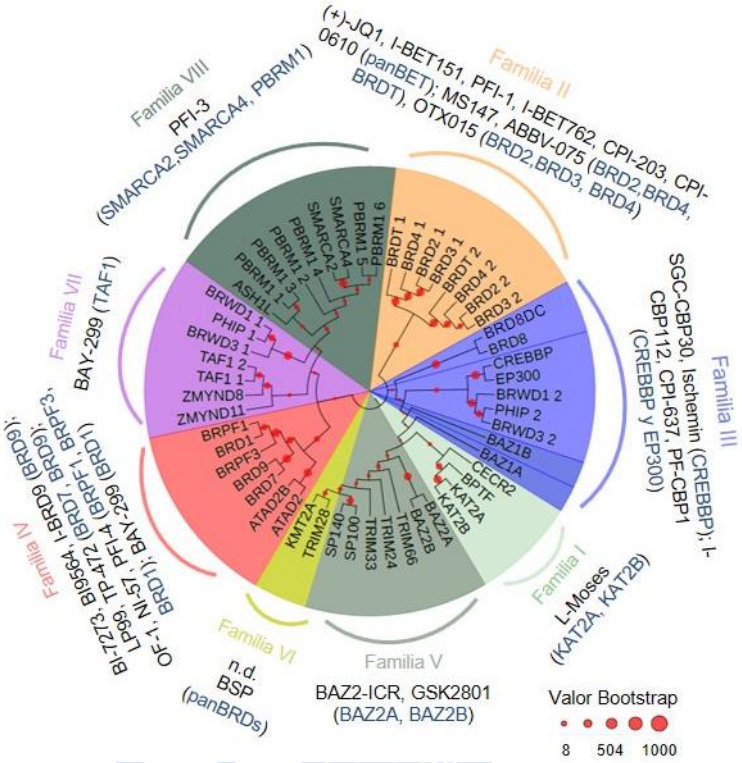


Figura R5. Árbol filogenético de dominios BRD en ratón e inhibidores BRD. Análisis *in silico* basado en las similitudes estructurales existentes de los 53 dominios BRD que codifica el genoma de ratón. Se representa la agrupación de las 8 familias estructurales obtenidas por código de colores para facilitar la visualización de estas. Se muestran las distintas moléculas inhibidoras (en negro) utilizadas en este estudio indicando el BRD específico de la proteína que lo contiene del que son ligando (en azul). Los círculos rojos representan el grado de parsimonia y máxima verosimilitud obtenido por el método de *Bootstrap*.

Para investigar cómo los dominios BRD pueden afectar a la formación de iPSCs, se procedió a la realización de un pequeño cribado químico con 28 inhibidores BRD selectivos disponibles comercialmente (**Figura R5**). Se determinó mediante citometría de flujo (FACS) si la presencia individual de cada uno de estos 28 inhibidores afectaba a la eficiencia de reprogramación de fibroblastos transducidos con OSKM medida por el porcentaje de células positivas

para *Oct4*-GFP (**Figura R6a**). De manera consistente con ensayos anteriores, en el caso del tratamiento con el inhibidor BRD de amplio espectro BSP la eficiencia de reprogramación se redujo dramáticamente comparada con el tratamiento con DMSO (Veh.) (0.64% vs 11% de células GFP+) (**Figura R6b**). De manera interesante, se observó que el tratamiento con inhibidores de la las familias I (L-Moses), III (SGC-CBP30, Ischemin, I-CBP112, CPI-637 y PF-CPB1) y VIII (PFI-3) facilitaba el aumento de células *Oct4*-GFP+ en magnitudes comprendidas entre el 25% y 50% con respecto al tratamiento con Veh. (**Figura R6c**). La presencia del inhibidor GSK2801 (familia V) así como el tratamiento con el inhibor TP-472, que actúa sobre los BRDs contenidos en las proteínas BRD7 y BRD9 de la familia IV, también facilitaban, aunque en menor proporción a los anteriores inhibidores mencionados, la obtención de células pluripotentes (**Figura R6c**). Por otro lado, la inhibición de la actividad BRD correspondiente a los coactivadores transcripcionales BET (familia II) resultó de manera consistente en una reducción drástica del porcentaje de células *Oct4*-GFP+ obtenidas con cada uno de los 8 inhibidores BET selectivos utilizados (JQ1, I-BET151, PF-1, I-BET762, CPI-203, CPI-0610, MS147, ABBV-075 y OTX015) (**Figura R6c**). También se observó que la presencia de los inhibidores PFI-4 y OF-1 (BRPF1, BRPF3 y BRD1 de la familia IV) así como el tratamiento con I-BRD9 (BRD9 de la familia IV) y BAY-299 (BRD1 de la familia IV y TAF1 de la familia VII) afectaba negativamente en el proceso de SCR con rangos comprendidos entre el 20% y 40% de disminución de células *Oct4*-GFP+ obtenidas (**Figura R6c**). Interesantemente, el tratamiento con los inhibidores I-BRD9 y TP-472 sugieren la existencia de actividades BRD opuestas contenidas en la misma familia estructural IV, siendo el caso de las proteínas BRD7 y BRD9 cuya actividad lectora Kac actúa restringiendo o facilitando la reprogramación respectivamente (**Figura R6c**).

En su conjunto, los resultados obtenidos en este cribado químico muestran la existencia de actividad BRD específica que resulta

necesaria para la generación de células pluripotentes así como identifica la existencia de dominios BRD que desempeñaban un papel como barrera en la SCR durante la generación de iPSCs (**Figura R6c**).

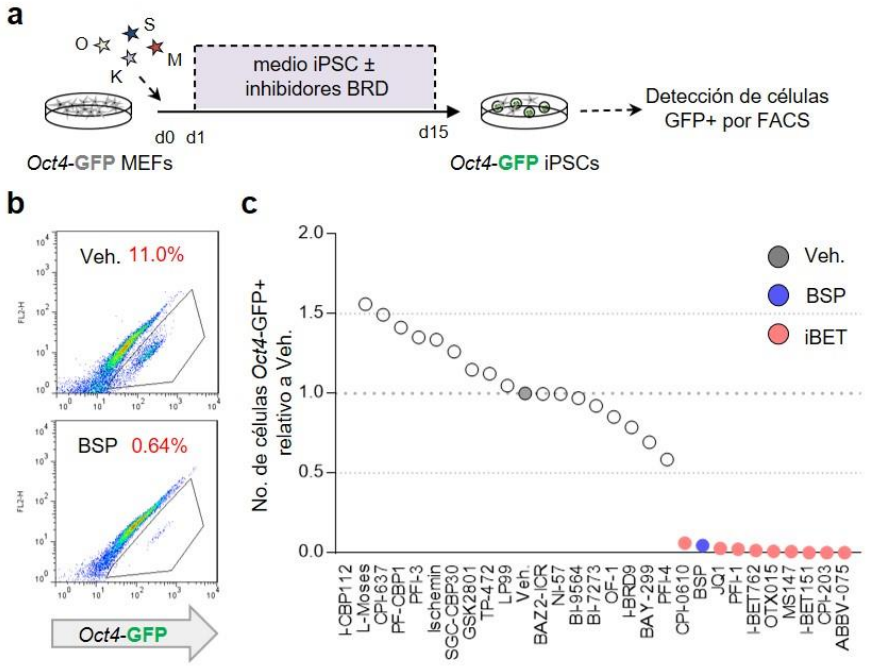


Figura R6. Identificación de actividad BRD específica en SCR mediante cribado químico. a, Representación esquemática de la estrategia de cribado químico contra función BRD específica para la determinación de eficiencia de la reprogramación OSKM de Oct4-GFP MEFs mediante FACS. **b**, Análisis por FACS del porcentaje de células positivas para GFP en Oct4-GFP MEFs tras 15 días de reprogramación en presencia de BSP (1μM) o DMSO como control (Veh.). **c**, Resultados relativos al control Veh. del número de células positivas para GFP tras el ensayo de reprogramación siguiendo la estrategia de cribado químico indicada en a y detección por FACS como en **b**.

5.1.4 La inhibición de la familia BET fenocopia la supresión de actividad BRD global en reprogramación

Los datos del cribado químico sugieren que los dominios BRD presentes en miembros de la familia BET (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) son los principales mediadores de la respuesta obtenida

mediante la inhibición global de la actividad BRD por tratamiento con BSP en la inducción de pluripotencia (**Figura R6c**). Además de no permitir la generación de células positivas para *Oct4*-GFP (**Figura R6c**), posteriores valoraciones microscópicas de los cultivos en reprogramación revelaron que tanto el tratamiento con BSP como la presencia de inhibidores de la familia BET permitían cambios de identidad celular asociados al proceso de reprogramación. En concreto, se observó que en presencia de estos inhibidores BET y BSP un número considerable de células bajo reprogramación perdían su típica morfología fibroblástica inicial para adquirir una morfología con rasgos epiteliales que sueles ser característica de intermediarios de reprogramación que surgen en etapas avanzadas de la SCR. Para valorar cuantitativamente este posible efecto, se llevaron a cabo ensayos de reprogramación a partir de MEFs con OSKM en presencia o ausencia de inhibidores durante tiempos largos de reprogramación (>20 días), y se clasificaron morfológicamente los dos tipos principales de colonias surgidas como intermediarios avanzados de reprogramación (de ahora en adelante, pre-iPSCs) si las colonias estaban formadas por acúmulos de células individualizadas o iPSCs si las colonias presentaban la típica morfología compacta de las mismas (**Figura R7a**). Interesantemente, en comparación con células tratadas con DMSO (Veh.) la presencia tanto de BSP como inhibidores BET reduce considerablemente el porcentaje de colonias con "morfología típica" iPSC y conlleva un aumento de aquellas con "morfología típica" pre-iPSC (**Figura R7b**). Este resultado fue altamente reproducible en posteriores ensayos utilizando el inhibidor BET JQ1, el cual es el inhibidor referente y el más utilizado para abordar el estudio de la función de los bromodominios de esta familia de coactivadores transcripcionales [224,301,403]. Así, los resultados mostraron que el tratamiento con JQ1 reduce significativamente el número de colonias semejantes a iPSCs y aumenta significativamente el número total de colonias semejantes a pre-iPSCs (**Figura R7c**). A este respecto, resultó llamativo observar que la relación pre-iPSCs/iPSCs era prácticamente inversa entre los cultivos tratados o no con el inhibidor JQ1 (**Figura R7c**).

En conjunto, estos datos muestran que la inhibición de la actividad específica BRD de BET impide la formación de iPSCs, lo que fenocopia el efecto de la inhibición BRD global mediante BSP durante SCR, y sugieren que la actividad BRD de las BET puede resultar esencial en las etapas finales de la formación de iPSCs.

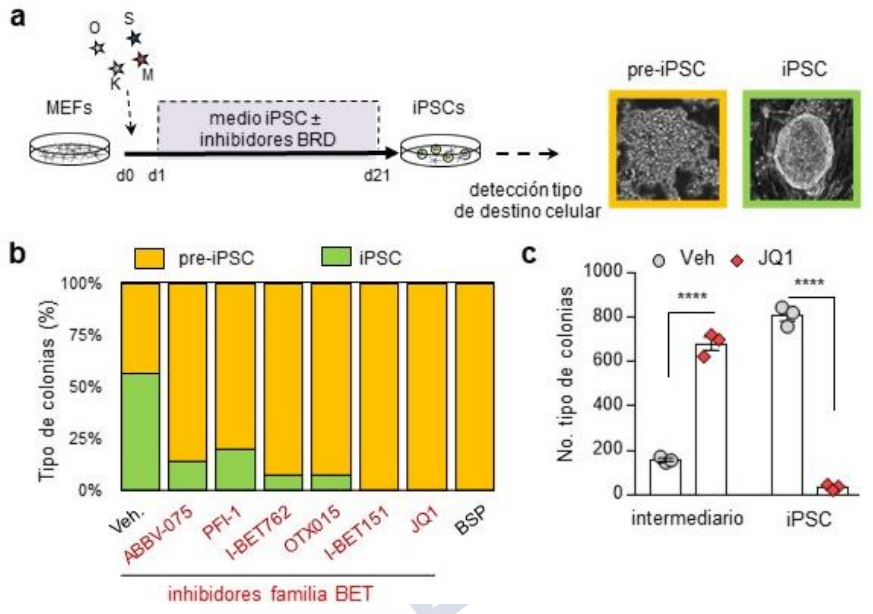


Figura R7. La inhibición específica de la actividad BRD de la familia BET compromete la generación de iPSCs. **a**, Representación esquemática de la estrategia de reprogramación utilizada para valorar los cambios morfológicos producidos en los cultivos en SCR. Se muestran imágenes representativas de las colonias semejantes a pre-iPSC o semejantes a iPSCs según su aspecto por microscopía de contraste de fases. **b**, Porcentaje de tipo de colonias indicado en cada uno de los tratamientos. **c**, Número de colonias semejantes a pre-iPSC o iPSC obtenidas en presencia de JQ1 (0,1μM) o Veh. siguiendo la estrategia de reprogramación indicada en **a**. Los datos son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ****p<0.0001.

5.1.5 La actividad BRD de BET es dispensable en las etapas iniciales de la reprogramación

Nuestros resultados sugieren que las células obtenidas en los ensayos de SCR en presencia de JQ1 no alcanzan el estadio celular pluripotente, pero sí se producen ciertos cambios morfológicos que son compatibles con los que acontecen durante la transición mesenquimal-epitelial (MET, por sus siglas en inglés) al inicio de la SCR (**Figura R7**). La MET es un proceso esencial y limitante para la formación de iPSCs [179,404,405]. Tal como se indicó en la introducción, las trayectorias celulares que resultan permisivas para la generación de iPSCs ocurren de manera gradual, siendo tres las fases o trayectorias principales ("iniciación", "maduración" y "estabilización") durante la SCR (**Figura R8a**). Durante la primera fase de "iniciación", que corresponde con la MET, se produce la regulación a la baja de los genes mesenquimales y se activan los genes epiteliales. A la fase de "iniciación" le sucedería la denominada fase de "maduración", en la que se produce la regulación al alza de transcritos epiteliales y la reactivación de los genes de pluripotencia. A medida que aumenta la expresión de los genes de pluripotencia, se entraría en la fase de "estabilización" y el proceso de SCR finalizaría cuando la red de pluripotencia endógena es sostenible e independiente de OSKM. Teniendo en cuenta esto, los cultivos de MEF sujetos a reprogramación en presencia y ausencia de JQ1 fueron caracterizados transcripcionalmente a distintos tiempos del proceso en base a la abundancia relativa de distintos trascritos mesenquimales, epiteliales y de pluripotencia (**Figura R8b**). Los resultados de RT-qPCR muestran que la expresión de los genes mesenquimales *Cdh2* y *Zeb1* presenta su máximo a nivel al principio de la SCR, antes de que las células sufran la MET, y van disminuyendo hasta alcanzar su mínimo a día 6-9, tanto en las células control como en los cultivos en presencia de JQ1 (**Figura R8b**, izquierda). Por otro lado, la activación de los marcadores epiteliales *Cdh* y *Ocln* no se ve comprometida en presencia de JQ1, aunque parece que la expresión de *Ocln* empieza un poco retardada a en presencia de JQ1 en los primeros días de la SCR (**Figura R8b**, centro). Estos resultados muestran que la regulación a la baja de los genes mesenquimales y la activación y regulación al alza de los genes

epiteliales parece no estar afectada de manera significativa por la inhibición de la actividad BRD de las proteínas BET, lo que resulta en una MET comparable entre células tratadas con DMSO (Veh.) y JQ1.

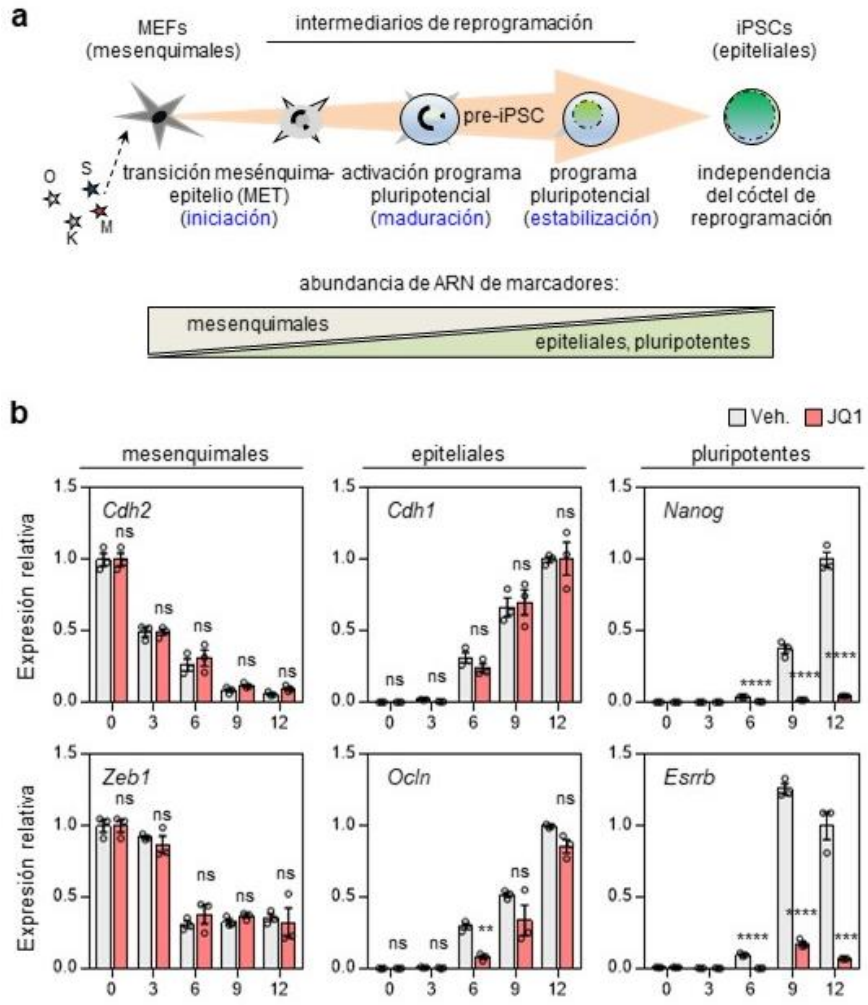


Figura R8. La inhibición de la actividad BRD de BET no compromete la MET durante reprogramación. a, Representación esquemática de las trayectorias y procesos más importantes que tiene que superar una célula somática de origen mesenquimal (MEF) para alcanzar el estado celular pluripotentes (iPSC). **b**, Resultados de la expresión relativa normalizada a *Gapdh* y el valor más alto en cada condición obtenidos por la técnica de RT-qPCR para los marcadores mesenquimales

(izquierda), epiteliales (centro) y de pluripotencia (derecha) indicados. Los datos son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001; ns diferencia no significativa.

Sin embargo, la actividad de BRD de la familia BET resulta esencial para la activación y regulación al alza de la red endógena de pluripotencia, como se aprecia de manera significativa comparando los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia *Nanog* y *Esrrb* entre células tratadas con JQ1 y Veh. (**Figura R8b**, derecha).

5.1.6 La actividad BRD de BET resulta necesaria para la adquisición de pluripotencia

Una vez comprobado que la actividad BET no resulta necesaria para que transcurra la MET de manera satisfactoria (**Figuras R7 y R8**), se valoró con más detalle el posible "estancamiento" de las células cultivadas en presencia de JQ1 en la fase de intermediario avanzado de reprogramación pre-iPSC. Para este fin, se caracterizó con mayor profundidad las entidades celulares resultantes de la SCR no productiva en presencia de JQ1. Como se ha indicado anteriormente, la SCR hacia iPSC es un proceso secuencial con varias fases que presentan programas transcripcionales particulares. Por ejemplo, tras la MET se produce la regulación al alza del marcador de membrana asociado a pluripotencia SSEA-1 [192,406], y en un subgrupo de intermediarios de reprogramación SSEA-1+ se activará finalmente la red de pluripotencia endógena mediante demetilación activa de genes como *Oct4* [42,191,192]. Para probar que la inhibición de la actividad BRD de la familia BET impide la formación de iPSCs (SSEA-1+ y OCT4+) bloqueando la reprogramación en un estadio pre-iPSC (SSEA-1+ y OCT4-) (**Figura R9a**) se evaluaron los niveles de estos dos marcadores de referencia en este campo de estudio. Así, en primer lugar, mediante la reprogramación por OSKM de MEFs albergando un reportero GFP bajo el control de la expresión endógena de *Oct4* (*Oct4*-GFP MEFs) y combinando microscopía en campo claro con microscopía de fluorescencia, se pudo realizar un seguimiento temporal del efecto del tratamiento con JQ1 durante la SCR.

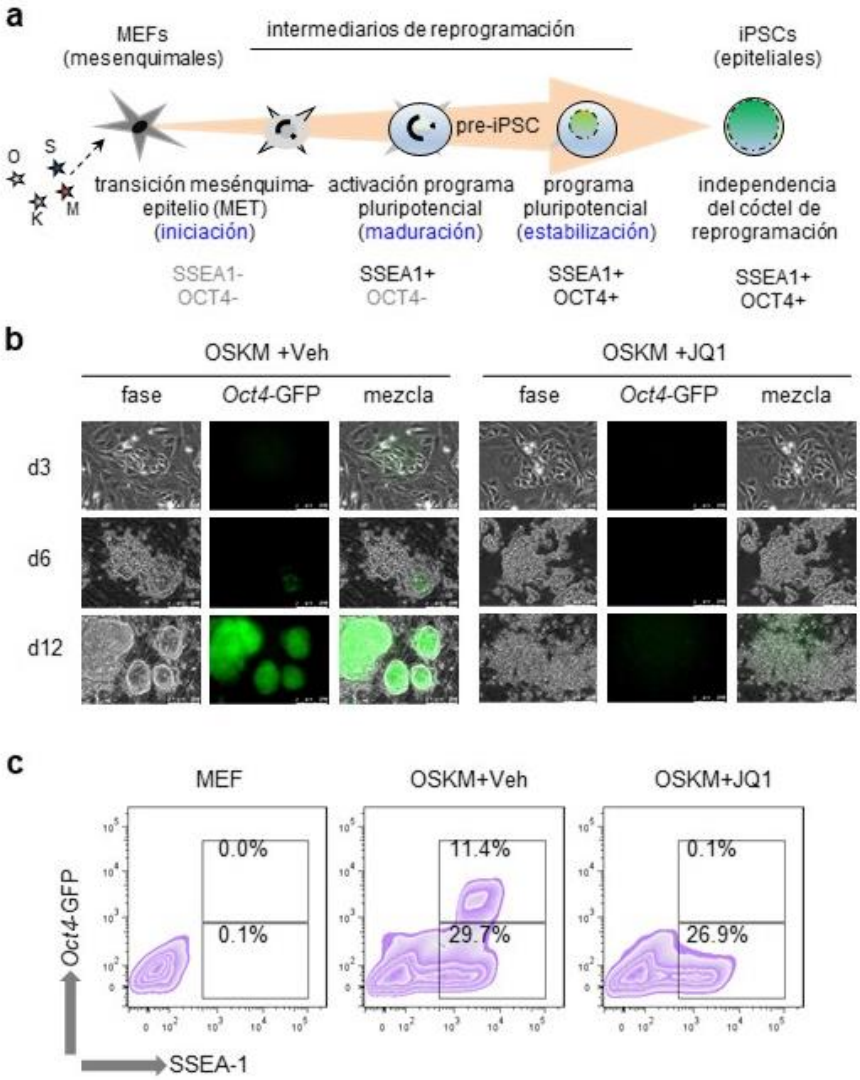


Figura R9. El tratamiento con JQ1 bloquea la reprogramación en estadio pre-iPSC. **a**, Representación esquemática de las trayectorias permisivas de reprogramación indicando ausencia (-) o presencia (+) de los marcadores SSEA-1 y OCT4. **b**, Imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia durante reprogramación OSKM de *Oct4*-GFP MEFs en los tratamientos y días indicados. **c.** Resultados del análisis por citometría de flujo del porcentaje de células positivas para *Oct4*-GFP (ordenadas) y SSEA-1/PerCP-Cy5.5 (abscisas) en

Oct4-GFP MEFs tras 21 días de reprogramación en presencia de JQ1 (0,1μM) o DMSO como control (Veh.).

Los datos obtenidos corroboran que no se producen alteraciones morfológicas evidentes durante la MET en presencia de JQ1, pero sí se ve comprometida la reactivación de la expresión de *Oct4* endógeno (**Figura R9b**), lo que resulta consistente con los datos mostrados anteriormente (**Figuras R7 y R8**). Luego, para discernir de manera efectiva si los intermediarios avanzados de reprogramación se corresponden a un estadio pre-iPSC se procedió al inmunomarcaje de SSEA-1 y su detección por FACS. Los datos obtenidos mediante citometría de flujo mostraron la existencia de tres poblaciones celulares bien diferenciadas en base a sus niveles de OCT4, detectado en base a los niveles de GFP, y de SSEA-1: 1) células que no superaron la MET o intermediarios tempranos (SSEA1-/GFP-); 2) pre-iPSCs (SSEA1+/GFP-); y 3) iPSCs (SSEA1+/GFP+) (**Figura R9c**). Los resultados obtenidos tras reprogramación en presencia o ausencia de JQ1 indicaron que mientras la inhibición de la actividad BRD de las BET no afecta de manera importante al porcentaje de células positivas para el marcador SSEA-1+ (26.9% vs 29.7%), si impide la adquisición del estado celular pluripotente denotado por el porcentaje de células GFP+ para OCT4 (0.1% vs 11.4%).

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BRD DE LA FAMILIA BET EN INTERMEDIARIOS AVANZADOS DE REPROGRAMACIÓN

5.2.1 La actividad BRD de BET es necesaria para la reprogramación eficiente de pre-iPSCs

Teniendo en cuenta la necesidad de la actividad BRD de la familia BET en las etapas avanzadas de la SCR, se decidió explorar con más detalle la relevancia del reconocimiento Kac de esta familia de proteínas BRD en la fase de adquisición del estado celular pluripotente. Para este fin se utilizó una estrategia desarrollada por el grupo del Dr. Austin Smith consistente en obtener cultivos enriquecidos de poblaciones de intermediarios avanzados de reprogramación, también

conocidos como pre-iPSC [407]. Para generar poblaciones estables de pre-iPSCs, en condiciones estándar de cultivo en presencia de suero y LIF (referido como SL), se utilizó como principal modelo de reprogramación la línea progenitora neural NSO4G, que contienen un reprotero GFP bajo el control de la expresión endógena de *Oct4*. En primer lugar, las NSO4G fueron transducidas con partículas lentivirales conteniendo los factores de reprogramación OCT4, KLF4 y cMYC. En este caso no resulta necesaria la expresión forzada de SOX2 ya que la línea NSO4G presenta niveles elevados de este TF [407]. Mediante ensayos de SCR y citometría de flujo se consiguieron poblaciones estables de pre-iPSCs enriqueciendo para intermediarios avanzados de reprogramación (rOKM) que no activasen la expresión endógena de *Oct4* (GFP-) (**Figura R10a**). Interesantemente, en línea con nuestros datos indicando el papel crítico de la actividad de reconocimiento Kac por las BET en la fase final de la SCR (**Figuras R8 y R9**), se pudo observar que las pre-iPSCs obtenidas presentan de manera significativa mayores niveles de acetilación a nivel global (PANac) o en residuos de lisina de histonas específicas (H3K56ac y H3K27ac) que sus células parentales (NSO4G) de las que son obtenidas (**Figura R10b**).

Este modelo de captura estable y homogénea de pre-iPSCs se puede manipular de manera sencilla para favorecer la reprogramación completa a iPSCs cambiando las condiciones de cultivo (ej, inhibición dual de las quinasas GSK3 y MEK en combinación con LIF y ausencia de suero. Por simplicidad, de ahora en adelante referido como medio 2iL) y expresión forzada de TFs claves en pluripotencia [407]. Así, intrigados por la necesidad de la actividad BRD de las BET para obtener verdaderas iPSCs, se puso a prueba si el tratamiento con JQ1 también comprometía la adquisición de pluripotencia a partir de estas pre-iPSCs. Para testar el efecto de la inhibición de la actividad BRD de las BET ante diferentes contextos de reprogramación, se decidió evaluar el tratamiento con JQ1 en presencia de los TFs NANOG, ESRRB y KLF2 previamente validados entre los principales facilitadores y aceleradores del proceso de adquisición de pluripotencia

[59,200,205,408,409]. Para esto, las pre-iPSCs fueron transfectadas con constructos codificando *Nanog*, *Esrrb* o *Klf2* o el vector vacío (EV) como control, y se procedió a evaluar la eficiencia de reprogramación de cada una de las poblaciones obtenidas tras el cambio de medio SL a medio 2iL (**Figura R10c**).

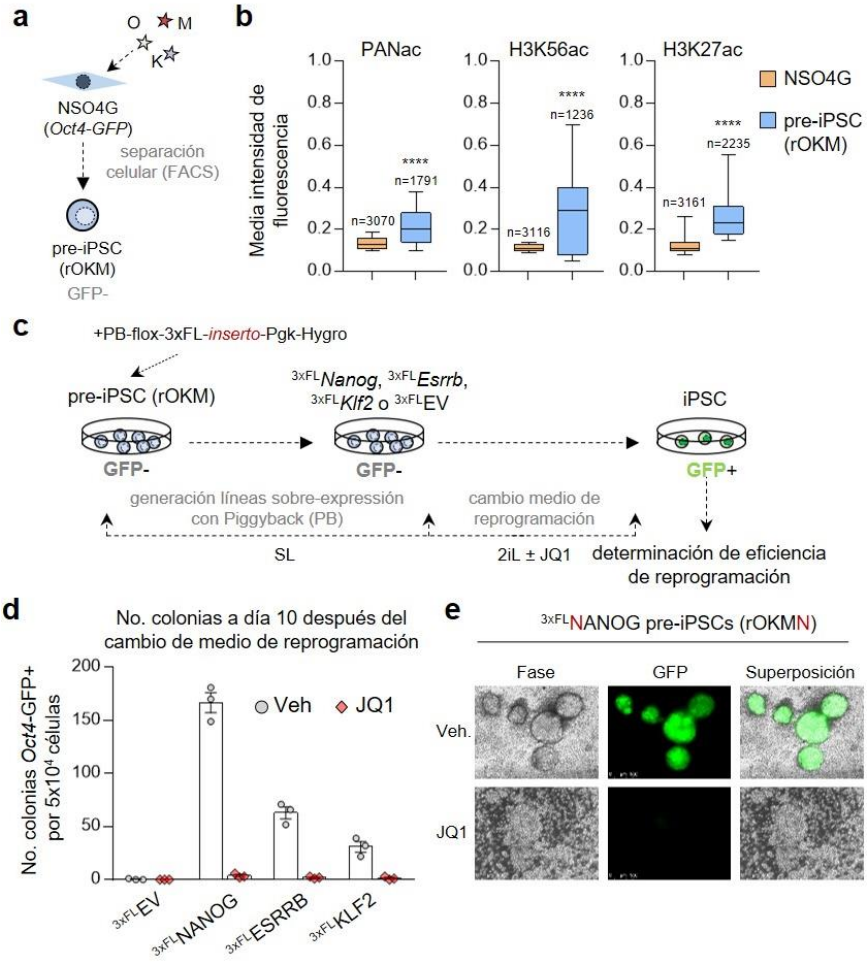


Figura R10. El tratamiento con JQ1 impide la reprogramación completa de pre-iPSCs. a, Representación esquemática del enriquecimiento mediante FACS de pre-iPSCs (GFP) mediante OKM (rOKM) a partir de línea neural progenitora (NSO4G) con reportero GFP bajo el control del promotor de *Oct4*. **b**, Valores de fluorescencia relativa de PANac (acetilación global), K3K56ac y K3K27ac en pre-iPSCs y las células

parentales NSO4G de las que fueron obtenidas mediante OKM siguiendo la estrategia indicada en **a**. n indica el número de células individuales analizadas. Los bigotes de los diagramas de cajas ocupan el rango de percentil 10th-90th Los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba ANOVA unidireccional con comparación múltiple de Tukey. ****p<0.0001. **c.** Representación esquemática del sistema de reprogramación usando intermediarios estables de reprogramación rOKM (pre-iPSC). Antes de iniciar la reprogramación en medio 2iL (inhibición de las quinasas MEK [PD0325901, 1 μM] y GSK3β [CHIR99021, 3 μM] en presencia de la citoquina LIF y ausencia de suero) las pre-iPSCs fueron mantenidas en cultivo de manera estable en presencia de suero y LIF (medio SL). Las pre-iPSCs fueron transfectadas con el vector PiggyBac (PB) conteniendo el transgén *Nanog*, *Esrrb*, *Klf2* o vector vacío (EV) como control, y posteriormente seleccionadas para las correspondientes expresiones constitutivas de los transgenes indicados mediante *hygromycin B*. **d**, Cuantificación del número de colonias iPSC (GFP+) obtenidas a día 10 de reprogramación en medio 2iL en presencia o ausencia de JQ1 (0,1μM) y en las condiciones indicadas. **e**, Imágenes representativas de colonias iPSC (GFP+) formadas a partir de pre-iPSCs transgénicas para *Nanog* reprogramadas en medio 2iL y ausencia de JQ1 (0,1μM).

Mientras que las poblaciones pre-iPSCs con niveles forzados de NANOG, ESRRB o KLF2 dan lugar a un número significativo de colonias GFP+ tras el cambio a medio 2iL en comparación al control (EV), la presencia de JQ1 impide la formación de iPSCs en todas las condiciones probadas (**Figura R10d-e**). Por otro lado, se observó que las pre-iPSCs que tenían expresión forzada para *Nanog* (rOKMN) mostraban una mayor eficiencia de reprogramación en ausencia de JQ1 (NANOG>ESRRB>KLF2>>EV), (**Figura R10d**), sin existir diferencias proteicas apreciables de estos 3 TFs ensayadas por western blot contra el epitopo Flag (datos no mostrados).

En conjunto, nuestros datos muestran que la presencia de JQ1 impide la generación de iPSCs en sistemas avanzados de reprogramación. Este efecto de la inhibición de la actividad BRD de las BET comprometiendo la adquisición del estado celular pluripotente se produce en el contexto de condiciones de cultivo 2iL y sobreexpresión de TFs de pluripotencia como NANOG, que facilitan la obtención y propagación de verdaderas células pluripotentes. De este modo, nuestros resultados posicionan a la actividad de unión a Kac de los

BRDs de la familia BET como esencial para que las pre-iPSC avancen hacia el estado fundamental de pluripotencia y formen iPSCs.

5.2.2 La actividad BRD de BET resulta esencial al inicio de la transición pre-iPSC a iPSC

Para ahondar en cómo la actividad BRD de las BET resulta imprescindible en la adquisición del estado celular pluripotente, se analizó el impacto de la presencia de JQ1 durante la transición pre-iPSC a iPSC. Para este fin, se utilizaron pre-iPSCs generadas a partir de la línea celular NSO4G y con expresión ectópica de NANOG (rOKMN), que fueron tratadas a distintos tiempos con JQ1 antes y/o después del cambio a medio de reprogramación 2iL (**Figura R11a**). Tal como se esperaba, la presencia de JQ1 durante todo el proceso de reprogramación abrogó la generación de colonias positivas para *Oct4*-GFP (**Figura R11b**). Se observó que la presencia de JQ1 en distintas etapas de la reprogramación, incluso con tiempos cortos de tratamiento, afectaba de manera significativa a la formación de iPSCs con respecto a células rOKMN tratadas con DMSO como control (**Figura R11b**). Por otro lado, se observó que las células tratadas con JQ1 durante los tres últimos días de ensayo (d9-d12) presentan una reducción significativa de ~20% de colonias GFP+ contabilizadas frente a >99% de reducción en el número de éstas en presencia de JQ1 en los primeros días de reprogramación (d0-d6) tanto en medio SL como en medio 2iL (**Figura R11b**). En consonancia, y apoyando que la función de BET es más importante en las etapas iniciales (d0-d3) y centrales (d3-d6) del proceso de establecimiento de la red endógena de pluripotencia, los porcentajes del número de colonias positivas para *Oct4*-GFP son significativamente menores en comparación con los ensayos tratados más tarde, incluso aunque sea durante un tiempo más prolongado de presencia de JQ1 de hasta seis días (d6-d12) (**Figura R11b**). En todos los casos analizados, resulta evidente que la inhibición transitoria de actividad BRD de las BET, incluso por un periodo de tan solo 24 horas, durante la transición pre-iPSC a iPSC impide la formación de colonias GFP+ (**Figura R11b**). De manera destacable, los resultados muestran que el tratamiento con JQ1 durante 24 horas en medio SL previo al cambio de medio de reprogramación 2iL es suficiente para impedir la

generación de iPSCs de manera permanente (**Figura R11b**). En su conjunto, nuestros datos sugieren que la inhibición de la actividad BRD de las BET en las etapas iniciales de la transición pre-iPSC a iPSC puede conllevar cambios moleculares permanentes en la biología celular de los intermediarios avanzados de reprogramación (ej. rOKMN) que afectan de manera negativa a la adquisición del estado celular pluripotente.

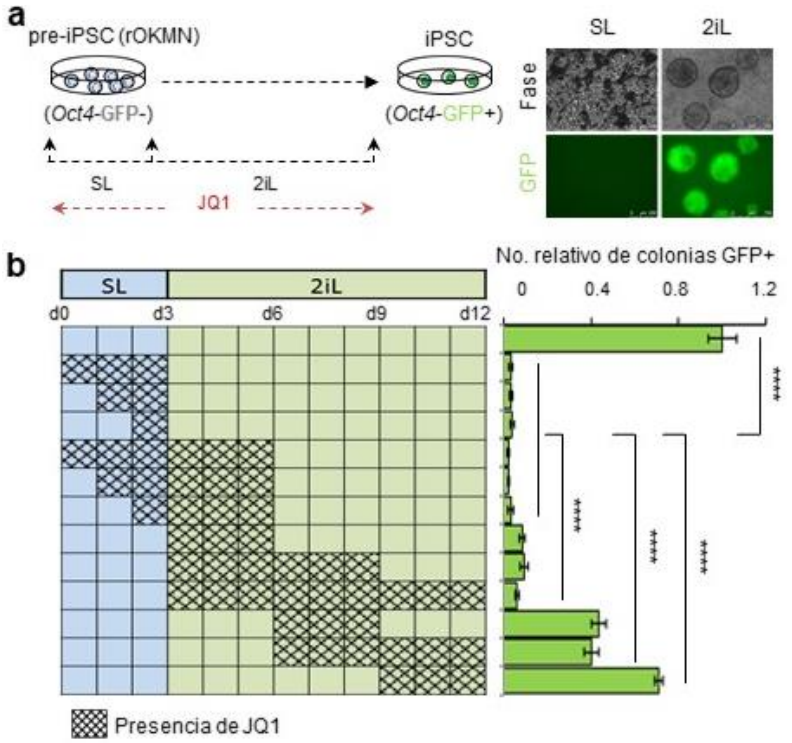


Figura R11. La presencia de JQ1 impide el inicio de la transición pre-iPSC a iPSC. **a**, Representación esquemática del ensayo de reprogramación para valorar el impacto en escala temporal del tratamiento con JQ1 a partir de pre-iPSCs (rOKMN) con reportero GFP bajo el control del promotor de *Oct4*. Las pre-iPSCs son mantenidas de manera estable en medio estándar de cultivo (SL) y estimuladas a ser reprogramadas en medio de reprogramación 2iL en ausencia de suero. A la derecha se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia de pre-iPSCs mantenidas en SL y iPSC generadas tras 9 días en medio 2iL. **b**, Cuantificación del número de colonias positivas para *Oct4*-GFP generadas (derecha) siguiendo los tratamientos indicados (izquierda). Se indican los tratamientos con JQ1 (0,5μM) (cuadro con trama) o vehículo DMSO

(cuadro sin trama) en medio SL (azul) o 2iL (verde) durante un periodo de 12 días. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de Student no pareada de dos colas. ****p<0.0001.

5.2.3 La presencia de JQ1 no afecta a la capacidad proliferativa ni a la viabilidad celular de las pre-iPSCs

Numerosas evidencias científicas han puesto de manifiesto que alteraciones en los procesos celulares relacionados a proliferación y viabilidad pueden impactar directamente y de manera no específica en el rendimiento de SCR para formar iPSCs [83,410-412]. De este modo, se examinó si el efecto de la inhibición de la actividad BRD de BET en la transición de pre-iPSC a iPSC en condiciones de cultivo estándar SL pudiese estar mediado por un defecto general en proliferación o viabilidad celular (**Figura R12a**). De manera general, el tratamiento con JQ1 no produjo alteraciones evidentes en la morfología de las pre-iPSCs en comparación con las tratadas con DMSO (Veh.) (**Figura R12b**). Tampoco se detectaron diferencias apreciables con respecto al porcentaje de muerte celular entre pre-iPSCs tratadas con JQ1 o Veh. (**Figura R12c**). En la misma línea que los resultados anteriores, la presencia de JQ1 no alteró el porcentaje de pre-iPSCs presentes en G1, S o G2-M con respeto al tratamiento control de DMSO (Veh.) (**Figura R12c**). Confirmando el análisis de ciclo celular, el seguimiento del marcador celular de proliferación Ki67, ausente en células quiescentes en G0, mediante ensayos de inmunofluorescencia no reveló diferencias significativas entre células tratadas con JQ1 o con D>MSO (Veh.) (**Figura R12d-e)** Estos resultados muestran que la exposición a JQ1 no impide la transición pre-iPSC a iPSC a través alteraciones en la capacidad proliferativa o viabilidad celular de las células tratadas.

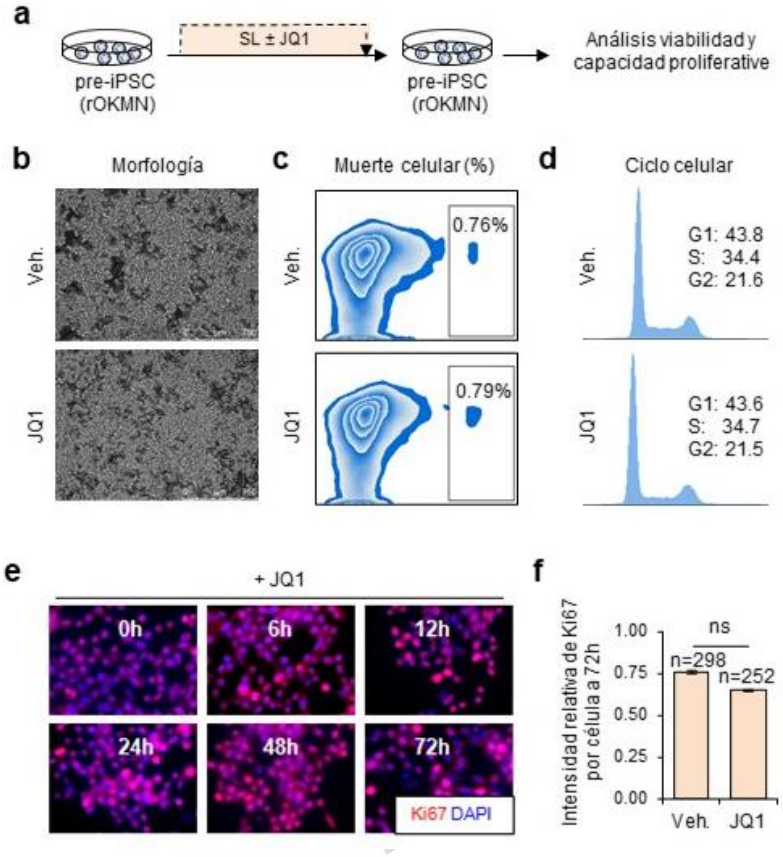


Figura R12. Las pre-iPSCs tratadas con JQ1 no presentan defectos en ciclo celular y viabilidad. a, Representación esquemática de la estrategia para valorar el impacto de la presencia de JQ1 (0,5μM) sobre viabilidad celular y capacidad proliferativa de pre-iPSCs (rOKMN) cultivadas en presencia de suero y LIF (SL). **b**, Imágenes visibles representativas obtenidas por microscopio de fases de las células cultivadas en presencia de DMSO (Veh.) o JQ1 (0,5μM). **c.** Porcentaje de muerte celular analizado por citometría de flujo en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (0,5μM) o DMSO (Veh) en SL. **d**, Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en pre-iPSCs tratadas con JQ1 o DMSO (Veh) en SL. Se muestra el porcentaje de células presentes en G1, S y G2 (G2-M). **e**, Imágenes representativas obtenidas mediante inmunofluorescencia de la presencia del marcador de proliferación celular Ki67 en pre-iPSC tratadas con JQ1 (0,5μM) durante 72 horas en SL. En rojo se muestra Ki67 y en azul los núcleos teñidos con DAPI. **f**, Cuantificación de la intensidad de Ki67 relativizada a la señal de DAPI por célula pre-iPSC individual tratada con JQ1 (0,5μM) o DMSO (Veh.) durante 72 horas en SL. El análisis estadístico fue realizado mediante prueba t de Student no pareada de dos colas. ns indica diferencias no significativas.

5.3 DISECCIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA ACTIVIDAD BRD DE LA FAMILIA BET EN LA ADQUISICIÓN DE PLURIPOTENCIA

5.3.1 La inhibición de la actividad BRD de BET altera la composición de la cromatina

El requerimiento de la actividad BRD de las proteínas BET en la adquisición del estado celular pluripotente nos instó a investigar qué programas moleculares envueltos en esta fase de reprogramación se encuentran alterados ante la inhibición de la actividad BRD de reconocimiento Kac de esta familia de coactivadores transcripcionales. Ya que numerosas evidencias apoyan que la familia BET interviene en el reclutamiento de múltiples factores y cofactores a la cromatina, entre los que se encuentran TFs y reguladores epigenéticos [143,271,274,378,413], se analizó si la inhibición de la actividad BRD de BET podría afectar a la composición de la fracción proteica unida a cromatina en pre-iPSCs. En concreto, decidimos centrarnos en el efecto del tratamiento agudo con JQ1 de 24 horas en condiciones de cultivo SL ya que nuestros resultados mostraron que era suficiente para comprometer de manera significativa la transición pre-iPSC a iPSC (**Figura R11b**).

Se ha mostrado que el ligando específico JQ1 se une competitivamente al bolsillo hidrofóbico e impide el reconocimiento BRD-Kac de los miembros de esta familia desplazándolos de la cromatina [241,301]. Por esto, en primer lugar, se analizó si el tratamiento con JQ1 era suficiente para desplazar a los miembros de la familia BET (BRD2, BRD3 y BRD4) de la cromatina de pre-iPSCs. De manera consistente a otros contextos celulares, nuestros resultados confirmaron que la presencia de JQ1 también fue suficiente para reducir de manera drástica la presencia de BRD2, BRD3 y BRD4 en la cromatina aislada de pre-iPSCs en SL en comparación con las condiciones control con DMSO (Veh.) (**Figura R13a**).

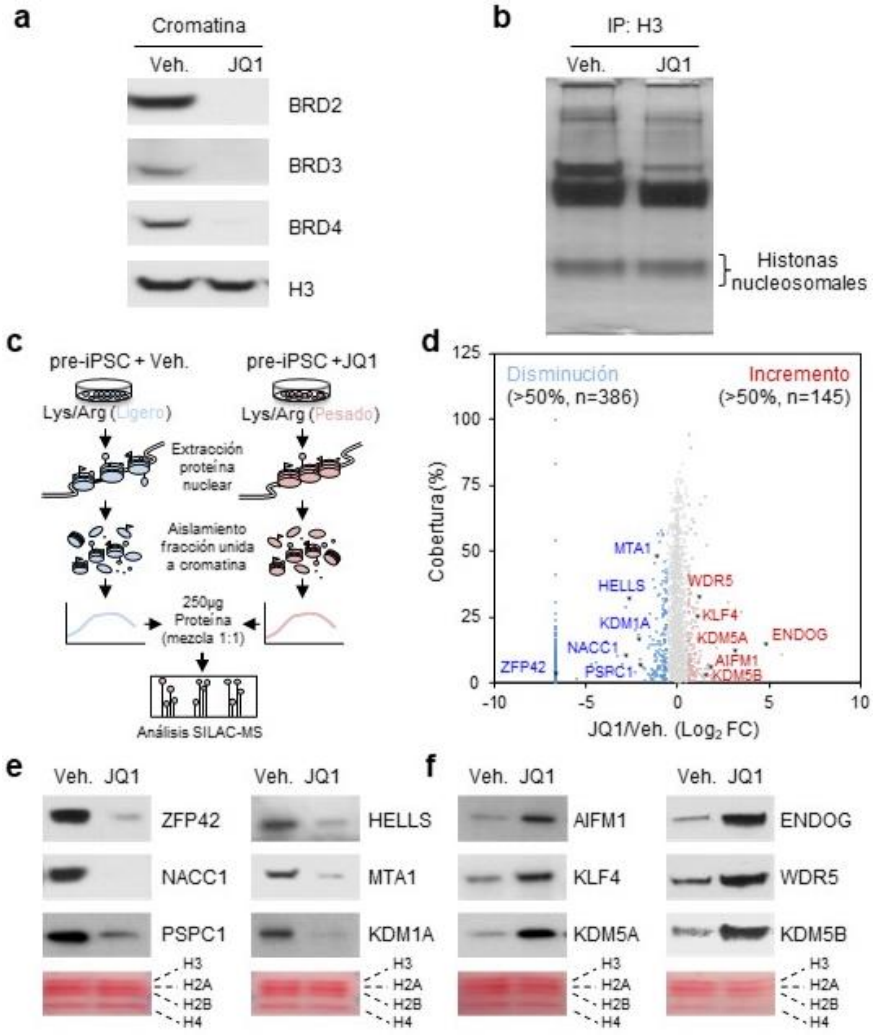


Figura R13. La actividad BRD de BET interviene en la composición de la cromatina de pre-iPSCs. a, Análisis mediante *western blot* (WB) de la presencia de BRD2, BRD3 y BRD4 de la familia BET en la fracción proteica unida a cromatina (CB) procedente de pre-iPSCs cultivadas en SL y tratadas con JQ1 (0,5µM) o DMSO (Veh.) durante 24 horas**.** Los niveles de la histona H3 fueron analizados como control de carga. **b**, Ensayo de enriquecimiento de fracción nucleosomal de histona 3 (*H3 nucleosome pull down)* a partir de pre-iPSCs tratadas como en **a**. La inmunoprecipitación de la fracción nucleosomal se realizó mediante un anticuerpo específico contra H3 global a partir de extractos proteicos nucleares. La detección de las proteínas que interaccionan de manera directa o indirecta con H3 se realizó mediante la tinción

con nitrato de plata. Se indica en la imagen la señal correspondiente al tamaño de las histonas principales que conforman el nucleosoma (H2A, H2B, H3 y H4). **c**, Representación esquemática de la estrategia SILAC/MS para identificar posibles cambios en la composición de la cromatina producidos por la inhibición de la actividad BRD de BET. La fracción proteica unida a cromatina (CB) fue obtenida de pre-iPSCs tratadas como en **a**. y previamente marcadas durante diez días con la presencia en el medio de cultivo de dos combinaciones distintas de isótopos estables de los aminoácidos lisina (Lys) y arginina (Arg). 250 µg de fracción CB pura procedente de cada una de las dos condiciones ensayadas (JQ1 y Veh.) fueron mezcladas en una ratio 1:1 y posteriormente analizadas por espectrometría de masas (LC-MS/MS). **d**, Diagrama de dispersión de los datos obtenidos por SILAC/MS siguiendo la estrategia mostrada en **c**. El eje de ordenadas muestra la cobertura (%) de aminoácidos y el de ordenadas la relación (en Log2) entre los niveles proteicos presentes en células tratadas con JQ1 (*Lys*/*Arg pesados*) con respecto a los presentados por las tratadas con DMSO (*Lys*/*Arg ligeros*). Los puntos azules y rojos representan las proteínas cuya presencia está disminuida o aumentada más del 50% en las células tratadas con JQ1 con respecto a las tratadas con DMSO (Veh.), respectivamente. n representa el número total de proteínas en la clasificación indicada. **e-f**, Validación mediante la técnica de WB de candidatos resaltados en el panel **d** cuya presencia se encuentra disminuida (**e**) o aumentada (**f**) en la fracción CB de pre-iPSCs como consecuencia de la presencia en SL de JQ1 (0,5µM) durante 24 horas. Se indican como control de carga los niveles proteicos de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 detectados mediante la tinción de Ponceau.

Luego, mediante un enriquecimiento de fracción nucleosomal de histona H3 se puedo apreciar que las pre-iPSCs tratadas con JQ1 en SL mostraban evidencias de cambios en el reclutamiento de proteínas en comparación con la condición control en presencia de DMSO (Veh.) (**Figura R13b**). Con el fin de conocer qué proteínas estaban deslocalizadas en presencia de JQ1, y en qué grado podría manifestarse una localización aberrante, se diseñó una estrategia cuantitativa para analizar sólo la fracción proteica unida de manera directa o indirecta a la cromatina mediante el marcaje estable de isótopos por aminoácidos en cultivo celular y detección por espectrometría de masas (SILAC/MS, por sus siglas en inglés) (**Figura R13c**). El análisis *in silico* de los resultados obtenidos a partir de esta técnica ómica reveló que el tratamiento con JQ1 produce alteraciones importantes en la fracción proteica unida a la cromatina (CB, por sus siglas en inglés) con respecto al tratamiento con el vehículo control DMSO (**Figura R13d**). En concreto, se detectó en la fracción CB una reducción de más del doble (>50%) en la presencia de 386 proteínas, mientras 145 proteínas

mostraron un incremento mayor del 50% de sus niveles en cromatina en las pre-iPSCs tratadas con JQ1 con respecto a las tratadas con el vehículo control (Veh.) (**Figura R13d**). Mediante ensayos de *western blot* se validaron varios de los principales candidatos que disminuía (ej. ZFP42, NACC1, PSPC1, HELLS, MTA1 y KDM1A) (**Figura R13e**). o aumentaba (ej. AIFM1, KLF4, KDM5A, ENDOG, WDR5 y KDM5B) (**Figura R13f**) su presencia en la fracción proteica CB obtenida a partir de pre-iPSCs cultivas en SL y tratadas durante 24 horas con vehículo o JQ1.

En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de la actividad BRD de BET durante la SCR, cambia sustancialmente la composición de la fracción proteica unida a cromatina.

5.3.2 JQ1 altera la cromatina de manera dependiente e independiente de actividad transcipcional

Teniendo en cuenta el papel de las proteínas BET en la regulación transcripcional, se procedió a examinar la posible existencia de correlación entre las 531 deslocalizadas en la fracción CB en presencia de JQ1 (**Figura R14a**) con el cambio transcripcional de los genes que las codifican como consecuencia directa o indirecta del desplazamiento de las proteínas BET de la cromatina en respuesta a la inhibición de su actividad BRD (**Figura R13a**). Para este fin, se analizaron los cambios transcripcionales globales en pre-iPSCs tratadas durante 24 horas en SL con JQ1 con respecto a DMSO mediante secuenciación profunda de ARN (RNA-seq, por sus siglas en inglés). De las 145 proteínas cuya deslocalización en la fracción CB aumenta más del doble (>50%) (**Figuras R13d y R14a**), 60 de éstas también presentan un incremento transcripcional significativo mayor del 10% (ej. *Kdm1b*, *Rybp*, *Mecp2* y *Ap2m1*), mientras que no se observó esta correlación positiva entre aumento de niveles proteicos con aumento de expresión en los genes que codifican a estas proteínas en el restante 59% (85 de 145) (ej. *Wdr5*, *Klf4*, *Med27*, *Kdm5b*, *Ino80* y *Prmt1*) (**Figura R14b y R14d**).

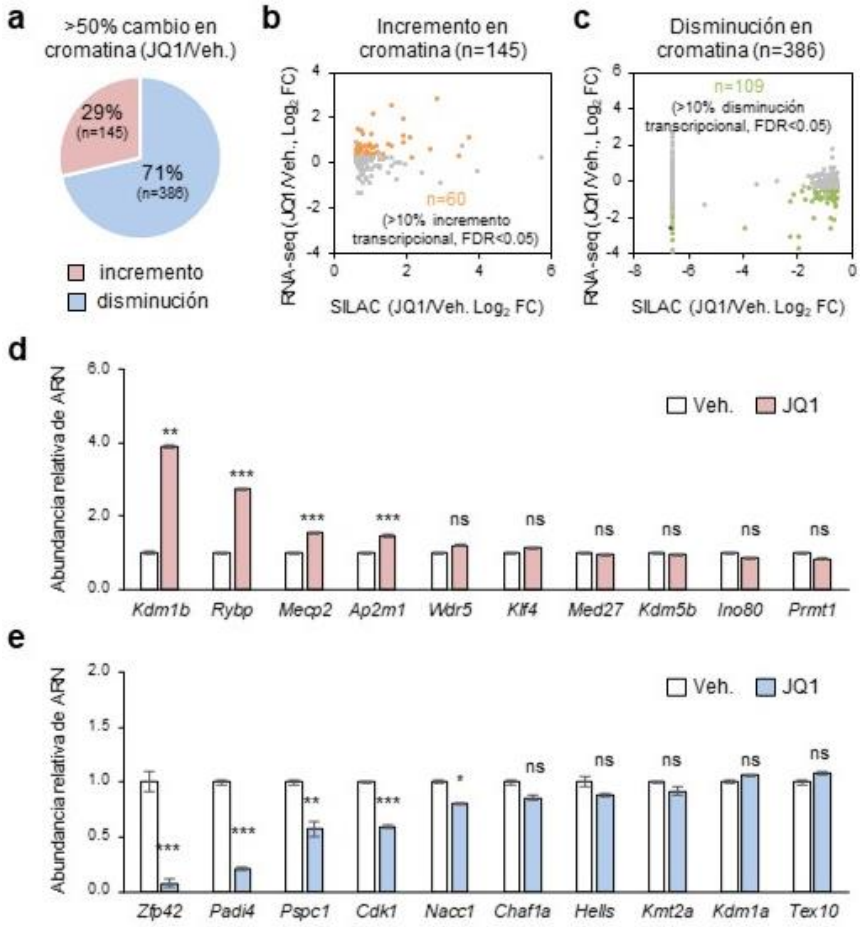


Figura R14. Cambios en la cromatina dependientes e independientes de actividad transcripcional en presencia de JQ1. a. Diagrama de tarta mostrando el porcentaje y número de proteínas con incremento (rosa) o disminución (azul) de sus niveles (>50%) en la fracción unida a cromatina (CB) mediado por el tratamiento con JQ1 (0,5μM) respecto a DMSO (Veh.). **b-c**, Diagrama de dispersión mostrando los cambios en la expresión génica (ordenadas) y los cambios en la abundancia proteica en la fracción CB (abscisas). Los cambios transcripcionales y los cambios proteicos fueron identificados mediante las técnicas ómicas de RNA-seq y SILAC-MS de manera respectiva a partir de pre-iPSC cultivadas en SL y tratadas durante 24h con JQ1 (0,5μM) o DMSO (Veh.) como control. Se indica de manera coloreada aquellos genes que codifican proteínas cuya presencia en cromatina se encuentra alterada más de un 50% en presencia de JQ1 y cuya actividad transcripcional se encuentra incrementada (**b**) o disminuida (**c**) más de un 10% de manera significativa. n=número

de factores en la categoría. Valores expresados como Log2 del factor de cambio JQ1/Veh. FDR: valor estadístico de tasa de falso hallazgo. **d-e**, Abundancia relativa de los niveles de ARN de genes que codifican para proteínas cuya abundancia incrementa (**d**) o disminuye (**e**) más de un 50% en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (0,5μM) durante 24h. Los datos son mostrados como media ± s.e.m. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de Student de dos colas. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ns diferencia no significativa.

Por otro lado, con respecto a las 386 proteínas cuya presencia en cromatina disminuye más de la mitad (>50%) en presencia de JQ1 (**Figuras R13d y R14a**), nos encontramos en una situación similar, pero a la inversa. Así un 28% (109 de 386) de las que disminuyen en la fracción CB (>50%) también se observa una correlación positiva con la disminución transcripcional a la baja (>10%) de los genes que las codifican en presencia de JQ1 (ej. *Zfp42*, *Padi4*, *Pspc1*, *Cdk1* y *Nacc1*), pero no así en el 72% (277 de 386) restante (ej. *Chaf1a*, *Hells*, *Kmt2a*, *Kdm1a* y *Tex10*) (**Figura R14c y R14e**).

Estos resultados corroboran que la actividad BRD de las BET resulta esencial para la composición de la cromatina tanto de manera dependiente como independiente de regulación transcripcional. Así mismo, estos datos sugieren la posibilidad de que la actividad BRD de las BET intervenga de manera directa o indirecta a nivel transcripcional activando (31%) o reprimiendo (28%) genes que codifican proteínas cuya presencia en cromatina se ve alterada (>50%) en presencia de JQ1. Por otro lado, en el contexto de aquellos genes cuya expresión no varía significativamente y que codifican para proteínas cuya presencia se ve afectada (>50%) en la cromatina de pre-iPSCs con la actividad BRD de BET inhibida, es posible que las BET y los complejos en los que participan puedan actuar compitiendo por los sitios de unión a cromatina (59%) o que estas proteínas con dominios BRD resulten necesarias para el reclutamiento en la fracción CB (72%).

5.3.3 JQ1 altera la presencia en cromatina de proteínas involucradas en procesos clave en reprogramación

Para continuar avanzando en el porqué de la actividad BRD de BET resulta esencial en la adquisición del estado celular pluripotente durante reprogramación se investigó el impacto que el tratamiento con JQ1 en las pre-iPSCs podría estar teniendo sobre distintos aspectos clave en la biología celular. Para este fin se realizaron diversas aproximaciones *in silico* a través de la herramienta STRING para estudios funcionales de redes con asociaciones proteicas. En primer lugar, los análisis mediante ontología génica (GO) de procesos biológicos de las 531 proteínas deslocalizadas en la fracción CB en presencia de JQ1 (**Figura R13d**) revelaron la existencia de alteraciones significativas en procesos de regulación de la expresión génica, procesos del desarrollo, organización de la cromatina, arquitectura nuclear y respuesta a daño en el ADN entre otros (**Figura R15a**). Por otro lado, análisis de las rutas (*Reactome Pathways*) en las que estas 531 proteínas pueden estar involucradas también revelaron entre las más significativas aquellas relacionados con el control de la expresión génica, organización de la cromatina y control del daño en el ADN (**Figura R15b**). Teniendo en cuenta que estas tres rutas alteradas en presencia de JQ1 han sido mostradas por numerosos estudios como claves durante la SCR para generar iPSCs [60,181,414], decidimos continuar con un análisis *in silico* de enriquecimiento funcional de interacciones proteicas para determinar las posibles conexiones existentes entre las 531 proteínas deslocalizadas en cromatina de pre-iPSCs tratadas con JQ1. La visualización de las redes de interacción, basadas en datos publicados, para las 531 proteínas muestra la existencia de interacciones sencillas y complejas con rangos relevantes de confidencia entre 0.4 y 0.9 (**Figura R15c**). De manera destacable, una fracción considerable de las 531 proteínas alteradas en la fracción CB por JQ1 están involucradas en el control de alguno o varios de los tres procesos (ej. regulación expresión génica, organización cromatina y respuesta al daño en el ADN) que resultan clave para alcanzar el estado celular pluripotente [60,181].

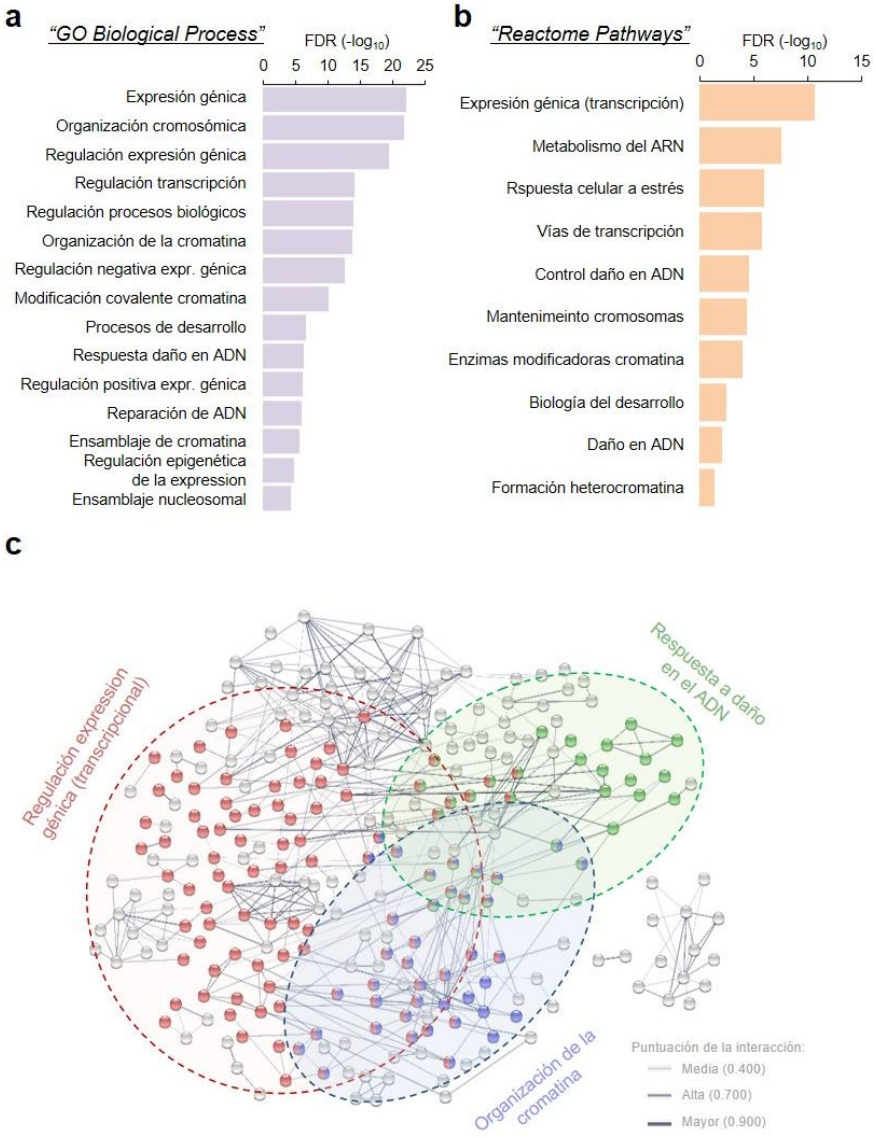


Figura R15. Procesos generales en los que participan las proteínas de la fracción CB afectadas por la presencia de JQ1. a, Análisis de ontología génica (GO) de procesos biológicos asociados a las 531 proteínas alteradas en la cromatina por tratamiento de pre-iPSCs con JQ1 (0,5μM) identificadas por SILAC-MS. **b**, Análisis de las principales rutas (*Reactome Pathways*) en las que intervienen las 531 diferencialmente localizadas en la cromatina en respuesta a la inhibición de la

actividad BRD de BET. **c**, Análisis de enriquecimiento funcional de las posibles interacciones teóricas de las 531 proteínas analizadas en **a** y **b**. Se resaltan las proteínas que participan en rutas involucradas en regulación de la expresión génica (rojo), organización de la cromatina (azul) y respuesta al daño en el ADN (verde). La leyenda indica el grado de confidencia de la puntuación teórica de la interacción. Todos los análisis *in silico* de esta figura fueron realizados por medio de la herramienta funcional STRING.

5.3.4 La inhibición de la actividad BRD de BET afecta a la reparación de daño en el ADN

Ya que el tratamiento con JQ1 parece tener influencia sobre rutas de reparación del ADN (**Figura R15**), se valoró cuáles de las 531 proteínas cuyos niveles en la fracción CB varían más de un 50% podrían estar relacionados con procesos relacionados a daño en el ADN. Para este fin, se realizaron análisis *in silico* de ontología génica (GO) mediante la herramienta funcional de anotación DAVID y se identificaron 41 proteínas involucradas en procesos relacionados con daño en el ADN (**Figura R16a**). De éstas, 29 presentan sus niveles proteicos disminuidos (>50%) en la fracción unida a cromatina (CB) en presencia de JQ1 y 12 los presentan aumentados (>50%) en las mismas condiciones de tratamiento (**Figura R16a**). De todas las candidatas, la abundancia de MSH2, una proteína central en la vía canónica de reparación de errores de discordancia en el ADN (MMR, por sus siglas en inglés) [415], se encuentra entre las más reducidas en la fracción CB de las células tratadas con JQ1 (**Figura R16a**). Mediante análisis en profundidad por medio de rutas KEGG en DAVID, se determinó el grado de alteración de las proteínas que intervienen en esta ruta canónica MMR de reparación del ADN mediada por MSH2. Se encontró que la mayor parte de proteínas que intervienen en la ruta MMR presentan niveles disminuidos en la cromatina de pre-iPSCs tratadas con JQ1 en comparación con las tratadas con el vehículo DMSO (**Figura R16b**). Por otro lado, se observó que lo niveles de la variante histónica H2AFX (abreviada de manera común como H2AX), que interviene en reparación en respuesta al daño en ADN (DDR, por

sus siglas en inglés), se encontraban aumentados en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (**Figura R16a**).

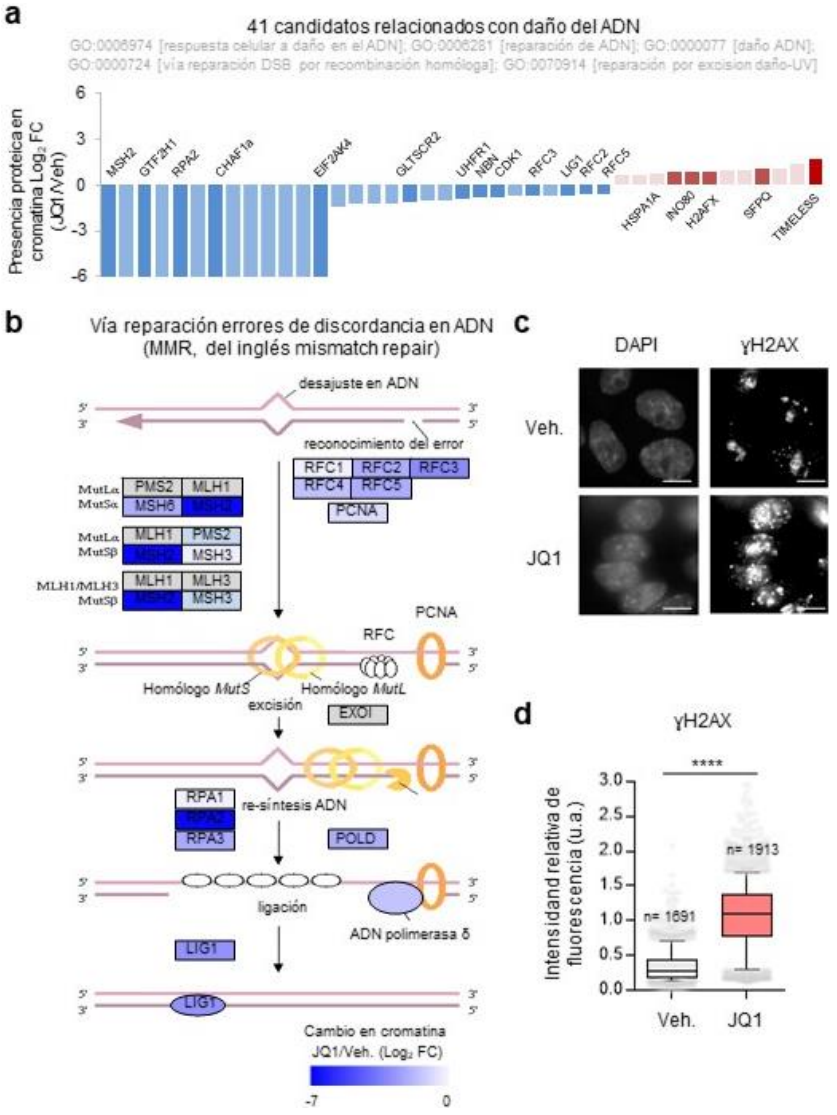


Figura R16. JQ1 conlleva acumulación de daño en el ADN de pre-iPSCs. a, Diagrama de barras mostrando el factor de cambio en la fracción CB determinado por SILAC-MS de factores proteicos incluidos en listas de ontología génica (GO) asociadas con daño en el ADN en pre-iPSCs tratadas con JQ1. Los análisis GO se

realizaron a partir de la herramienta funcional DAVID. **b**, Representación esquemática de la vía canónica de MMR modificada a partir de vías KEGG de la herramienta funcional DAVID. La intensidad del azul en los factores explicitados representa el valor (en Log2) del factor de cambio detectado por SILAC/MS en la fracción CB de las células tratadas con JQ1 con respecto al control DMSO (Veh.). **c**, Imágenes representativas de los niveles inferidos de daño en ADN de pre-iPSCs tratadas con JQ1 o DMSO (Veh.) obtenidas por microscopía de fluorescencia. Para la determinación estimada de daño en ADN a partir de la acumulación de roturas en doble cadena de ADN se tiñeron las células con un anticuerpo específico contra γ-H2AX (derecha) y el contenido nuclear se visualizó mediante marcaje con DAPI (izquierda). La barra de escala representa 5μm. **d**, Cuantificación mediante ensayos de inmunofluorescencia cuantitativa de célula sencilla de los niveles de γ-H2AX en pre-iPSCs en SL bajo los tratamientos indicados. La intensidad relativa de fluorescencia de γ-H2AX por célula se normalizó por la intensidad de DAPI en la misma célula. n indica el número de células individuales analizadas. Los bigotes de los diagramas de cajas ocupan el rango de percentil 10th-90th. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba ANOVA unidireccional con comparación múltiple de Tukey. ****p<0.0001. Las pre-iPSCs analizadas en los paneles **a**, **b**, **c** y **d** fueron tratadas en las mismas condiciones durante 24h en SL en presencia de JQ1 (0,5μM) o DMSO como vehículo control.

Además, también se observó una mayor presencia en la fracción CB de las células tratadas con JQ1 de los factores INO80 y TIMELESS de la ruta DDR, cuyos niveles aumentan con el grado de severidad de las lesiones [416,417] (**Figura R16a**). Estos datos sugerían la posibilidad de que la inhibición de la actividad BRD de BET conllevase un aumento en los niveles de daño presentes en el ADN de pre-iPSCs como resultado de alteraciones en la abundancia en cromatina de componentes esenciales de rutas de reparación de daño en el ADN. Para comprobar esta hipótesis, se procedió a analizar si la actividad BRD de BET era necesaria para el correcto funcionamiento de la respuesta DDR a dañó en el ADN mediante el análisis de los niveles de fosforilación de la variante histónica H2AX. A este respecto, H2AX fosforilada en el residuo serina 140, abreviada de manera común como γ-H2AX, se encuentra presente en torno a las zonas de lesión en el ADN facilitando el reclutamiento de factores que median la reparación del daño, y el aumento en los niveles de γ-H2AX se producen en torno a la lesión no reparada como consecuencia de la existencia de defectos en la respuesta DDR [418,419]. De manera consistente con nuestra hipótesis, se observó

que el tratamiento con JQ1 en células pre-iPSCs cultivadas en SL producía un aumento significativo de los niveles de γ-H2AX (**Figura R16c-d**).

En conjunto, nuestros datos muestran que la actividad BRD de BET resulta necesaria para una reparación eficiente del daño en el ADN durante reprogramación, un efecto de JQ1 que se ha documentado recientemente en otros contextos celulares incluyendo cáncer [420-422]. Teniendo en cuenta que la correcta reparación del daño en el ADN que aparece durante la SCR es un requisito esencial para que se formen iPSCs así como para evitar la inestabilidad genómica en iPSCs resultantes [172,414,423-426], la incapacidad de transitar de pre-iPSC a iPSC en ausencia de actividad BRD de BET (**Figuras R10 y R11**) es probable que se deba al menos en parte a las deficiencias observadas de las vías de respuesta a daño en ADN (ej. MMR y DDR) en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (**Figura R16**).

5.3.5 La actividad BRD de BET es necesaria para la organización de la cromatina

La reestructuración de la cromatina resulta clave durante la SCR para la obtención de iPSCs [206-209,226,227]. Teniendo en cuenta que la presencia de JQ1 en pre-iPSCs altera procesos relacionados con la organización de la cromatina (**Figura R15**), se decidió analizar con más detalle la implicación de la actividad BRD de las BET en este proceso. En primer lugar, se identificó que un 17% de las 531 proteínas cuya presencia se encuentra alterada en la cromatina (> 50%) en pre-iPSCs tratadas con JQ1 se encuentran involucradas en procesos de ontología génica (GO) relacionados con el control de la estructura de la cromatina (ej. organización de la cromatina, ensamblaje de los nucleosomas y regulación de la organización cromosómica) (**Figura R17a**). De entre estas 91 proteínas 30 aumentan (ej. MECP2, WDR5, RYBP, INO80, KDM1B, H1f0 y PRMT1) y 60 disminuyen (ej. KDM1A, CDK1, CENPT, HELLS, KMT2A, HIST1H2BA, CHAF1a y PADI4) en más

de un 50% sus niveles en la fracción unida a cromatina (CB) en presencia de JQ1 (**Figura R17a**).

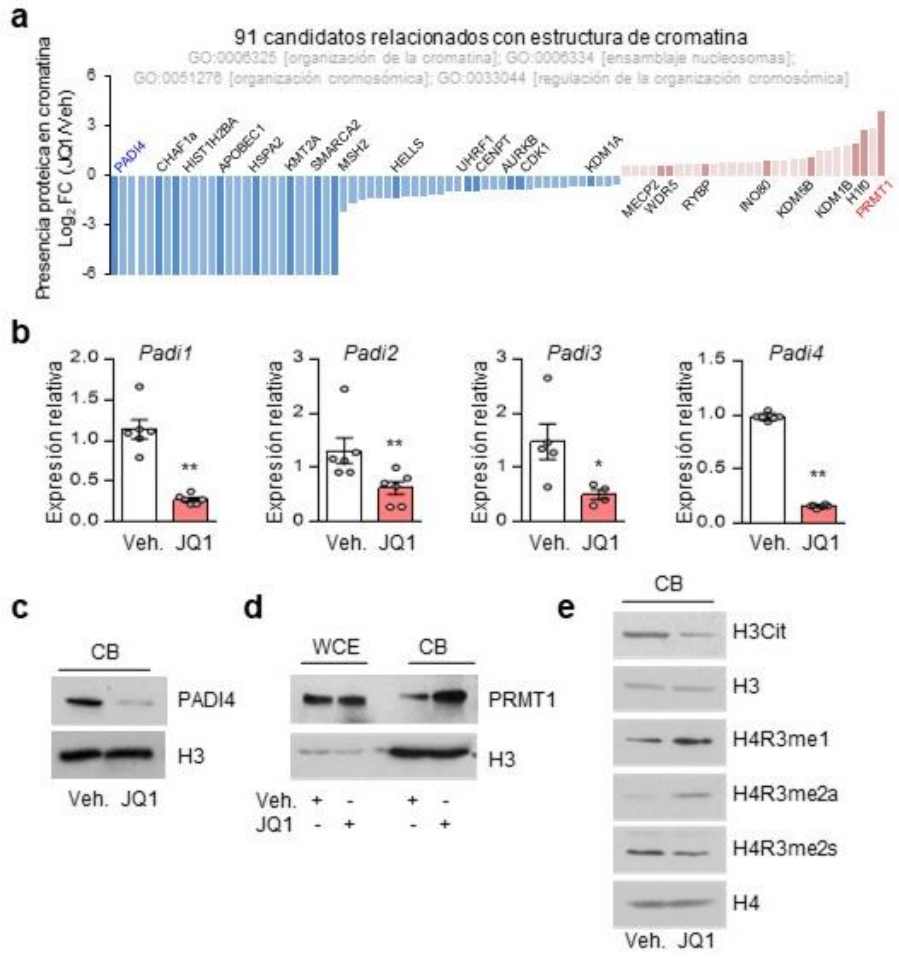


Figura R17. JQ1 altera la disponibilidad en la cromatina de factores que la regulan estructuralmente. Diagrama de barras mostrando el factor de cambio en la fracción CB determinado por SILAC-MS de factores proteicos incluidos en listas de ontología génica (GO) relacionadas con estructura de la cromatina en pre-iPSCs tratadas con JQ1. Los análisis GO se realizaron a partir de la herramienta funcional DAVID. **b**, Análisis mediante RT-qPCR de la expresión relativa de los genes *Padi* en condiciones control (Veh.) o en células tratadas con JQ1. Los datos son mostrados como media ± s.e.m. (cada círculo representa un experimento independiente). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. *p<0.05;

$p<0.01$. **c, Análisis mediante *Western blot* (WB) de los niveles de PADI4 en la fracción unida a cromatina (CB) de pre-iPSCs tratadas con vehículo o JQ1. **d**, Análisis de los niveles de PRMT1 en extractos celulares completos (WCE) y en extractos de fracción CB mediante WB en las condiciones indicadas. **e**, Análisis mediante WB de las modificaciones de histonas indicadas a partir de cromatina aislada de pre-iPSCs tratadas con JQ1 o su vehículo (Veh.). Los niveles de la histona H3 y H4 fueron analizados como control de carga en los paneles **c**, **d** y **e**. Las pre-iPSCs analizadas en los paneles **a**, **b**, **c**, **d** y **e** fueron tratadas en las mismas condiciones durante 24h en SL en presencia de JQ1 (0,5μM) o DMSO como vehículo control.

Entre estos candidatos nos llamó la atención PADI4 y PRMT1 por los siguientes motivos: 1) por encontrarse entre las proteínas cuyos niveles se encuentran más alterados en CB de pre-iPSCs tratadas con JQ1 (**Figura R17a**); 2) PADI4 y PRMT1 son dos de los principales factores responsables de la modificación, mediante citrulinación y metilación de manera respectiva, de residuos de arginina en varios tipos de proteínas, entre las que se encuentran histonas, con funciones importantes tanto en relación con la estructura de la cromatina, la reparación del ADN y la transcripción génica [427-430]; 3) la citrulinación por parte de la familia de *deaminasas peptidilarginina* PADI como la metilación por la familia de *arginina metiltransferasas* PRMT puede darse sobre los mismos residuos de arginina, pero son procesos mutuamente excluyentes [429,431-434]; 4) PADI4 ha sido mostrado como un facilitador de reprogramación esencial para la adquisición de pluripotencia [430]; y 5) al contrario que ocurre con otras PRMTs, el papel de PRMT1 en reprogramación y pluripotencia todavía resulta desconocido [435,436], aunque sí parece influir durante el desarrollo embrionario temprano [437]. En primer lugar, se analizó la correlación entre el impacto a nivel transcripcional de la actividad BRD de BET de los genes que codifican estas proteínas con su abundancia a nivel proteico en la cromatina. La inhibición de la actividad BRD de BET compromete de manera significativa la activación transcripcional tanto del gen *Padi4* como la de los otros genes de la familia *Padi* (*Padi1, Padi2* y *Padi3*) (**Figura R14e y Figura R17b**). Teniendo en cuenta que PADI4 es el único miembro esta familia que posee señal de localización nuclear y que participa en la organización de la cromatina [428,430,438,439],

se procedió a la validación en la disminución de sus niveles proteicos en la fracción CB de pre-iPSCs tratadas con JQ1 mediante *western blot* (**Figura R17b**). Así, PADI4 se encuentra dentro del 28% (109 de 386) de proteínas cuya presencia disminuye en la fracción CB (>50%) debido a un efecto de correlación positiva con la disminución transcripcional de los genes que las codifican en presencia de JQ1 (**Figura R14c y R14e**). Sin embargo, en el caso de PRMT1 se observó que el aumento de sus niveles proteicos en la fracción de CB no se correspondía con variaciones evidentes en sus niveles proteicos totales (**Figura R17d**), lo que correlaciona con la ausencia de cambios significativos detectados en la expresión de su gen (**Figura R14d**). De este modo, PRMT1 se engloba dentro del 41% de las 145 proteínas cuya deslocalización en la fracción CB aumenta más del doble (>50%) en las que no existe correlación positiva entre aumento de niveles en cromatina con aumento transcripcional de los genes que las codifican (**Figura R14b y R14d**).

Teniendo en cuenta estos resultados, se prosiguió analizando el posible impacto de los niveles alterados en cromatina de PADI4 y PRMT1 sobre el estado de modificaciones en residuos de arginina de histonas llevadas a cabo de manera específica por estos dos "escritores" epigenéticos. De manera consistente con la disminución en cromatina de PADI4 en ausencia de actividad BRD de BET, las células tratadas con JQ1 presentaron niveles de H3 citrulinada reducidos comparados con a las células tratadas con DMSO (Veh.) (**Figura R17d**). Por otro lado, en consonancia con la mayor presencia de PRMT1 en cromatina en presencia de JQ1, también se observó un aumento en los niveles de las marcas específicas de metilación en residuos de arginina en histona 4 (H4R3me1 y H4R3me2a) de esta metilasa, pero no así la marca H4R3me2s que es llevada a cabo por otros miembros de la familia PRMT (**Figura R17d**).

En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad BRD de BET está involucrada en la toma de decisiones necesarias para la adquisición del estado celular pluripotente a través de la modulación

directa e indirecta de varios mecanismos epigenéticos, entre los que se encuentran los relacionados con el metabolismo de la arginina, que participan en la organización de la estructura de la cromatina.

5.3.6 La inhibición de la actividad BRD de BET aumenta la compactación de la cromatina

Estudios recientes en otros contextos celulares han mostrado que el tratamiento con JQ1 afecta a la arquitectura y compactación de la cromatina [429,432,436]. Tomando esto en consideración junto con nuestros resultados anteriores y el papel activo reportado de histonas citrulinadas por PADI4 en la apertura de cromatina en células pluripotentes [430], nos llevó a hipotetizar que la inhibición de la actividad BRD de BET podría causar un aumento de compactación de la cromatina en las células pre-iPSC. En primer lugar, para explorar esta hipótesis, procedimos a analizar el grado de condensación de la cromatina mediante el análisis del tamaño nuclear mediante tinción con DAPI de pre-iPSCs tratadas con JQ1 o con DMSO como vehículo control. Los resultados mostraron que el diámetro nuclear de las células tratadas con JQ1 era significativamente menor que las tratadas con vehículo (**Figura R18a**). De manera consistente, análisis mediante digestión con nucleasa micrococal mostraron que en las pre-iPSCs tratadas con JQ1 disminuía la accesibilidad nucleosómica (**Figura R18b**).

Finalmente, se procedió a analizar los niveles de la marca de heterocromatina H3K9me3 ya que su presencia correlaciona con mayor compactación nuclear que conlleva un aumento en la represión transcripcional [440] y se sabe que actúa como una barrera durante la reprogramación [441]. El análisis mediante inmunofluorescencia de célula sencilla con marcaje contra H3K9me3 mostró que la inhibición de la actividad BRD de BET promovía un aumento significativo de la presencia de heterocromatina (**Figura R18c**).

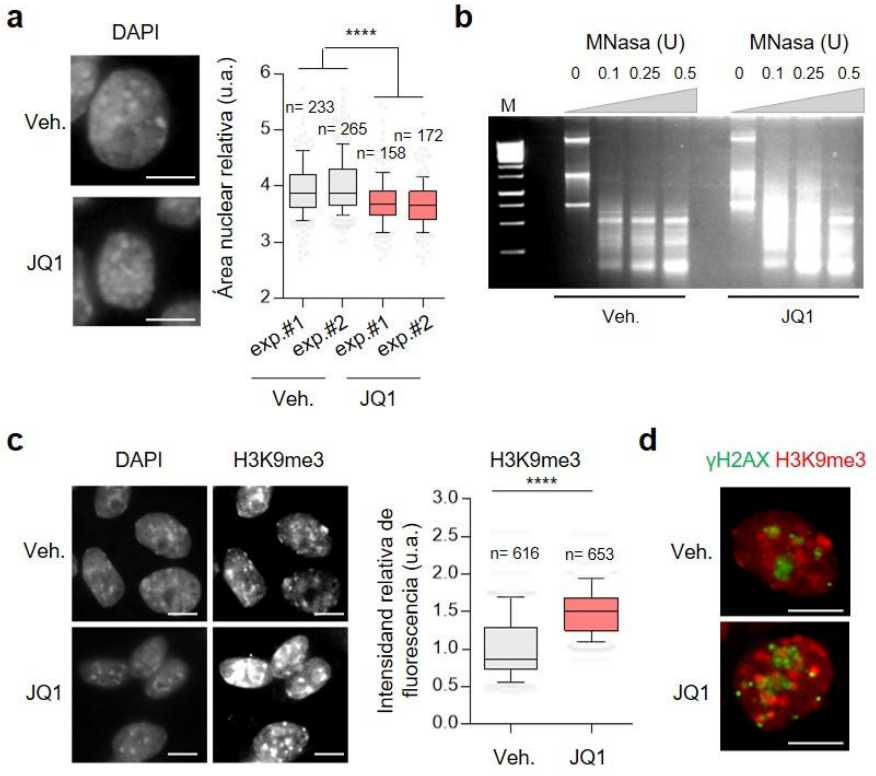


Figura R18. JQ1 incrementa la condensación nuclear afectando a la accesibilidad en la cromatina. **a**, Imágenes representativas en escala de grises del marcaje nuclear con DAPI obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (izquierda) y cuantificación del área nuclear (derecha) de pre-iPSCs tratadas con vehículo o JQ1. **b**, Ensayo de accesibilidad en la cromatina de pre-iPSCs tratadas como se indica mediante digestión con la encima nucleasa micrococal (MNasa). Se muestran los patrones de fragmentos generados y las unidades utilizadas de MNasa. **c**, A la izquierda se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia contra la marca de heterocromatina H3K9me3 y contra el contenido nuclear mediante DAPI. A la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de H3K9me3 relativa a la de DAPI por célula individual. **d**, Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra H3K9me3 y γ-H2AX. Los bigotes de los diagramas de cajas en **a** y **c** ocupan el rango de percentil 10th-90th y los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba ANOVA unidireccional con comparación múltiple de Tukey. ****p<0.0001. n representa el número de células. La barra de escala en **a**, **c** y **d** representa 5μm. Las pre-iPSCs analizadas en los paneles **a**, **b**, **c** y **d** fueron tratadas

en las mismas condiciones durante 24h en SL en presencia de JQ1 (0,5μM) o DMSO como vehículo control.

De manera interesante, también se ha documentado que la presencia de heterocromatina transitoria mediada por la deposición de H3K9me3 se ve favorecida por la existencia de daño en el ADN y se localiza en torno a la lesión [442]. En línea con esto y con nuestros datos anteriores mostrando que la inhibición de la actividad BRD de BET provoca un aumento significativo en los niveles de daño en ADN (**Figura R16c-d**), el análisis mediante inmunofluorescencia también reveló la existencia y proximidad de focos para las marcas H3K9me3 de heterocromatina y γ-H2AX de daño en el ADN en pre-iPSCs que se ven aumentados en presencia de JQ1 (**Figura R18d**).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la ausencia de actividad BRD de BET en pre-iPSCs conlleva un aumento de la compactación de la cromatina, lo que podría dificultar la actividad de factores de transcripción y la de mediadores epigenéticos que resulta necesaria para el control de la expresión génica que gobierna la toma de decisiones celulares conducentes a la transición hacia iPSCs.

5.3.7 La inhibición de la actividad BRD de BET altera el paisaje transcripcional de pre-iPSCs

El papel de la familia BET, que incluye a BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT, en el control de la regulación transcripcional ha sido examinado en diversos contextos celulares, condiciones fisiológicas y fisiopatológicas [143,150,443,444].

Teniendo en cuenta nuestros datos anteriores indicando que la actividad BRD de BET resulta importante para la composición y organización de la cromatina de las pre-iPSCs (rOKMN), decidimos investigar el efecto específico que el tratamiento con JQ1 está teniendo en el transcriptoma de estos intermediarios avanzados de reprogramación. Para este fin, se procedió a analizar mediante secuenciación profunda de ARN (RNA-seq) los cambios transcriptómicos globales que acontecen en las pre-iPSCs tratadas en

presencia o ausencia de JQ1 durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo SL (**Figura R19a**).

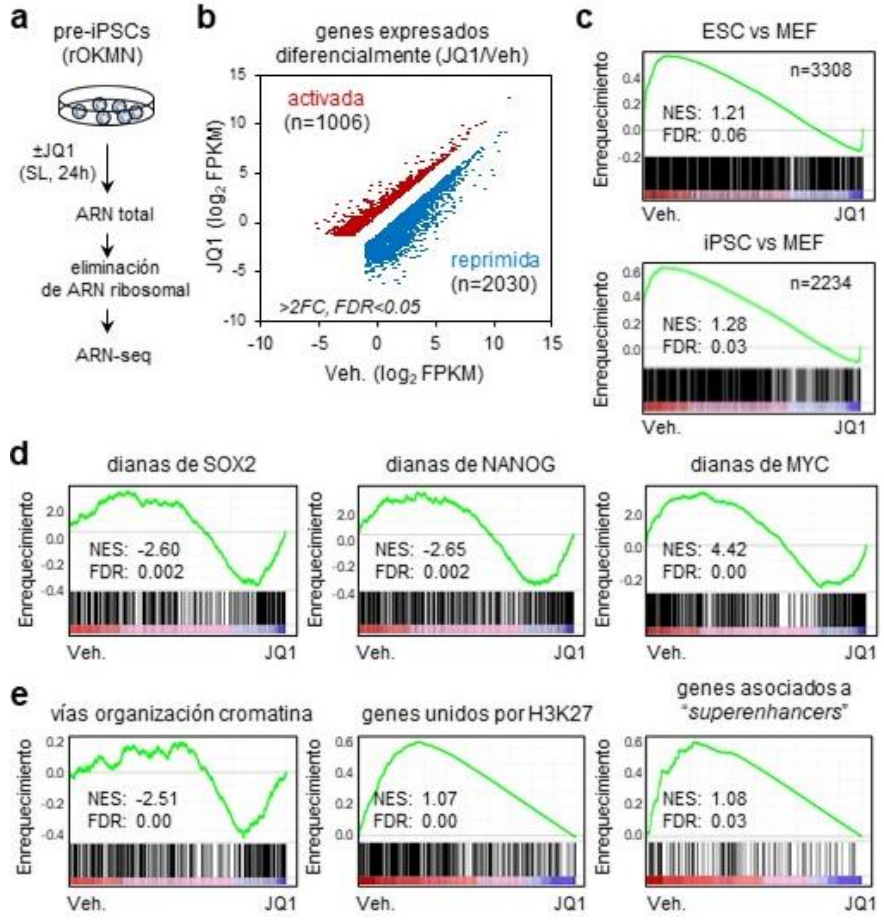


Figura R19. La presencia de JQ1 conlleva cambios transcripcionales relacionados con la red de pluripotencia. a, Representación esquemática de la estrategia mediante RNA-seq para la identificación de cambios transcripcionales globales producidos por la inhibición de la actividad BRD de BET en pre-iPSCs tratadas con JQ1(0,5μM) o DMSO durante 24h en condiciones de cultivo estándar SL (suero y LIF). **b**, Diagrama de dispersión mostrando los cambios en la expresión génica en pre-iPSCs tratadas con vehículo DMSO (abscisas) y con JQ1 (ordenadas). Los valores son expresados como Log2 de fragmentos por millón de kilobases (FPKM, por sus siglas en inglés). Se indica el número de genes (n) regulados al alza (rojo) y el número de genes reprimidos (azul) que se encuentran diferencialmente expresados de manera

significativa (FDR<0.05) y con diferencias superiores a dos veces en la abundancia (>2FC) en pre-iPSC tratadas con JQ1 con respecto a las tratadas con vehículo. En los paneles **c**, **d** y **e** se representan los análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) de los genes diferencialmente expresados identificados por RNA-seq de pre-iPSCs tratadas con DMSO (Veh.) y JQ1 para cada conjunto de genes indicado. NES indica el valor de enriquecimiento normalizado. FDR indica el valor estadístico de tasa de falso hallazgo.

Nuestros resultados mostraron que la inhibición aguda de la actividad BRD de BET impacta de manera global en el paisaje transcripcional de las pre-iPSCs afectando de manera significativa y con diferencias superiores a dos veces en la abundancia sobre los niveles de expresión de 3036 genes (**Figura R19b**). Aunque detectamos que aproximadamente el 67% de los genes alterados en presencia de JQ1 se encontraban reprimidos (n=2030), lo que está en línea con el papel descrito de esta familia de coactivadores transcripcionales en otros contextos celulares [143,150], también se pudo apreciar que un número considerable de 1036 genes (33%) mostraban una activación significativa de más del doble en sus niveles de expresión en células tratadas con el inhibidor BRD de BET (**Figura R19b**).

Para avanzar en la disección de los programas moleculares en los que intervienes los 3036 genes desregulados en presencia de JQ1 se realizaron análisis *in silico* mediante enriquecimiento en conjuntos de genes (GSEA, por sus siglas en inglés). En primer lugar, se establecieron dos firmas de expresión génica correspondientes a 3308 genes en ESCs y 2234 genes en iPSCs con expresión diferencial significativa y superior a dos veces en abundancia al ser comparadas a fibroblastos embrionarios murinos (MEFs). Los análisis mediante GSEA revelaron que ambas firmas génicas de pluripotencia se ven significativamente comprometidas en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (**Figura R19c**). Además, el análisis de genes unidos por los reguladores maestros de pluripotencia NANOG y SOX2, así como el factor de reprogramación cMYC, corroboró la influencia de la actividad BRD de BET sobre la red de pluripotencia que es necesaria que se active de manera estable en la transición pre-iPSC a iPSC (**Figura R19d**). Luego,

para examinar posibles vías funcionales asociadas con la desregulación transcripcional global analizada en pre-iPSCs tratadas con JQ1, realizamos un análisis GSEA contra todos los 14765 conjuntos de genes de ontología génica (GO) disponibles en la base de datos de firmas moleculares (MSigDB, https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp) combinado con 32 conjuntos de genes adicionales relacionados con control de pluripotencia. Este análisis identificó 179 conjuntos de genes significativamente enriquecidos (valor p<1%) al alza en pre-iPSC tratadas con DMSO y 23 conjuntos de genes significativamente enriquecidos (valor p<1%) al alza en pre-iPSC tratadas con JQ1. Entre los más significativos se encontraron los relacionados con "vías de organización de la cromatina", "genes unidos por la marca H3K27me3" del complejo epigenético PRC2 y "genes asociados a *superenhancers*" (**Figura R19e**).

Por último, se realizaron análisis *in sillico* mediante la herramienta funcional DAVID para identificar la posible existencia de procesos biológicos de ontología génica (GO) de genes que codifican proteínas diferencialmente afectados entre los 1006 genes regulados al alza y los 2030 genes reprimidos como consecuencia de la inhibición de la actividad BRD de BET en pre-iPSCs (**Figura R20a-c**). El análisis GO de los 850 genes que codifican proteínas que se encuentran activados en presencia de JQ1 (ej. *Trdmt1*, *Rbm45*, *Wnt9a*, *Ddit3*, *Wdr47*, *Rybp*, *Sox11*, *Bmp2* y *Hexim1*) (**Figura R20a y R20e**) reveló la existencia de procesos biológicos significativamente enriquecidos relacionados con la organización de la cromatina y el control epigenético mediante metilación de histonas o ADN de la transcripción (**Figura R20b**). Por otro lado, el análisis GO de los 1820 genes que codifican proteínas reprimidos en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (ej. *Zic3*, *Esrrb*, *Hexim2*, *Sox2*, *Sall4*, *Smarca2*, *Tet1*, *Hirip3*, *Uhrf1* y *Socs2*) (**Figura R20a y d**) mostró el enriquecimiento significativo principalmente en procesos biológicos relacionados con el desarrollo (**Figura R20c**).

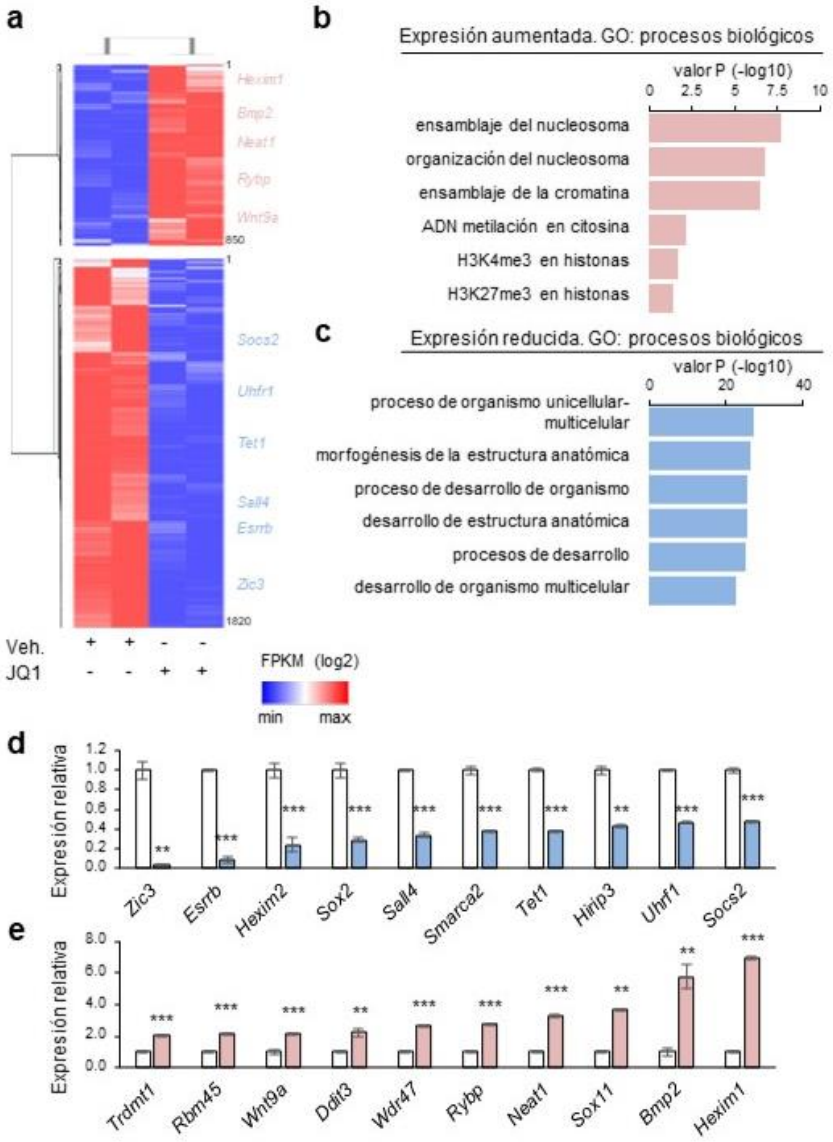


Figura R20. La actividad BRD de BET participa en la activación y represión de genes asociados con categorías específicas de procesos biológicos. **a**, Mapa de calor en base a los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas. Se indican genes representativos de cada una de las dos categorías. La escala representa los valores de expresión como Log2 de fragmentos por millón de kilobases (FPKM). **b-c**, Análisis mediante ontología génica (GO) de los principales procesos biológicos

en los que intervienen los genes cuya expresión se encuentra regulada al alza (**b**) o reprimida (**c**) en presencia de JQ1. El eje de abscisas se corresponde al valor negativo del valor estadístico *P* en escala Log_{10}. **d-e**, Análisis mediante RT-qPCR de la expresión relativa de genes representativos activados (**d**) y genes representativos reprimidos (**e**) en pre-iPSCs tratadas con JQ1 (0,5μM) o DMSO (Veh.) durante 24h en condiciones estándar de cultivo SL. En **d** y en **e** los datos son mostrados como media ± s.e.m. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de Student de dos colas. **p<0.01; ***p<0.001.

En su conjunto, estos resultados muestran que la regulación transcripcional mediada por la actividad BRD de BET tiene un papel importante en el control de la expresión de genes y rutas de regulación clave en el control de la identidad celular pluripotente.

5.3.8 La actividad BRD de BET coopera con NANOG para promover pluripotencia

Aunque NANOG ha sido mostrado de ser dispensable para la generación de iPSCs [445,446], este factor de transcripción orquestra un control transcripcional que resulta clave para una reprogramación eficiente facilitando la transición de pre-iPSCs a iPSCs [408]. A este respecto, nuestros resultados mostraron que la reprogramación de pre-iPSCs se ve comprometida en pre-IPSC tratadas con JQ1 incluso bajo la expresión forzada de *Nanog* (rOKMN) (**Figura R10d-e**). Además, la presencia de JQ1 afecta de manera significativa a genes de la red de pluripotencia en ESCs que son dianas de NANOG (**Figura R19d**). Tomando esto en consideración, quisimos profundizar en el mecanismo molecular del impacto de la actividad BRD de BET sobre el control transcripcional que ejerce NANOG para facilitar la adquisición del estado celular pluripotente.

En primer lugar, a partir de estudios previos, en los que se disponía de análisis transcriptómicos de pre-iPSCs generadas a partir de MEFs o células neuronales progenitoras (NSO4G) y sus respectivas iPSCs [447,448], identificamos dos firmas de expresión génica de 1734 y 785 genes de manera respectiva que se correspondían con genes cuya activación resulta necesaria para alcanzar la pluripotencia (**Figura R21a**). Tal como esperábamos, los resultados obtenidos mediante

GSEA mostraron que el tratamiento con JQ1 comprometía de manera significativa la activación de estas dos firmas génicas que se activan en la fase de adquisición de pluripotencia (**Figura R21a**).

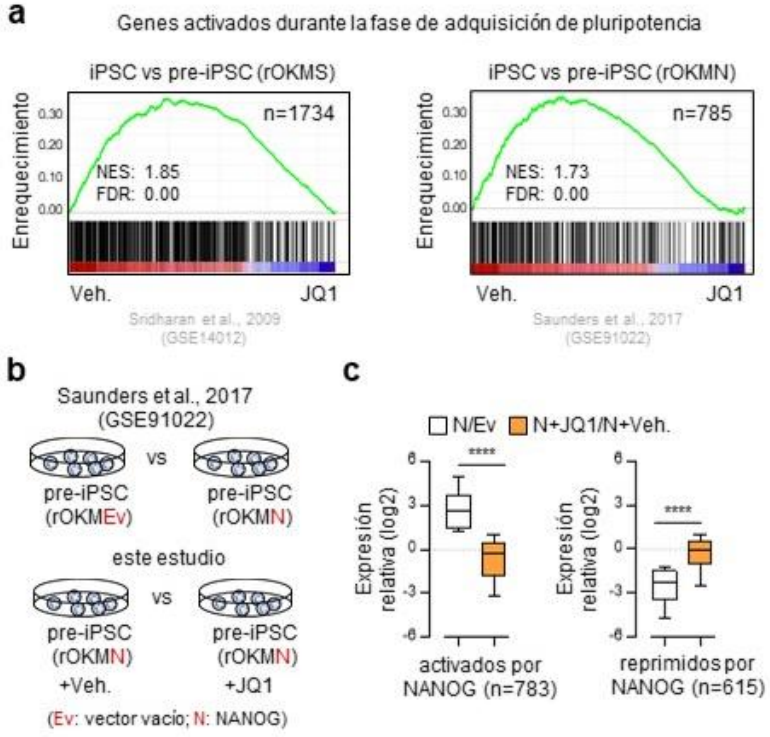


Figura R21. JQ1 compromete la regulación transcripcional ejercida por NANOG necesaria para facilitar la adquisición de pluripotencia. a, Análisis GSEA de los genes diferencialmente expresados identificados por RNA-seq de pre-iPSCs tratadas con DMSO (Veh.) y JQ1 para cada firma de expresión génica identificada a parir datos depositados en NCBI GEO (GSE14012 y GSE91022). **b.** Estrategia seguida para identificar los genes activados y reprimidos por NANOG en pre-iPSCs a partir del estudio de Saunders y colaboradores (GSE91022) y que se encuentran afectados en pre-iPSCs tratadas con JQ1 a partir de este estudio. Las pre-iPSCs fueron generadas a partir de la línea progenitora neural NSO4G mediante la expresión forzada de *Oct4*, *Klf4* y *cMyc* (rOKM) y posteriormente transfectadas de manera estable con *Nanog* (N) o vector vacío (Ev) como control siguiendo la misma estrategia indicada en **R10c**. NES indica el valor de enriquecimiento normalizado. FDR indica el valor estadístico de tasa de falso hallazgo. **c**, Análisis comparativo de la expresión de los genes activados y reprimidos por NANOG (N/Ev) con relación a los mismos genes cuya expresión en presencia de NANOG se ve afectada por el tratamiento con JQ1

(N+JQ1/N+Veh.). Los bigotes de los diagramas de cajas ocupan el rango de percentil 10th-90th y los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov de dos colas. ****p<0.0001. n representa el número de genes en cada categoría indicada.

Luego, para valorar el impacto de JQ1 sobre el efecto transcripcional de NANOG que facilita la adquisición de pluripotencia de los intermediarios avanzados de reprogramación, identificamos los genes que se activaban y reprimían como consecuencia de la expresión forzada de NANOG (rOKMN) comparado con su control de vector vacío (rOKMEv) a partir del estudio de Saunders y colaboradores [448] en el que se usaba el mismo sistema de reprogramación de pre-iPSCs que utilizamos para determinar los cambios transcripcionales promovidos por la inhibición de la actividad BRD de BET (rOKMN+JQ1 vs rOKMN+Veh.) (**Figura R21b**). Nuestros resultados indicaron que la actividad de BRD de BET no sólo resulta necesaria para que NANOG pueda activar de manera eficiente 783 genes que median la adquisición de pluripotencia, sino que esta actividad también resulta necesaria para que NANOG pueda reprimir de manera significativa 615 genes cuya expresión debe de ser silenciada para facilitar la transición de pre-iPSC a iPSCs (**Figura R21c**).

5.4 IDENTIFICACIÓN DEL PAPEL INDIVIDUAL DE CADA MIEMBRO DE LA FAMILIA BET EN LA ADQUISICIÓN DE PLURIPOTENCIA

5.4.1 La pérdida de función de BRD3 y BRD4 recapitula el impacto transcripcional mediado por JQ1

Tras haber demostrado el requerimiento de la actividad BRD de BET para la adquisición del estado celular pluripotente durante reprogramación, decidimos investigar qué miembro o miembros de esta familia BRD de coactivadores transcripcionales podría estar mediando este efecto. Tal como se indicó anteriormente (**sección 2.5.3.5**). La familia BET está consta de cuatro miembros (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) caracterizados por dos dominios BRD (BD1 y BD2) dispuestos en tándem, con afinidades de reconocimiento específicas para residuos

de lisina acetilados (Kac), y un dominio extra terminal (ET) que media interacciones con otras proteínas [143] (**Figura R22a**). En primer lugar, para proceder con la disección del papel que desempeñan los miembros que componen esta familia BET en la adquisición de pluripotencia se analizaron los niveles de expresión de cada uno de los genes que codifican estas proteínas en pre-iPSCs (**Figura R22b**). Para este fin se analizó la abundancia del mARN de *Brd2*, *Brd3*, *Brd4* y *Brdt* a partir de los datos obtenidos mediante RNA-seq en pre-iPSCs cultivadas en medio estándar SL (**Figura R19a**). Los resultados mostraron que en pre-iPSCs no se expresaba *Brdt*, mientras que *Brd2* mostraba los niveles más abundantes en estos intermediarios avanzados de reprogramación seguido por los niveles de *Brd4* y *Brd3* (**Figura R22b**). Tomando esto en consideración, se procedió a analizar las posibles funciones específicas o redundantes de los tres miembros BET presentes en pre-iPSCs. Para este fin se procedió a realizar una aproximación por pérdida de función mediante ARN de interferencia. Para evitar posibles efectos inespecíficos de esta aproximación se diseñaron 2 ARN horquillados (shRNA, por sus siglas en inglés) independientes específicos contra *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* y se utilizó un shRNA contra el gen *Luciferasa* (shLuci) como control. Las partículas lentivirales conteniendo estos shRNAs fueron transducidas en pre-iPSCs para su posterior análisis (**Figura R22c**). Mediante análisis por RT-qPCR se verificó la reducción significativa de los niveles de expresión de *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* en relación con el shLuci (**Figura R22d**). Finalmente, para valorar cuál de estos genes podría tener un efecto a nivel transcripcional similar al ejercido por el tratamiento con JQ1 en pre-iPSCs, se comparó la expresión de varios genes que se encontraban diferencialmente expresados en ausencia de la actividad BRD de BET con la expresión de los mismos genes en pre-iPSCs transducidas y seleccionadas de manera estable con los distintos shRNAs (**Figura R22c**). El análisis de esta aproximación mostró que la pérdida de función de los genes *Brd3* y *Brd4* conllevaba un efecto transcripcional en pre-iPSCs muy similar a las mismas células tratadas con JQ1 (**Figura R22e**). Sorprendentemente, las pre-iPSCs transducidas con los shRNAs contra

Brd3 se agrupan con las células no tratadas y transducidas con los shRNAs control (shEV y shLuci), siendo su impacto a nivel transcripcional sobre los genes analizados opuesto al observado en las células con pérdida de función de los otros dos miembros de esta familia y a las tratadas con JQ1 (**Figura R22e**). Además, se observó que las pre-iPSCs transducidas con los dos shRNAs independientes contra *Brd2* mostraban un mayor aumento en los niveles de expresión de genes relacionados con pluripotencia y una disminución en los genes que se encuentran regulados al alza en presencia de JQ1, entre los que se incluye *Brd2*, al ser comparadas con las células no tratadas y transducidas con los shRNAs control (**Figura R22e**)

En su conjunto, estos datos muestran que la pérdida de función de BRD3 y BRD4 produce un efecto a nivel transcripcional similar en pre-iPSCs al que sucede en las mismas células tratadas con JQ1, mientras que BRD2 actúa de manera opuesta. Así, nuestros resultados muestran la existencia de funciones redundantes a nivel transcripcional entre BRD3 y BRD4, y sugieren la posible existencia de funciones opuestas entre BRD2 y los otros dos miembros de la familia BET para la adquisición del estado celular pluripotente durante reprogramación.

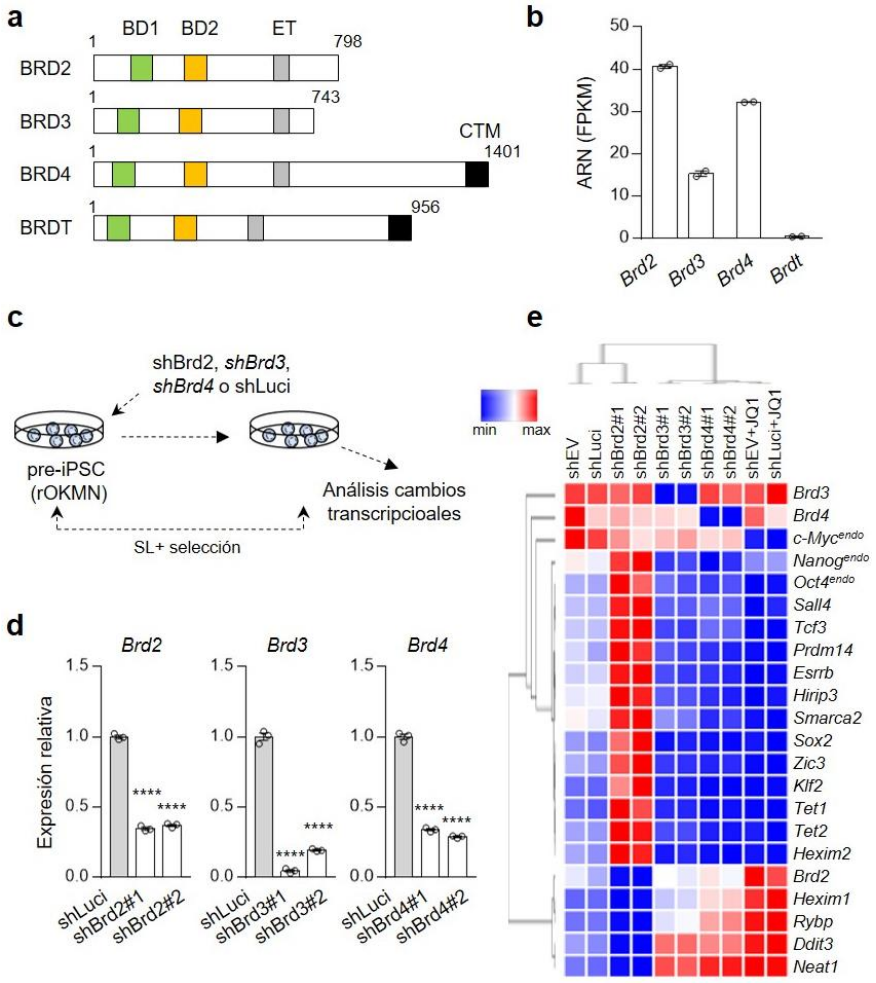


Figura R22. Existencia de funciones redundantes entre BRD3 y BRD4 opuestas a BRD2 a nivel transcripcional en pre-iPSCs. a, Representación esquemática de la estructura de los miembros de la familia BET. Se indican los dos bromodominios (BRD1 y BRD2), el dominio extra-terminal (ET), el motivo carboxi-terminal (CTM) y las posiciones de los aminoácidos iniciales y finales de cada proteína. **b**, Análisis mediante RNA-seq de la abundancia de los transcriptos de cada miembro BET en pre-iPSCs. Los datos son mostrados como media ± s.e.m. (n=2 muestras biológicas independientes). Los valores son expresados como Log2 de fragmentos por millón de kilobases (FPKM). **c**, Estrategia utilizada para análisis transcripcionales en pre-iPSCs transducidas de manera estable mediante selección con el antibiótico puromicina con los shRNAs indicados. **d.** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión

relativos de los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* en pre-iPSCs transducidas con los shRNA indicados. Los datos son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ****p<0.0001. **e**, Mapa de calor en base a la agrupación jerárquica de los niveles de expresión de los genes y condiciones indicadas. El código de color refleja la expresión (en Log2 de FPKM) relativo en la fila. Las líneas muestran la agrupación en base a la expresión génica. La escala representa los valores de expresión entre el rango mínimo y máximo. La expresión de los niveles endógenos (endo) de los genes *Oct4*, *cMyc* y *Nanog* fue determinada mediante el uso de oligonucleótidos que no reconocen las formas recombinantes correspondiente en las pre-iPSCs (rOKMN).

5.4.2 Funciones no redundantes de BRD3 y BRD4 necesarias para la transición pre-iPSC a iPSC

Tomando en consideración nuestros resultados anteriores sugiriendo la posibilidad de funciones redundantes y opuestas en reprogramación de los tres miembros de la familia BET que se encuentran en pre-iPSCs, decidimos analizar el impacto de la pérdida de función de BRD2, BRD3 y BRD4 en la transición pre-iPSC a iPSCs. Para este fin, se utilizaron las pre-iPSCs derivadas de la línea progenitora neural NSO4G, que contiene un reportero GFP bajo el control de *Oct4*, transducidas con NANOG (rOKMN) y con shRNAs contra los genes *Brd* y *Luciferase* como control (**Figura R23a**). El cambio de medio estándar SL a medio de reprogramación 2iL mostró que la ausencia de BRD3 y BRD4 comprometía la generación de colonias positivas para el marcador fosfatasa alcalina (AP) (**Figura R23b-c**). Sin embargo, de manera sorprendente, la ausencia de BRD3 promovía un aumento significativo en el número de colonias positivas para AP comparado con el número de colonias obtenidas con el control shLuci (**Figura R23b-c**). Por otro lado, el análisis mediante microscopía de fluorescencia del número de colonias pluripotentes positivas para GFP (*Oct4*-GFP+), mostró resultados similares a los obtenidos con la estimación a partir del marcaje con AP, confirmando que la pérdida de función de BRD2 favorece la generación de iPSCs mientras que la presencia de BRD3 y BRD4 resulta necesaria para alcanzar el estado celular pluripotente (**Figura R23d-e**).

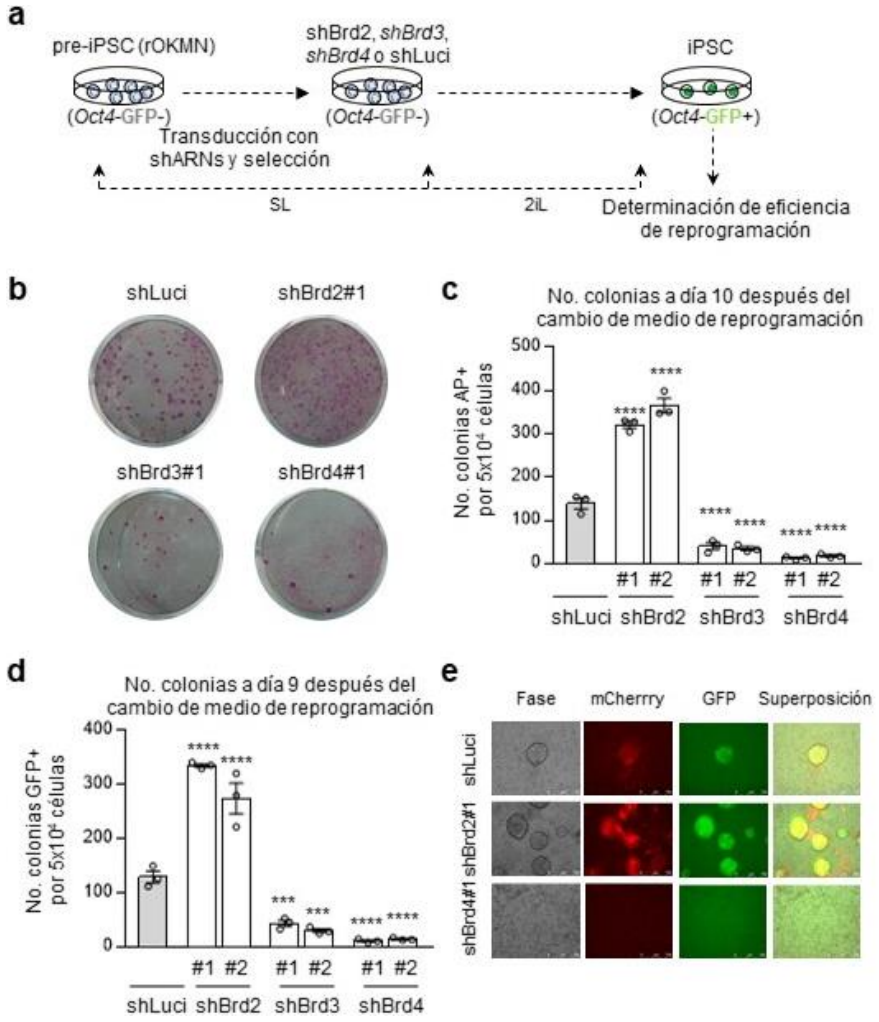


Figura R23. La pérdida de función de BRD3 y BRD4 compromete la generación de iPSCs. a. Representación esquemática de la estrategia utilizada para evaluar el impacto de la pérdida de función de BRD2, BRD3 y BRD4 en la transición pre-iPSC a iPSC. Antes de iniciar la reprogramación en medio 2iL (inhibición de las quinasas MEK [PD0325901, 1 μM] y GSK3β [CHIR99021, 3 μM] en presencia de la citoquina LIF y ausencia de suero) las pre-iPSCs (rOKMN), obtenidas a partir de la línea progenitora neural NSO4G que contiene un reportero GFP bajo el control del promotor de *Oct4*, fueron transducidas con los shRNAs indicados y seleccionadas en cultivo de manera estable en presencia de suero y LIF (medio SL). **b**, Imágenes representativas de pocillos de placa de cultivo teñidos con la fosfatasa (AP) alcalina en las condiciones

indicadas tras 10 días en cultivo en medio de reprogramación 2iL **c**, Cuantificación del número de colonias positivas para AP tras 10 días de ensayo de reprogramación en medio 2iL con los shRNAs indicados. **d,** Cuantificación de colonias positivas para GFP (*Oct4*-GFP+) tras 9 días de ensayo de reprogramación en medio 2iL con los shRNAs indicados. **e**, Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía visible y fluorescencia del ensayo de reprogramación en **d** para las células transducidas con los shRNAs indicados. Nota: mCherry denota la presencia del shRNA (*pLKO_puromycin_IRES_mCherry-shRNA*) que sólo se resulta evidente en microscopía cuando se forman colonias. Los datos en **c** y **d** son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos en **c** y **d** fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ***p<0.001; ****p<0.0001.

Para corroborar los datos obtenidos mediante ARN de interferencia, se decidió emplear una estrategia alternativa de pérdida de función mediante el uso de la tecnología CRISPR-Cas9. A partir de esta tecnología de edición genómica se generaron líneas pre-iPSC (rOKMN) *knock-out* (KO, por sus siglas en inglés) con ausencia de función completa para BRD2, BRD3 y BRD4 con el fin de confirmar de un modo independiente sus funciones en la transición pre-iPSC a iPSC (**Figura R24a**). En primer lugar, mediante ensayos de *western blot* se confirmó la ausencia de BRD2, BRD3 y BRD4 en cada línea KO de pre-iPSCs generada (**Figura R24b**). De manera consistente con los ensayos previos de reprogramación mediante el uso de ARN interferente, los resultados mostraron que las líneas *Brd3*KO y *Brd4*KO veían comprometido su potencial para generar iPSCs (**Figura R24c**). Así mismo, la eficiencia en la generación de iPSCs a partir de la línea *Brd2*KO era significativamente mayor que la línea con fenotipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés) (**Figura R24c**).

En conjunto, los resultados obtenidos (**Figuras R22, R23 y R24**), muestran que la presencia de BRD3 y BRD4 resulta necesaria y no redundante para la transición pre-iPSC a iPSC. Por otro lado, la ausencia de BRD2 conlleva un aumento en la eficiencia de reprogramación, lo que sugiere que este miembro de la familia BET está actuando como posible barrera de reprogramación que dificulta la adquisición del estado celular pluripotente.

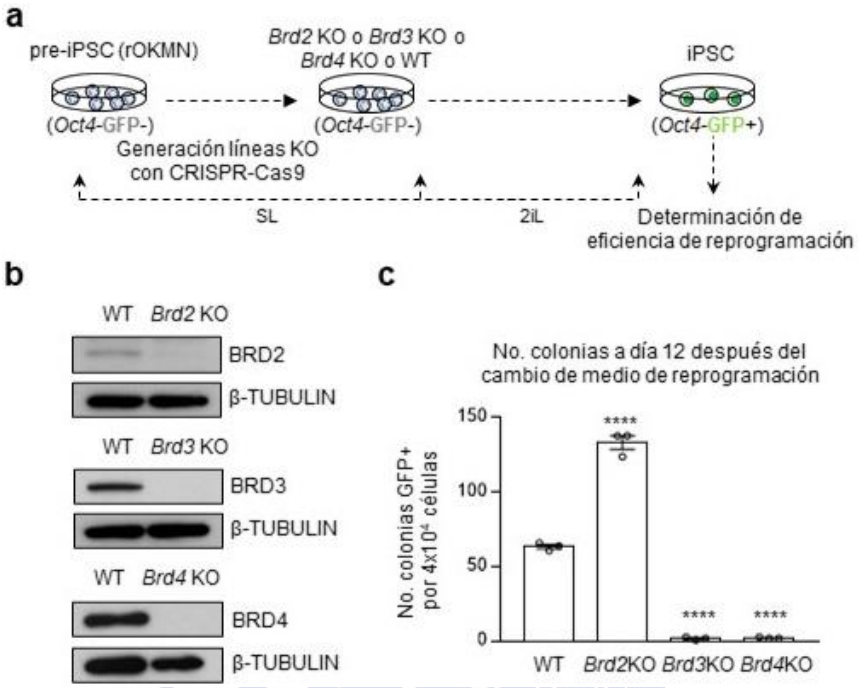


Figura R24. La ausencia de BRD2 facilita la transición pre-iPSC a iPSC. a, Representación esquemática de la estrategia seguida para generar líneas *knock-out* (KO) pre-iPSC (rOKMN) de *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* y comprobar su impacto en la formación de iPSCs. **b**, Análisis de los niveles de BRD2, BRD3 y BRD4 mediante *western blot* con anticuerpos específicos en las líneas de pre-iPSCs indicadas. **c**, Cuantificación del número de colonias positivas para GFP (*Oct4*-GFP+) tras 12 días de ensayo de reprogramación en medio 2iL a partir de las líneas de pre-iPSCs indicadas. Los datos en son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ****p<0.0001.

5.4.3 BRD2 inhibe la formación de iPSCs

Finalmente, nos preguntamos si la expresión forzada de BRD2, BRD3 y BRD4 podría afectar a la actividad de NANOG que facilita la reprogramación. Para este fin, las pre-iPSCs obtenidas a partir de la línea progenitora neural NSO4G (rOKMN) fueron transfectadas con vectores *PiggyBac* expresando *Brd2*, *Brd3* o *Brd4* con *tag* 3xFlag N-terminal (**Figura R25a**). La expresión forzada de ^{3xFL}*Brd2*, ^{3xFL}*Brd3* y ^{3xFL}*Brd4* en cada línea pre-iPSC establecida en condiciones de cultivo

estándar SL fue confirmada por RT-qPCR (**Figura R25b**). En primer lugar, nosotros observamos que la expresión forzada *^{3xFL}Brd3* o *^{3xFL}Brd4* promovía la reactivación de genes de pluripotencia (*Sox2*, *Esrrb*, *Sall4* y *Tet1*), los cuales habían sido previamente reportados de facilitar la transición pre-iPSC a iPSC, en comparación con el vector control (*^{3xFL}EV)* en pre-iPSCs en condiciones de SL (**Figura R25c**). Sin embargo, la expresión forzada de *^{3xFL}Brd2* reprimía la activación de estos mismos genes en las pre-iPSCs en presencia de NANOG (rOKMN) (**Figura R25c**). Estos resultados sugerían que tanto BRD3 como BRD4 podrían actuar de manera sinérgica con NANOG para favorecer la adquisición de pluripotencia, mientras que BRD2 podría actuar restringiendo la actividad de NANOG en estos intermediarios avanzados de reprogramación. De manera consistente con esta hipótesis, los ensayos de reprogramación mostraron que la expresión forzada de tanto BRD3 como BRD4 favorecía de manera significativa la formación de iPSCs en medio de reprogramación 2iL (**Figura R25d**). Sin embargo, el aumento en los niveles de BRD2 conllevó una reducción significativa del número de colonias positivas para Oct4-GFP generadas (**Figura R25d**).

Tomando en consideración estos datos obtenidos en reprogramación con ensayos de ganancia de función (**Figura R25**) y los anteriores ensayos de pérdida de función (**Figura R23 y Figura R24**) de los miembros de la familia BET, nuestros resultados desenmascaran funciones no redundantes entre BRD2 y BRD4 para la adquisición del estado celular pluripotente y actuando de manera sinérgica con NANOG para la formación de iPSCs. Al contrario, BRD2 se revela como una nueva barrera de reprogramación que limita la transición pre-iPSC a iPSC.

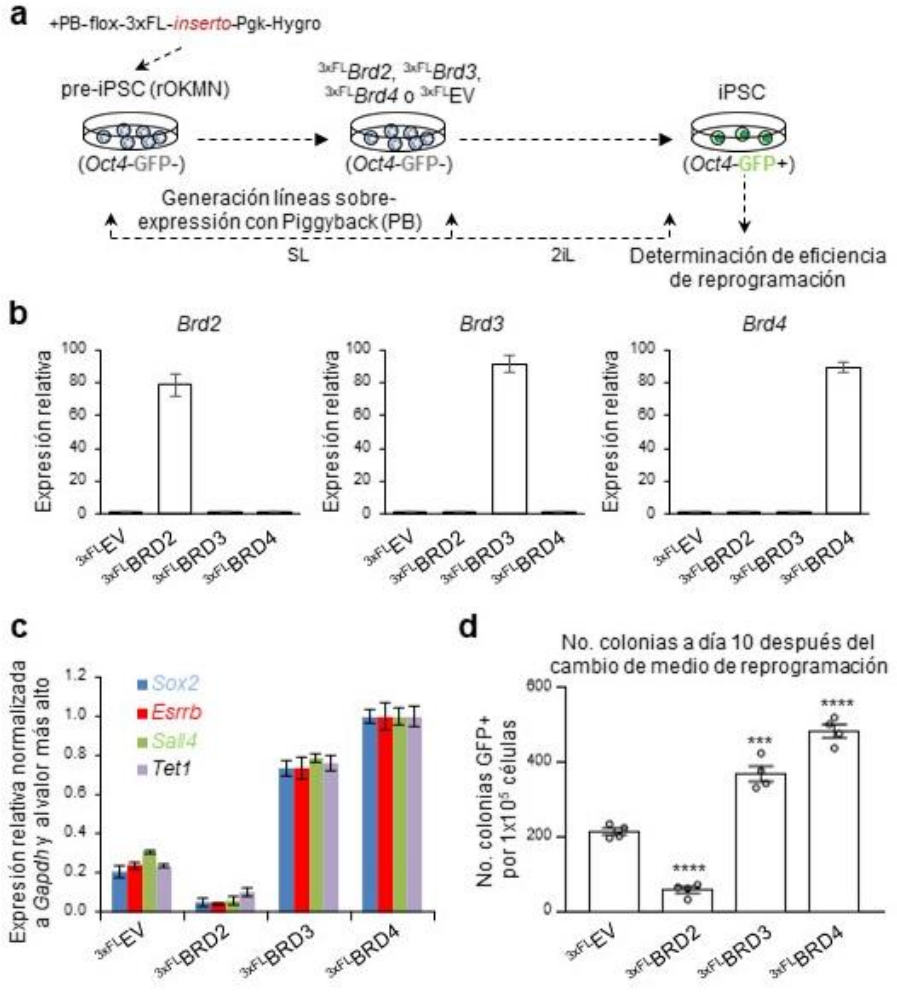


Figura R25. Funciones opuestas de BRD2 con respecto a BRD3 y BRD4 en la transición pre-iPSC a iPSC. a, Representación esquemática de la estrategia seguida para evaluar los efectos de ganancia de función de BRD2, BRD3 y BRD4 en la transición pre-iPSC a iPSC. La expresión forzada de cada gen *BRD* indicado se realizó en pre-iPSCs (rOKMN), procedentes de la línea progenitora neural NSO4G conteniendo un reportero GFP bajo el control del promotor del gen Oct4, en condiciones de cultivo SL mediante la transfección estable con el vector *PiggyBac_HygromycinB_3xFL* conteniendo cada uno de los genes *Brd*. **b**, Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de los genes y condiciones indicadas en medio SL. **c**, Análisis mediante RT-qPCR de los niveles relativos de expresión de los genes de pluripotencia *Sox2*, *Esrrb*, *Sall4* y *Tet1* en cada una de las líneas pre-

iPSC indicadas en condiciones de cultivo SL. **d**, Cuantificación del número de colonias positivas para GFP (*Oct4*-GFP+) tras 10 días de ensayo de reprogramación en medio 2iL a partir de las líneas de pre-iPSCs indicadas. Los datos en son mostrados como media ± s.e.m. (n=4 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ***p<0.001; ****p<0.0001.

5.4.4 Las funciones de BRD2, BRD3 y BRD4 en la formación de iPSCs se encuentran conservadas

Teniendo en cuenta nuestros resultados anteriores en medio de reprogramación 2iL utilizando células pre-iPSCs generadas a partir de una línea progenitora neural de origen epitelial mediante la combinación de reprogramación OCT4, KLF4, cMYC y NANOG (rOKMN), se procedió a examinar si las funciones específicas de BRD2, BRD3 y BRD4 en reprogramación se encontraban conservabas partiendo de diferentes contextos celulares somáticos y mediante el uso de diferentes aproximaciones de reprogramación. Para este fin, se evaluó el papel de BRD2, BRD3 y BRD4 mediante ensayos de pérdida de función mediante ARN de interferencia.

En primer lugar, se utilizó otro modelo de intermediarios avanzados de reprogramación generado a partir de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs, por sus siglas en inglés) de origen mesenquimal, conteniendo un reportero GFP bajo el control en este caso del promotor del gene *Nanog*, transducidos con *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, y *cMyc* y transfectados de manera estable con Nanog (rOSKMN) (**Figura R26a**). Luego, mediante transducción estable con shRNAs independientes contra *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* o shLuci como control se determinó el número de colonias positivas para *Nanog*-GFP generadas en medio de reprogramación 2iL (**Figura R26a**). De manera consistente a los resultados obtenidos en las pre-iPSCs (rOKMN) neurales de origen epitelial, la pérdida de función de BRD3 y BRD4 en pre-iPSCs (rOSKMN) fibroblásticas de origen mesenquimal comprometió de manera significativa la formación de colonias positivas para *Nanog*-GFP (**Figura R26b**). De manera también similar, la ausencia de BRD2 en las rOSKMN en medio de reprogramación 2iL

favoreció la generación de iPSCs positivas para *Nanog*-GFP (**Figura R26b**). Así, estos datos demuestran funciones conservadas de las funciones específicas de cada miembro BRD de BET en la transición pre-iPSC a iPSC independientemente del origen epitelial o mesenquimal de los intermediarios avanzados de reprogramación o del sistema de reprogramación utilizado (rOKMN vs rOSKMN).

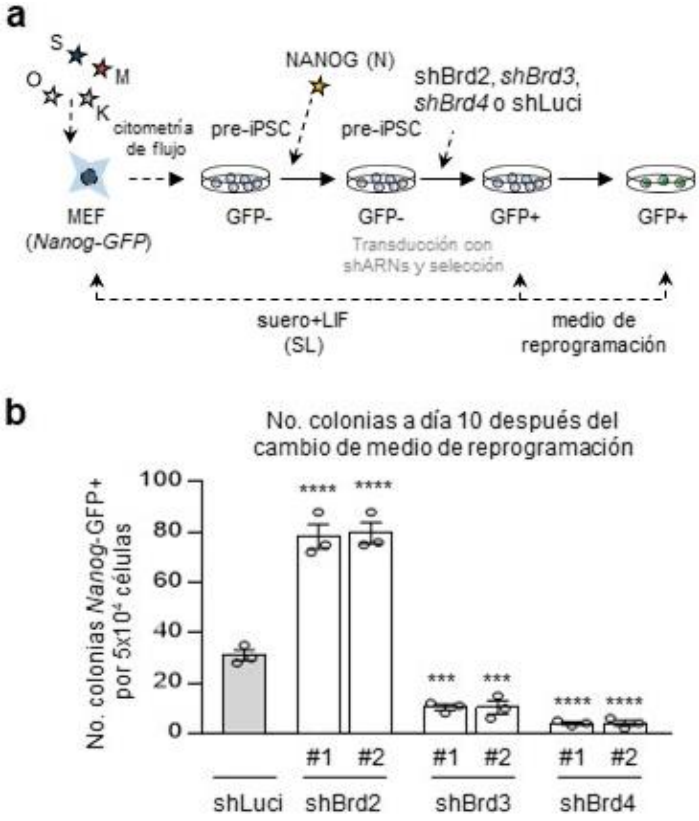


Figura R26. Funciones opuestas de BRD2 con respeto a BRD3 y BRD4 en la reprogramación de pre-iPSCs de origen mesenquimal. **a**, Representación esquemática de la estrategia utilizada para evaluar el impacto de la pérdida de función de BRD2, BRD3 y BRD4 en la reprogramación de pre-IPSCs de origen mesenquimal. Antes de iniciar la reprogramación en medio 2iL (inhibición de las quinasas MEK [PD0325901, 1 μM] y GSK3β [CHIR99021, 3 μM] en presencia de la citoquina LIF y ausencia de suero) las pre-iPSCs (rOSKMN), obtenidas a partir fibroblastos de origen mesenquimal MEFs que contiene un reportero GFP bajo el

control del promotor de *Nanog*, fueron transducidas con los shRNAs indicados y seleccionadas en cultivo de manera estable en presencia de suero y LIF (medio SL). **b**, Cuantificación del número de colonias positivas para GFP (*Nanog*-GFP+) tras 10 días de ensayo de reprogramación en medio 2iL a partir de las líneas de pre-iPSCs indicadas. Los datos en son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ***$p<0.001$; ****$p<0.0001$.

Finalmente, se analizó el efecto de la pérdida de función de BRD2, BRD3 y BRD4 en el sistema de reprogramación clásico reportado en 2006 por el Dr. Takahashi y el Dr. Yamanaka en fibroblastos de origen mesenquimal mediante la combinación de OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC (rOSKM) y medio estándar de reprogramación SL [38]. En primer lugar, se establecieron cultivos primarios de MEFs, con reportero GFP bajo el control del promotor *Oct4*, transducidos de manera estable con shRNAs independientes contra los genes *Brd* o shLuci como control para su posterior infección con los cuatro "factores de reprogramación de Yamanaka" (OSKM) (**Figura R27a**). El recuento del número de colonias positivas para *Oct4*-GFP tras 21 días de ensayo en medio SL de reprogramación mostró: 1) la ausencia de BRD3 y BRD4 compromete la formación de iPSCs; y 2) la ausencia de BRD2 aumenta la eficiencia de la reprogramación (**Figura R27b**).

En conjunto, nuestros resultados en modelo murino, independientemente de la estrategia de reprogramación utilizada y del origen de las células a reprogramar, revelaron: 1) la existencia de funciones no redundantes conservadas de BRD3 y BRD4 necesarias para la formación de iPSCs; y 2) BRD2 representa una barrera en la reprogramación para la generación eficiente de iPSCs.

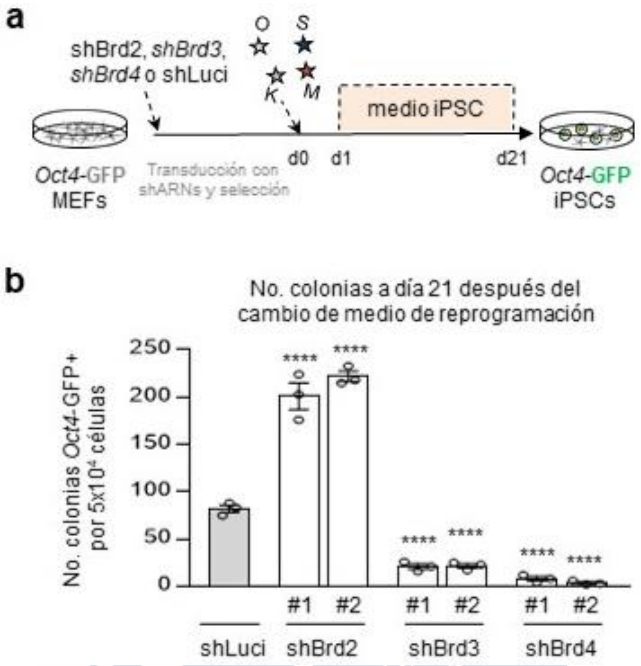


Figura R27. El efecto de BET en intermediarios de SCR es recapitulado en ensayos clásicos de SCR de MEF. a. Representación esquemática de la estrategia para evaluar el efecto de la pérdida de función de BRD2, BRD3 y BRD4 durante la reprogramación celular somática mediada por OSKM a partir de MEFs transgénicos conteniendo un reportero GFP bajo el control del promotor del gen *Oct4*. Los *Oct4*-GFP MEFs fueron transducidos con vectores de expresión *pLKO_pim* conteniendo los shRNAs indicados y seleccionados de manera estable con el antibiótico puromicina antes de iniciar el ensayo de reprogramación mediante OSKM durante 21 días en medio estándar iPSC con presencia de suero y LIF. **b**, Cuantificación del número de colonias positivas para GFP (*Oct4*-GFP+) tras 21 días de ensayo de reprogramación en medio iPSC a partir de las condiciones indicadas. Los datos en son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. ****p<0.0001.

5.5 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN BRD EN PLURIPOTENCIA

5.5.1 La inhibición de la actividad BRD compromete el mantenimiento del estado celular pluripotente

Teniendo en cuenta que las células pluripotentes murinas (ej. iPSCs y ESCs) muestran mayores niveles de acetilación que las no

pluripotentes (ej. MEFs y NSO4G) (**Figura R1**), decidimos investigar si el reconocimiento de los residuos de lisina acetilados (Kac) por las proteínas BRD podría afectar al mantenimiento del estado celular pluripotente. Con el fin de determinar el impacto de la inhibición del reconocimiento de residuos Kac por las proteínas BRD en la capacidad de autorrenovación de las células pluripotentes se utilizó nuevamente el inhibidor BRD de amplio espectro bromosporina (BSP) [317] (**Figura R28a**). Tras un periodo de 48 horas de cultivo en medio estándar SL en presencia de BSP se pudo apreciar que tanto las ESCs como iPSCs presentaban cambios evidentes en su típica morfología de colonia pluripotente y una reducción drástica en los niveles del marcador fosfatasa alcalina (AP) en comparación con las mismas células pluripotentes cultivadas en presencia del vehículo control DMSO (Veh.) (**Figura R28b**). Por otro lado, monitorizamos el efecto de la actividad BRD sobre el mantenimiento del estado de pluripotencia fundamental *naïve* mediante el uso de una línea ESC *knock-in* que contiene un reportero GFP bajo el control del potenciador distal de Oct4 (*Oct4*-ΔPE-GFP), que sólo se encuentra activo en células pluripotentes *naïve* mientras que se encuentra silenciado en las células pluripotentes *primed* [130]. Tras sólo 48 horas en presencia del inhibidor BSP se produjo una pérdida de la señal GFP en las ESCs *Oct4*-ΔPE-GFP (**Figura R28c**). Para confirmar que la actividad de reconocimiento de residuos Kac por parte de las proteínas BRD resulta imprescindible para el mantenimiento del estado fundamental de pluripotencia *naïve*, se realizó una aproximación independiente mediante citometría de flujo utilizando otra línea ESC *knock-in* independiente con un reportero GFP bajo el control del marcador de pluripotencia *naïve Nanog* (*Nanog*-GFP). En línea con los resultados anteriores, el tratamiento con BSP reduce drásticamente la señal de GFP en las ESCs *Nanog*-GFP al ser comparadas con células tratadas con el vehículo DMSO (Veh.) (**Figura R28d**).

En conjunto, nuestros resultados muestran que el reconocimiento de residuos Kac por las proteínas BRD resulta esencial para poder

preservar en condiciones de cultivo estándar SL las células pluripotentes.

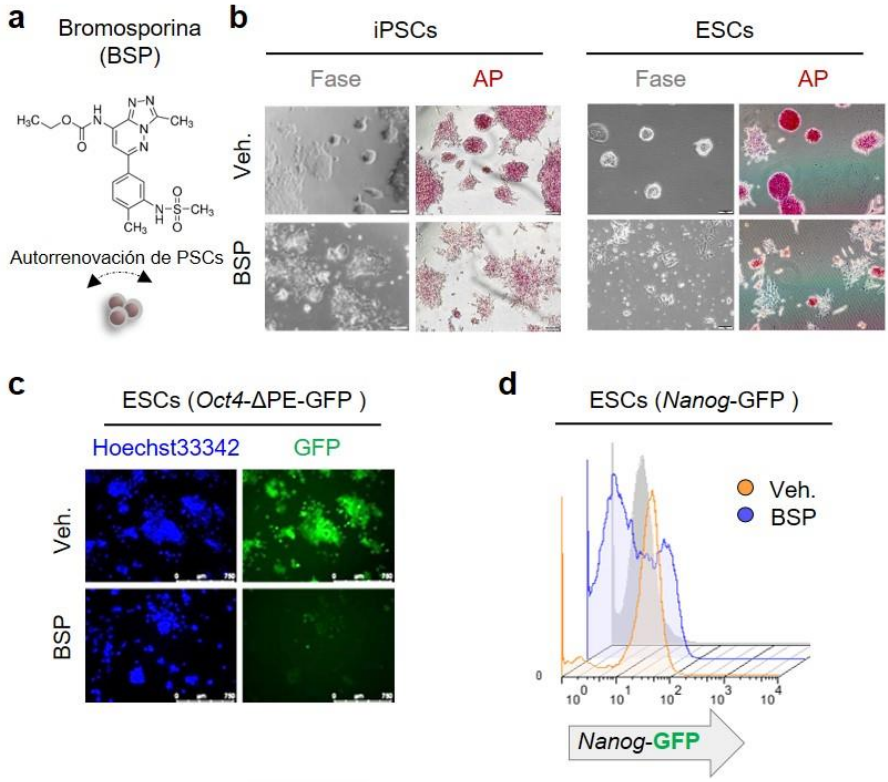


Figura R28. La actividad BRD es esencial para el mantenimiento del estado celular pluripotente. a, Representación de la molécula de bromosporina (BSP) utilizada para evaluar la actividad BRD de reconocimiento de residuos Kac sobre la capacidad de autorrenovación de células pluripotentes (PSCs, por sus siglas en inglés). **b**, Imágenes representativas de microscopía visible de contraste de fases de iPSCs (izquierda) y ESCs (derecha) cultivadas en condiciones estándar SL durante 48h en presencia de BSP (1μM) o DMSO (Veh.). Se muestran células sin teñir (Fase) y células teñidas contra fosfatasa alcalina (AP). **c**, Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de ESCs Oct4-ΔPE-GFP tratadas durante 48h en condiciones estándar SL en presencia o ausencia de BSP (1μM). Los núcleos fueron detectados mediante la tinción con Hoescht33342. La señal de GFP denota los niveles de *Oct4* endógenos activados mediante du potenciador distal *naïve*. **d.** Análisis mediante FACS de la distribución poblacional de los niveles de *Nanog*-GFP obtenidos en células tratadas con BSP (1μM) o DMSO (Veh.) durante 48h en condiciones SL. El histograma en gris

representa el control negativo obtenido mediante FACS de la línea ESC parental sin reportero GFP.

5.5.2 La actividad BRD de BET es necesaria para el mantenimiento de pluripotencia

Una vez establecido que el reconocimiento de residuos Kac por las proteínas BRD resulta esencial para el mantenimiento de pluripotencia (**Figura R28**), se decidió evaluar el papel de la actividad BRD de la familia BET en este mismo contexto. Para este fin, se trataron células pluripotentes establecidas mediante reprogramación con OSKM con molécula JQ1(**Figura R29a**). El análisis de iPSCs tratadas con JQ1 durante 48 horas reveló que tanto su morfología típica de colonias pluripotentes como la presencia de fosfatasa alcalina (AP) se veía afectada en comparación con las células tratadas con el vehículo control DMSO (**Figura R29b**). Así, la inhibición de la actividad BRD de BET comprometía la capacidad de autorrenovación de manera similar a la observada con la inhibición general de actividad BRD mediante tratamiento con BSP (**Figura R29b**). Luego, para confirmar el efecto de BSP y JQ1 sobre el mantenimiento de la pluripotencia, se analizó su efecto sobre la actividad transcripcional de una batería de genes que participan de manera decisiva en el control de la red de pluripotencia que gobierna el mantenimiento del estado celular pluripotente. El análisis comparativo mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *Esrrb*, *Sall4*, *Tcf3*, *Prdm14*, *Tet1* y *Tet2* mostró que tanto la presencia de BSP como JQ1, en condiciones estándar de cultivo SL durante 24 horas, conlleva una represión significativa de la activación de estos genes (**Figura R29c**).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la actividad BRD de la familia BET resulta necesaria en condiciones estándar de cultivo (presencia de suero y LIF) para el mantenimiento de pluripotencia. Además, nuestros resultados a partir de iPSCs de origen murino son consistentes con los de varios estudios recientes utilizando inhibidores de la actividad BRD de BET, mayoritariamente la molécula JQ1, tanto en ESCs de origen murino como humano [388,389,449-451]. Esto indica que

el requerimiento de la actividad BRD de BET para el mantenimiento de pluripotencia se encuentra conservada tanto entre PSCs de distinto origen (ej. iPSCs y ESCs) como entre especies (ej. ratón y humano).

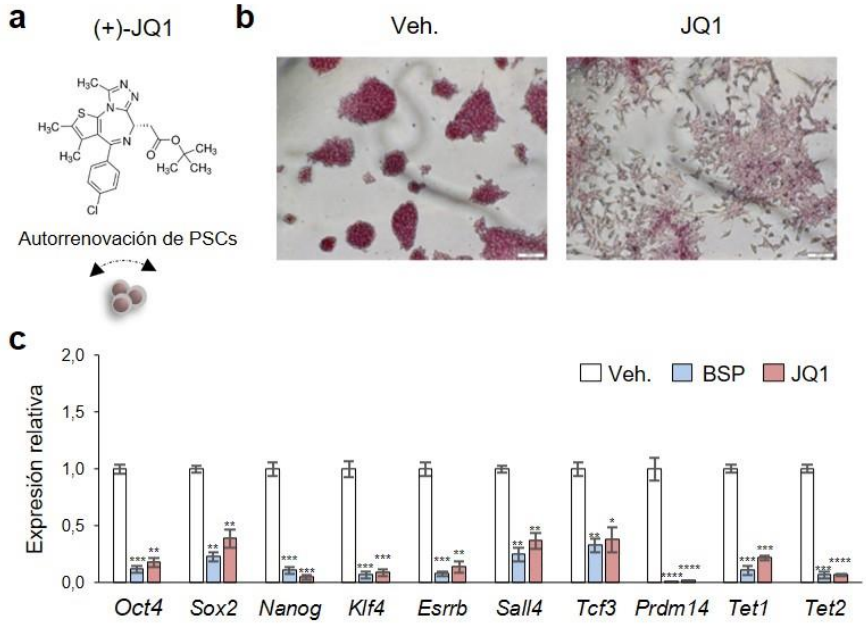


Figura R29. La actividad BRD de BET es esencial para el mantenimiento del estado celular pluripotente. a, Representación de la molécula de JQ1 utilizada para evaluar la actividad BRD de la familia BET sobre la capacidad de autorrenovación de PSCs. **b**, Imágenes representativas de microscopía visible de contraste de fases de iPSCs cultivadas en condiciones estándar SL durante 48h en presencia de JQ1(1μM) o DMSO (Veh.). Se muestran células teñidas contra fosfatasa alcalina (AP). **c**, Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión relativos de los genes indicados en iPSCs tratadas con BSP (1μM), JQ1(0,5μM) o DMSO (Veh.) durante 24h en condiciones estándar SL. Los datos en son mostrados como media ± s.e.m. (n=3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas t de *Student* de dos colas. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001.

5.4.3 La inhibición de MEK y GSK3β sostiene la autorrenovación de iPSCs en presencia de JQ1

Durante el transcurso de esta Tesis doctoral, Finley y colaboradores reportaron que el requerimiento de la actividad de BRD de BET para el mantenimiento de la pluripotencia en ESCs no resultaba esencial si en las condiciones estándar de cultivo de pluripotencia murina, es decir en presencia de suero y LIF, se inhibían simultáneamente las rutas de las quinasas MEK y GSK3β [451]. Teniendo esto en consideración, lo primero que hicimos fue validar este sorprendente hallazgo utilizando la línea de ESCs *Nanog*-GFP cultivadas con las mismas condiciones de cultivo reportadas en este estudio: 1) condiciones estándar en presencia de suero y LIF (medio SL); y 2) medio SL con presencia de los dos inhibidores de MEK [PD0325901] y GSK3β [CHIR99021] (medio SL+2i). De manera consistente con los resultados reportados por Finley y colaboradores, nuestros resultados obtenidos mediante citometría de flujo confirmaron que la presencia de los dos inhibidores de MEK y GSK3β fue suficiente para neutralizar el impacto de JQ1 sobre los niveles del marcador de pluripotencia *naïve* NANOG en ESCs (**Figura 30a**). Motivados por esto, decidimos analizar si las condiciones reportadas por Finley y colaboradores eran suficientes para mantener también la pluripotencia en ausencia de actividad BRD de BET independientemente del tipo de origen de células pluripotentes murinas. Para este fin, analizamos el impacto de la presencia de JQ1 en iPSCs generadas a partir de MEFs en las condiciones de cultivo SL, SL+2i y también en medio *naïve* 2i con presencia de LIF, pero en ausencia de suero (medio 2iL). De manera consistente con los datos obtenidos en ESCs, la presencia de los dos inhibidores de MEK y GSK3β en presencia de suero y LIF (medio SL+2i) fue suficiente para rescatar el fenotipo de colonia y presencia de fosfatasa alcalina (AP) de las iPSCs tratadas con JQ1 (**Figura R30b**). Sin embargo, también observamos que este efecto era dependiente de la presencia de suero ya que el medio 2iL por si solo fue incapaz de evitar el requerimiento de la actividad BRD de BET (**Figura R30b**). Por último, utilizamos un ensayo de formación de colonias para confirmar el impacto de JQ1 en la capacidad de autorrenovación de las iPSCs en las tres condiciones de cultivo examinadas (**Figura R30c**). En líneas con los resultados anteriores, sólo

la presencia de suero combinada con la presencia de la citoquina LIF y los dos inhibidores de MEK y GSK3β fue suficiente para mantener la capacidad de autorrenovación de las iPSCs tratadas con JQ1 durante un periodo prolongo de cultivo de hasta 6 días (**Figura R30d**).

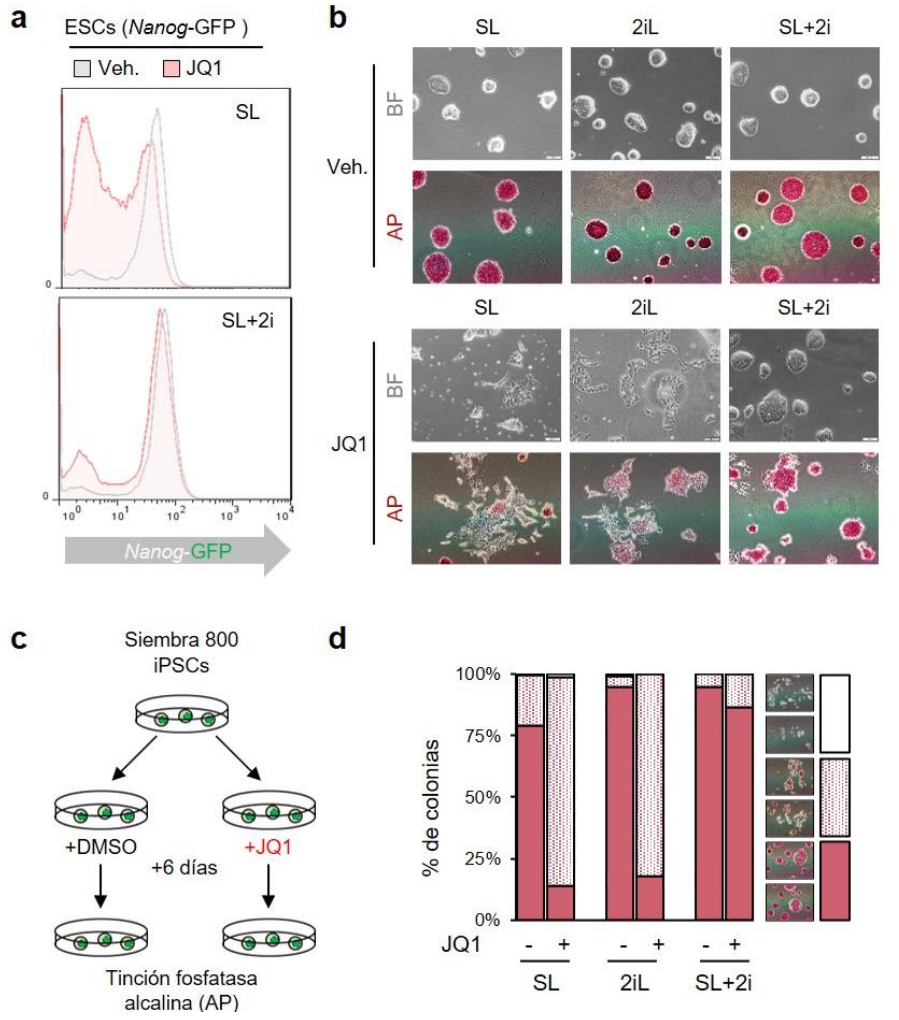


Figura R30. El mantenimiento de la pluripotencia en iPSCs tratadas con JQ1 es posible mediante las condiciones de cultivo SL+2i. a, Análisis mediante FACS de la distribución poblacional de los niveles de *Nanog*-GFP obtenidos en ESCs tratadas con JQ1 (0,5μM) o DMSO (Veh.) durante 48h en las condiciones de cultivo indicadas. El histograma en gris representa el control negativo obtenido mediante FACS de la línea ESC parental sin reportero GFP. **b**, Imágenes representativas de microscopía visible

de contraste de fases de iPSCs cultivadas en las condiciones indicadas durante 48h en presencia de JQ1 (0,5μM) o DMSO (Veh.). Se muestran células sin teñir (Fase) y células teñidas contra fosfatasa alcalina (AP). **c**, Representación esquemática del ensayo de formación de colonias para valorar la capacidad de autorrenovación de iPSCs en presencia o ausencia de JQ1 (0,5μM). Se cultivan 800 células individuales y se evalúa su capacidad de autorrenovación mediante la tinción con fosfatasa alcalina (AP) tras 6 días de cultivo en las condiciones ensayadas. **d**, Resultado del ensayo de formación de colonias realizado como se esquematiza en **c** a partir de las condiciones de cultivo y tratamiento indicados. Los tipos de colonias obtenidas se clasificaron en tres tipos atendiendo a su morfología y presencia del marcador AP como se indica en las imágenes representativas de la derecha: diferenciadas (paneles superiores), parcialmente diferenciadas (paneles intermedios) o no diferenciadas (paneles inferiores).

En su conjunto, nuestros resultados muestran que el medio con dos inhibidores en presencia de suero y LIF es capaz de mantener de manera efectiva la red de pluripotencia en ausencia de la actividad BRD de la familia BET en PSCs murinas independientemente de su origen (ej. iPSC o ESCs).

5.4.4 El medio SL+2i no es suficiente para rescatar la ausencia de actividad BRD de BET en reprogramación

Una vez comprobado que la actividad BRD de BET no resulta esencial en el mantenimiento de pluripotencia en PSCs cultivadas en medio SL+2i, decidimos investigar si estas mismas condiciones particulares de cultivo celular podrían ser suficientes para evitar el requerimiento del reconocimiento de residuos Kac por las BET durante la formación de iPSCs. Para los ensayos de reprogramación se utilizaron intermediarios avanzados de reprogramación con expresión forzada de NANOG procedentes tanto de fibroblastos murinos embrionarios MEFs (rOSKMN) (**Figura R31a**) como de la línea progenitora neural epitelial NSO4G (rOKMN) (**Figura R31c**). Luego el efecto de JQ1 en la transición pre-iPSC a iPSC fue evaluado en cada las tres condiciones de cultivo ensayadas previamente en PSCs correspondientes a medio SL, medio 2iL y medio SL+2i. En estas condiciones ensayadas de reprogramación observamos que, al contrario que sucede en el mantenimiento del estado celular pluripotente (**Figura R30),** el medio SL+2i fue incapaz de rescatar la ausencia de actividad BRD de BET en las células tratadas con JQ1 (**Figura R31b y R31d**).

Además, en las condiciones ensayadas pudimos observar que, incluso en ausencia del tratamiento con JQ1, la reprogramación tanto en el medio SL como en el medio SL+2i es incapaz de facilitar la reprogramación de manera eficiente en ambos tipos de pre-iPSCs (**Figuras R31b y R31d**). Así, nuestros datos muestran que la presencia de suero en el medio de reprogramación en combinación con los inhibidores de MEK y GSK3β, al contrario que en las PSCs, condiciona la adquisición de pluripotencia en presencia o ausencia de JQ1.

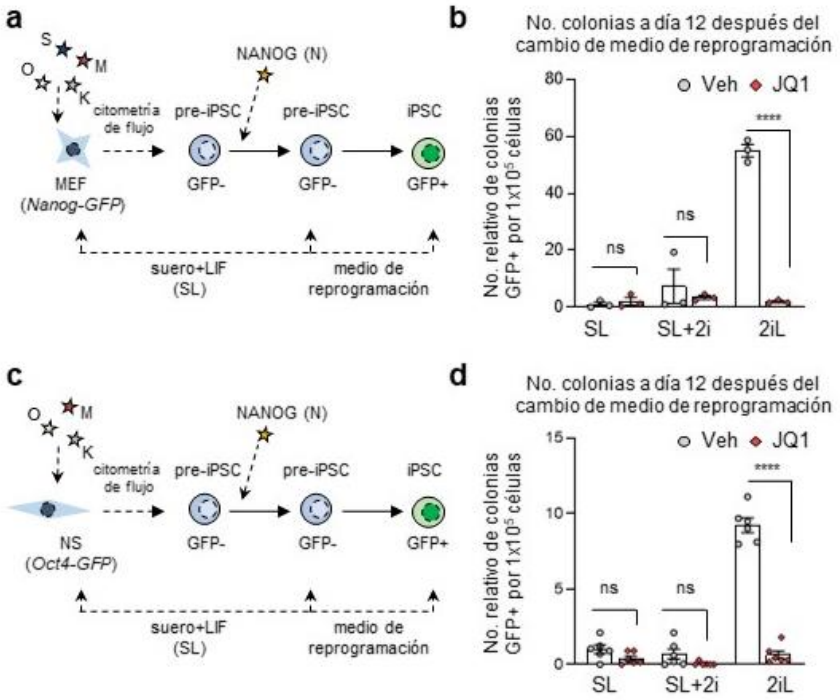


Figura R31. La ausencia de actividad BRD de BET no puede ser compensada por medio SL+2i en la transición pre-iPSC a iPSC. a, Representación esquemática de la estrategia utilizada para obtener intermediarios de reprogramación (rOSKMN) a partir de MEFs que contienen un reportero GFP bajo el control del promotor de *Nanog*. **b**, Número relativo de colonias positivas para *Nanog*-GFP+ tras 12 días de reprogramación en las condiciones de cultivo y tratamientos indicados. **c**, Representación esquemática de la estrategia utilizada para obtener intermediarios de reprogramación (rOSKMN) a partir de la línea progenitora neural NSO4G que contienen un reportero GFP bajo el control del promotor de *Oct4*. **d**, Número relativo

de colonias positivas para *Oct4*-GFP+ tras 12 días de reprogramación en las condiciones de cultivo y tratamientos indicados.

En conjunto, tomando en consideración los datos obtenidos en mantenimiento (**Figura R30)** y en la adquisición (**Figura R31**) del estado celular pluripotente, nuestros resultados sugieren la existencia de distintos mecanismos moleculares en los que participa la actividad BRD de BET en estos dos complicados procesos de toma de decisiones a nivel celular.

5.4.5 La presencia de BRD3 y BRD4 resulta necesaria para el mantenimiento de pluripotencia *naïve*.

Teniendo en cuenta nuestros datos en reprogramación indicando que BRD3 y BRD4 son necesarios durante la transición pre-iPSC a iPSC y que BRD2 actúa como una barrera en la formación de iPSCs, decidimos explorar la posible existencia de funciones específicas de estos tres miembros de la familia BET en el mantenimiento de pluripotencia. Para este fin se realizaron ensayos de pérdida de función utilizando shRNAs contra cada uno de los miembros de esta familia en ESCs de origen murino. En primer lugar, se evaluó la capacidad de autorrenovación de ESCs infectando la cepa CCE con partículas lentivirales conteniendo shRNAs contra *Brd2*, *Brd3* o *Brd4* y shEV como control (**Figura R32a**). En este caso, mediante tinción contra el marcador de fosfatasa alcalina (AP) se observó que la pérdida de función de BRD4 y en menor medida BRD3, pero no BRD2, afectaban a la típica morfología compacta de colonia pluripotente (**Figura R32a**). Además, se observó que sólo los shRNAs contra BRD4 conllevaban una pérdida total de la presencia del marcador AP en comparación con las CCE transducidas con shEV (**Figura R32a**). Teniendo en cuenta que el marcador fosfatasa alcalina está presente en células pluripotentes *naïve* y *primed*, así como en otros linajes somáticos, decidimos examinar el efecto del impacto de la pérdida de función de cada uno de estos miembros de la familia BET en ESCs mediante el análisis de los niveles del marcador de pluripotencia *naïve* NANOG. Para esto, se realizaron los respectivos ensayos de pérdida de función por ARN de

interferencia en la cepa NG4 ESCs, que contiene un reportero GFP bajo el control del gen *Nanog*, condiciones estándar de cultivo SL (**Figura R32b**). Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo mostraron que mientras la ausencia de BRD2 no afecta en gran medida a los niveles de NANOG comparado a las poblaciones control, la pérdida de función de BRD3 y BRD4 conlleva un descenso importante del porcentaje de células positivas para *Nanog*-GFP. Así, estos resultados preliminares sugieren que al contrario que BRD2, la presencia de BRD3 y BRD4 es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia *naïve*.

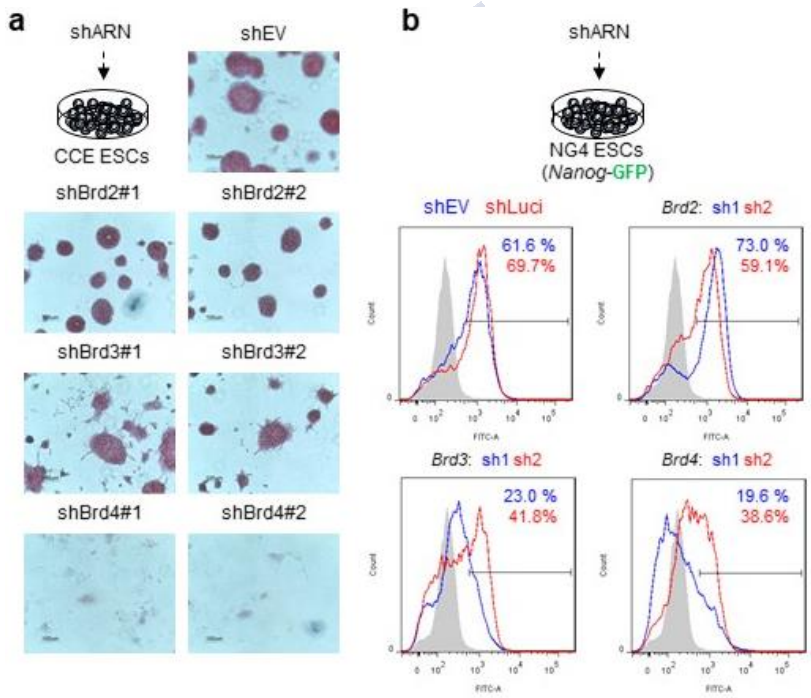


Figura R32. BRD3 y BRD4, pero no BRD2, son importantes para el mantenimiento del estado celular pluripotente *naïve*. a, Imágenes representativas de microscopía visible de contraste de fases de la cepa CCE de ESCs transducidas de manera estable con los shRNAs indicados y cultivadas en condiciones estándar SL durante 72 horas Se muestran células teñidas contra fosfatasa alcalina (AP). **b**, Análisis mediante FACS de la distribución poblacional de los niveles de *Nanog*-GFP obtenidos en la cepa NG4 de ESCs transducidas y cultivadas como en **a**. El histograma en gris representa el control negativo obtenido mediante FACS de la línea CCE parental sin reportero GFP.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. DISCUSIÓN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La habilidad de reprogramar células diferenciadas hacia células pluripotentes inducidas (iPSCs), las cuales son muy similares a las células troncales embrionarias (ESCs), ofrece un gran potencial para la investigación biomédica y con fines clínicos. Sin embargo, en la actualidad, a pesar de que han transcurrido 15 años desde que los doctores Takahashi y Yamanaka mostraran que es posible obtener de manera artificial estas células pluripotentes en cultivo [38], todavía existen varias limitaciones asociadas a la generación de iPSCs, entre las que se incluyen la baja eficiencia en su formación y la inestabilidad genómica de las iPSCs generadas entre otras, lo que limita el gran potencial de esta prometedora tecnología con fines terapéuticos. Esto se debe en gran parte a que, a pesar del gran esfuerzo invertido en los últimos años por la comunidad científica, todavía no se conocen en profundidad los programas moleculares que gobiernan este complejo proceso de reprogramación de una identidad celular diferenciada en una pluripotente. Motivados por esto, en este trabajo de tesis doctoral nos propusimos como meta principal descifrar la función del reconocimiento de residuos de lisina acetilados (Kac) por las proteínas que contienen bromodominios (BRDs) en la formación de iPSCs. Aquí, demostramos que la actividad BRD resulta esencial tanto para la formación de iPSCs como para el mantenimiento del estado celular pluripotente en cultivo. Además, mediante análisis por cribado químico identificamos la existencia de actividades BRD específicas con funciones opuestas durante la reprogramación celular somática (SCR) para generar iPSCs. De manera destacable, encontramos que la actividad BRD que contienen las proteínas de la familia BET de coactivadores transcripcionales resulta esencial tanto en la adquisición como en el mantenimiento de pluripotencia. Con respecto a la formación de iPSCs, nuestros resultados indican que la actividad BRD de BET es dispensable en las etapas iniciales de reprogramación a partir de células diferenciadas mesenquimales, pero resulta necesaria en las etapas finales de reprogramación durante la transición pre-iPSC a iPSC. A nivel molecular, nuestros datos revelan que la inhibición química de la actividad BRD de BET en pre-iPSCs altera la composición de la

cromatina provocando la deslocalización de factores con papeles importantes en: 1) organización de la cromatina; 2) estabilidad genómica; y 3) en el control de la expresión génica. Mediante aproximaciones de ganancia y pérdida de función de las tres proteínas BET presentes en los intermediarios avanzados de reprogramación, descubrimos funciones no redundantes y esenciales de BRD3 y BRD4 para la inducción y mantenimiento de pluripotencia. Por el contrario, encontramos que BRD2, el otro miembro de las BET presente en pre-iPSCs, actúa como barrera de reprogramación limitando la generación de iPSCs.

6.1 IMPACTO DEL RECONOCIMIENTO DE RESIDUOS KAC EN REPROGRAMACIÓN Y PLURIPOTENCIA

La acetilación en residuos de lisina (Kac) de histonas correlaciona con un estado de cromatina menos condensado y un programa transcripcional más permisivo [100]. Estudios seminales pusieron de manifiesto que las células pluripotentes presentan mayores niveles de Kac en residuos específicos de histonas (ej. H3ac, H3K9ac, H3K27ac, H4ac y H4K5ac) que las células diferenciadas [158,160,452]. De manera consistente, nuestros resultados muestran que tanto ESCs como iPSCs presentan mayores niveles de acetilación (ej. PANac, H3K27ac y H3K56ac) que células somáticas (MEFs) y células multipotentes (NSO4G) (**Figura R1**). Sin embargo, probablemente debido a la escasez inicial de moléculas selectivas contra la actividad de reconocimiento de residuos Kac por las proteínas "lectoras" con bromodominios (BRD), el papel del reconocimiento de la acetilación en residuos de lisina durante reprogramación y pluripotencia ha permanecido bastante esquivo hasta la actualidad. Por el contrario, numerosos estudios han puesto de manifiesto la relevancia de los mecanismos moleculares relacionados con la deposición (mediada por proteínas "escritoras" HAT) y eliminación de Kac (mediada por proteínas "borradoras" HDAC) no sólo en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas sino también en reprogramación y pluripotencia [60,100,453,454]. Debido a esto y tomando ventaja del desarrollo reciente de moléculas inhibidoras para una amplia variedad

de dominios BRD [243,295-299], la principal meta de este trabajo fue elucidar la contribución del reconocimiento de residuos Kac por la familia de proteínas BRD en reprogramación y pluripotencia.

En este trabajo mostramos por primera vez que la inhibición de la actividad global BRD, mediante el uso del inhibidor BRD de amplio espectro bromosporina (BSP) [317], impide la generación de células pluripotentes (**Figura R2**) y compromete el estado celular pluripotente en cultivo (**Figura R28**). Por otro lado, teniendo en cuenta que el genoma murino codifica para 40 proteínas que contienen los 53 dominios BRDs (**Figura R3)**, procedimos a diseccionar las posibles funciones de estas actividades BRD específicas durante la formación de iPSCs mediante el uso de un pequeño cribado químico consistente de BSP y otros 28 inhibidores BRD selectivos disponibles comercialmente (**Figura R5**). En línea con la complejidad observada en la dinámicas de expresión de los genes que codifican proteínas BRD durante la reprogramación mediada por OSKM (**Figura R4**), nuestro cribado químico durante la reprogramación OSKM de MEFs reveló la existencia tanto de actividades BRD que resultan necesarias para una reprogramación exitosa como otras cuya inhibición química aumenta la eficiencia en la formación de iPSCs (**Figura R6**). A este respecto, encontramos que la presencia de los inhibidores de la las familias I (L-Moses), III (SGC-CBP30, Ischemin, I-CBP112, CPI-637 y PF-CPB1) y VIII (PFI-3) de proteínas BRD durante reprogramación facilita la obtención de células pluripotentes (**Figura R6**). Al contrario, la presencia de los inhibidores PFI-4 y OF-1 (BRPF1, BRPF3 y BRD1 de la familia IV),), I-BRD9 (BRD9 de la familia IV), BAY-299 (BRD1 de la familia IV y TAF1 de la familia VII) así como el tratamiento con inhibidores selectivos contra la familia BET (JQ1, I-BET151, PF-1, I-BET762, CPI-203, CPI-0610, MS147, ABBV-075 y OTX015) reduce de manera significativa la eficiencia en la formación de iPSCs (**Figura R6**). De manera destacable, observamos que la presencia de los inhibidores de la familia BET fenocopia el efecto de la presencia del inhibidor BRD de amplio espectro BSP durante reprogramación impidiendo la formación de iPSCs (**Figura R6**) y comprometiendo la capacidad de autorrenovación de las células pluripotentes (**Figura R29**). Por este motivo, decidimos centrarnos en diseccionar con más

detalla la función de la actividad BRD de la familia BET tanto en reprogramación como en pluripotencia. Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros datos durante la reprogramación que identifican estas otras actividades BRD diferentes a las de la familia BET con funciones relevantes en reprogramación (**Figura R6**), más estudios serán necesarios para diseccionar en profundidad los mecanismos moleculares gobernados por el reconocimiento de residuos Kac tanto en reprogramación como en pluripotencia.

6.2 FUNCIONES BRD ESPECÍFICAS: SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE CRIBADOS QUÍMICOS EN REPROGRAMACIÓN

Un estudio reciente llevado a cabo por Ebrahimi y colaboradores en el que se realizaba un cribado químico para factores epigenéticos relacionados con cromatina, entre los que se incluían algunos de los inhibidores utilizados en nuestro estudio contra actividad BRD, también reveló la existencia de bromodominios con papeles importantes durante la generación de iPSCs [99]. Cabe destacar, antes de realizar la comparativa entre sus hallazgos y los nuestros, que existen importantes diferencias entre los sistemas de reprogramación y condiciones de cribado utilizados en su estudio con respecto al nuestro. Entre las diferencias más destacables se encuentran: 1) aunque tanto en nuestro estudio como el suyo utilizamos fibroblastos como células somáticas a reprogramar mediante el sistema OSKM, Ibrahimi y colaboradores usan fibroblastos (dH1f) de origen humano y nosotros fibroblastos de origen murino (MEFs); 2) Ibrahimi y colaboradores sólo realizan el tratamiento con los inhibidores durante los 7 primeros días de los 21 que dura su ensayo de reprogramación, mientras que nosotros mantenemos los compuestos químicos durante todo el ensayo de reprogramación; 3) Ebrahimi y colaboradores sólo analizan el impacto de los distintos compuestos en presencia del inhibidor de la metilasa H3K79 DOT1L, con el fin de identificar vías asociadas al control de la cromatina que trabajan en paralelo con la marca epigenética H3K79, que había sido identificada como una importante barrera durante la reprogramación [99,215,222,455]; y 4) en nuestro estudio analizamos la eficiencia de reprogramación mediante la activación del marcador *bona fide* de pluripotencia OCT4, mientras que en el estudio de Ibrahimi y

colaboradores determinan el éxito de reprogramación mediante la presencia del marcador TRA-I-60, que se activa no sólo en células pluripotentes sino que también se encuentra presente en intermediarios avanzados de reprogramación.

Sin embargo, a pesar de estas diferencias arriba indicadas, varios de los hallazgos reportados por el estudio de Ibrahimi y colaboradores son consistentes con nuestros resultados. En particular, los datos obtenidos por Ebrahimi y colaboradores muestran que, de manera consistente a nuestros resultados, el uso de inhibidores específicos CBP30 y I-CBP112 contra la actividad de los BRDs presentes en las proteínas EP300/CBP favorece la formación de iPSCs [99]. De modo interesante, sus datos muestran que el tratamiento con CBP30 o I-CBP112 ejerce su efecto a través de la regulación a la baja del programa transcripcional fibroblástico [99]. Por otro lado, Ebrahimi y colaboradores muestran que la inhibición de la actividad BRD de BAZ2A y BAZ2B con GSK2801, y en menor medida con BAZ2-ICR, aumenta la eficiencia en la generación de iPSCs humanas [99]. Mientras que en nuestras condiciones de reprogramación a partir de fibroblastos murinos también observamos que el tratamiento con GSK2801 favorece la reprogramación, nosotros no observamos ningún efecto positivo en la formación de iPSCs mediante el uso inhibidor BAZ2-ICR (**Figura R6**). Estas discrepancias observadas entre nuestro estudio y el de Ebrahimi y colaboradores con respecto al tratamiento con BAZ2-ICR podrían ser simplemente el reflejo de las distintas condiciones de ensayo de reprogramación previamente indicadas o incluso deberse a la mayor concentración de este inhibidor específico utilizado en nuestro sistema de reprogramación (2µM) en comparación a la dosis empleada en el estudio de Ebrahimi y colaboradores (1µM). De manera destacada, en el cribado realizado por Ebrahimi y colaboradores también encuentran, de manera consistente con nosotros, que la presencia de LP99, que actúa inhibiendo las actividades BRD presentes en las proteínas BRD7 y BRD9, aumenta el número de colonias pluripotentes obtenidas a partir de fibroblastos humanos [99]. Aunque tanto nuestros resultados como los de Ebrahimi y colaboradores indican que la inhibición conjunta de las actividades de BRD7 y BRD9 favorece reprogramación de manera conservada tanto en humanos como en ratón, nosotros identificamos

por el contrario que la inhibición específica de sólo la actividad BRD de BRD9 afecta negativamente a la eficiencia en la formación de iPSCs (**Figura R6**). Teniendo esto en cuenta, sería tentador especular que la actividad BRD de BRD7 funciona como una barrera de reprogramación más determinante que la posible actividad BRD de BRD9 facilitando la inducción de pluripotencia. Sin embargo, futuros estudios serán necesarios para explorar esta posibilidad y desenmascarar los programas moleculares que son gobernados por los bromodomios presentes en BRD7 y BRD9 durante la generación de iPSCs. Otra similitud con respecto al impacto de la inhibición de actividades BRD específicas entre nuestro estudio y el Ibrahimi y colaboradores es el referente a la presencia de PFI-3, que actúa inhibiendo el reconocimiento de residuos Kac por los BRDs presentes en SMARCA2, SMARCA4 y PBRM1, favoreciendo el aumento en el número de colonias pluripotentes murinas (**Figura R6**) y humanas [99]. De modo interesante, en el estudio de Ibrahimi y colaboradores reportan que la inhibición específica de los BRDs de SMARCA2 y SMARCA4 mediante el inhibidor SMARCA, no tiene efecto en la eficiencia del proceso [99], lo que podría estar sugiriendo que la actividad BRD contenida en PBRM1 es la que actúa como una barrera en la reprogramación celular somática. Por otro lado, en cuanto al papel de las actividades BRD contenidas en las proteínas BRPF1, BRPF3 y BRD1 durante reprogramación existen similitudes y discrepancias entre los resultados obtenidos en ambos estudios con los inhibidores PFI-4, NI-57 y OF-1 utilizados contra estas proteínas. En concreto, el efecto de la presencia de: 1) PFI-4, de manera consistente entre nuestro estudio y el de Ibrahimi y colaboradores, afecta negativamente a la formación de iPSCs (**Figura R6**) [99]; 2) NI-57 no altera de modo significativo la eficiencia de reprogramación (**Figura R6**) [99]; y 3) En nuestras condiciones de reprogramación OF-1 reduce el porcentaje de células pluripotentes positivas para Oct4-GFP (**Figura R6**), mientras que en las condiciones de reprogramación de Ibrahimi y colaboradores la presencia de OF-1 aumenta el número de células pluripotentes positivas para TRA-1-60 [99]. A este respecto, es probable que estas discrepancias puedan simplemente ser consecuencia de las diferencias entre los ensayos y condiciones de reprogramación indicadas más

arriba. Sin embargo, más estudios serán necesarios para esclarecer con detalle no sólo el impacto de la presencia de OF-1 durante reprogramación sino también las funciones específicas de los dominios BRD presentes tanto en BRPF1, BRPF3 como BRD1. Finalmente, en el estudio de Ibrahimi y colaboradores también probaron el efecto en reprogramación de la inhibición conjunta de DOTL1 con algunos inhibidores de la actividad de la actividad BRD presente en las proteínas BET de la familia II [99]. Sin embargo, a este respecto, sus resultados con respecto a el impacto sobre la eficiencia de reprogramación utilizando varios inhibidores BET (JQ1, PF-1, i-BET) son contradictorios entre ellos, lo que podría ser una consecuencia de diferencias en las concentraciones de los inhibidores utilizadas o que los efectos de la inhibición de la actividad BRD de BET al inicio de la reprogramación podrían ser redundantes o verse compensados por la ausencia de actividad metilasa H3K19 de DOT1L. Teniendo en cuenta esta última posibilidad, sería interesante analizar en futuros estudios si las discrepancias observadas entre nuestro estudio y el de Ibrahimi y colaboradores, podrían están relacionadas con una posible interconexión de actividad BRD específica con la metilación H3K79 dependiendo del contexto de fase de reprogramación.

6.3 LA COMPLEJIDAD DE LA ACTIVIDAD BRD DE BET EN REPROGRAMACIÓN Y PLURIPOTENCIA

En línea con varias evidencias científicas anteriores mostrando que la inhibición de la actividad BRD de BET, principalmente mediante el uso de JQ1 [301], compromete la capacidad de autorrenovación de ESCs de origen murino y humano [389,449,450,456], nuestros resultados muestras que el mantenimiento del estado celular pluripotente de las iPSCs también depende de la capacidad de reconocimiento de residuos Kac por la familia BET (**Figura R29**). Sin embargo, un estudio reciente realizado por el grupo del Dr. Thompson ha mostrado que la ausencia de actividad BRD de BET puede ser compensada mediante la modificación de las condiciones estándar de cultivo de ESCs murinas, es decir presencia de suero y LIF (SL), a través de la adición de dos inhibidores (2i) de las quinasas MEK yGSK3β [451]. En este estudio, los autores demuestran que, bajo estas condiciones de cultivo particulares (SL+2i), la pérdida

de actividad BRD de BET, y en particular la actividad BRD contenida en BRD4, puede ser compensada por las funciones cooperativas de las demetilasas de ADN TET1/2 con otros factores de transcripción [451]. Motivados por este sorprendente hallazgo realizado por el grupo del Dr. Thompson, nosotros pusimos primero a prueba si sus condiciones SL+2i serían suficientes para rescatar no sólo el efecto de la pérdida de actividad BRD en el mantenimiento de las iPSCs sino también durante la reprogramación. De manera destacada, mientras que nuestros resultados confirman que el efecto del tratamiento con JQ1 sobre la capacidad de autorrenovación tanto de ESCs como iPSCs puede ser neutralizado mediante su cultivo en medio SL+2i (**Figura R30**), las condiciones SL+2i resultaron insuficientes para evitar la pérdida de función de actividad BRD de BET durante reprogramación (**Figura R31**). Estos resultados sugieren de la existencia de distintos programas moleculares gobernados por la actividad BRD de las BET que intervienen en la adquisición de pluripotencia y en la capacidad de autorrenovación cuando la pluripotencia ya se ha establecido.

Con respecto al papel de la actividad BRD en la inducción de pluripotencia nuestros resultados muestran que durante la reprogramación OSKM de MEFs la presencia de inhibidores estructuralmente distintos pero específicos contra la actividad BRD de BET (JQ1, ABBV-075, CPI-0610, I-BET151, I-BET762, MS147, OTX015 y PF-1) impide la formación de iPSCs (**Figura R6**). Este efecto de la inhibición específica de la actividad BRD de BET en reprogramación recapitula el obtenido en ausencia total de actividad BRD y afecta las etapas avanzadas impidiendo la transición pre-iPSC a iPSC (**Figuras R6 y R7)**. Además, nuestros datos muestran que la ausencia de actividad BRD no compromete la activación del programa transcripcional envuelto en la transición mesenquimal-epitelial (MET) (**Figura R8**). Sin embargo, la actividad BRD de BET resulta esencial en las etapas avanzadas de la reprogramación para la activación y estabilización de la red que gobierna la pluripotencia (**Figuras R8-R10**). En línea con nuestros datos, dos trabajos anteriores realizados por los grupos del Dr. Esteban y Dr. Hu también reportaron que la presencia de inhibidores de la actividad BRD de BET (JQ1, I-BET151 y CPI203)

durante la reprogramación OSKM en fibroblastos murinos (MEFs) [224] o en fibroblastos humanos (BJs) con OSK [170] comprometía la generación de iPSCs. Sin embargo, otro estudio realizado también por el grupo del Dr. Hu mostró que la inhibición de la actividad BRD de BET (JQ1 y I-BET151), pero sólo durante las etapas iniciales de la reprogramación, era suficiente para aumentar de manera considerable la reprogramación de fibroblastos humanos (BJs) con OSK [403]. Con respecto a este estudio, los autores indican que la inhibición leve de la actividad BRD de BET estaría favoreciendo la eliminación de la "memoria transcripcional somática" de los fibroblastos en cultivo lo que favorecería la generación de iPSCs, [403]. Con respecto a este hallazgo, que ocurra incluso en fibroblastos no sujetos a reprogramación, apoyaría que la ausencia de actividad BRD de BET podría favorecer en ciertos contextos celulares el cambio de identidad celular. En línea con esta posibilidad, otro estudio mostró que la inhibición temporal de la actividad BRD de BET mediante I-BET151 era suficiente para aumentar la eficiencia de la reprogramación directa, también conocida como transdiferenciación, de fibroblastos murinos hacia neuronas [457]. Aunque en las condiciones utilizadas en este trabajo o en el estudio del Dr. Esteban no se observó que la ausencia de actividad BRD de BET favoreciese la regulación a la baja de genes somáticos mesenquimales, nuestros datos preliminares sugieren que la reducción parcial pero no total de la actividad BRD de BET favorece el silenciamiento del "programa somático" al inicio de la reprogramación (datos no mostrados). A este respecto, sería interesante profundizar en estudios futuros cual es el papel de cada una de las actividades BRD contenidas en cada uno de los miembros de la familia BET en la transición MET. Por otro lado, la existencia de funciones específicas de actividad BRD de BET dependiente de fase de reprogramación, que posiblemente se encuentren conservadas entre especies, pone de relieve la complejidad para la disección de las funciones dependientes de reconocimiento de residuos Kac por esta familia durante la inducción de pluripotencia. Por esto, en este estudio centramos nuestros esfuerzos a la hora de interrogar qué mecanismos moleculares se encontraban

afectados en ausencia de actividad BRD de BET durante adquisición del estado celular pluripotente.

6.4 LA ACTIVIDAD BRD DE BET Y SU IMPACTO EN LA CROMATINA DE PRE-iPSCS

Nuestros resultados no sólo identifican que la actividad BRD de BET resulta esencial para la transición exitosa del estado pre-iPSC a iPSC, sino que muestran que la ausencia de actividad BRD de BET afecta al rendimiento de reprogramación de las pre-iPSCs en mayor o menor medida dependiendo del momento y duración del tratamiento (**Figura R11**). Teniendo en cuenta que la ausencia de actividad BRD de BET no afecta ni a la viabilidad celular ni a la capacidad proliferativa de las pre-iPSCs (**Figura R12**), la imposibilidad de transitar al estado celular pluripotente incluso tras inhibición aguda de los dominios BRD de BET durante 24 horas (**Figura R11**) podría deberse a una posible "memoria epigenética" persistente en las células tratadas. En línea con esta posibilidad, encontramos que la presencia de JQ1 durante 24 horas en pre-iPSCs cultivadas en condiciones estándar SL era suficiente para alterar de manera importante la composición proteica de la cromatina (**Figura R13**). Además, nuestros resultados indican que la actividad BRD de BET resulta esencial para la composición de la cromatina en pre-iPSCs tanto de manera dependiente como independiente de regulación transcripcional de los genes que codifican a las proteínas deslocalizadas (**Figura R14**). Entre los factores proteicos deslocalizados en cromatina, como consecuencia de la ausencia de actividad BRD de BET, se encontraban factores reguladores clave tanto en el control del daño en al ADN como en la organización de la cromatina y en la regulación de la expresión génica (**Figura R15**). De manera importante, cada uno de estos tres procesos no sólo están interconectados entre sí en multitud de contextos celulares y condiciones fisiopatológicas, sino que su desregulación tanto en reprogramación como pluripotencia limita los potenciales usos terapéuticos de la tecnología iPSC [229,236-238]. Previo a este trabajo se había reportado, aunque en un contexto celular diferente de transformación maligna, que un miembro de la familia BET (BRD4) participaba en la regulación del daño en el ADN [458]. En este estudio los

autores muestran que una isoforma específica de BRD4 participa en un mecanismo que implica la supresión de la señalización γH2AX mediada por el reclutamiento del complejo de remodelación de la cromatina Condensina II, el cual favorece la compactación nuclear [458]. Aunque nosotros observamos que la presencia de JQ1 en pre-iPSCs conlleva un aumento de la compactación nuclear acompañado de incremento en el marcador de daño γH2AX (**Figuras R16 y R18**), esto no fue acompañado por la alteración de la presencia en cromatina de ninguno de los miembros del complejo Condensina II en las células tratadas (**Figura R13d**). Estos datos sugieren que la actividad BRD de BET, general o contenida en miembros de esta familia en particular, podría estar envuelta en otros mecanismos de control del daño en el ADN, que podrían ser incluso dependientes de contexto celular. En línea con esta posibilidad, nosotros observamos que en los intermediarios avanzados de reprogramación se produce la deslocalización en la cromatina de reguladores clave de las vías NMR y DDR que son las vías canónicas de reparación de errores de discordancia en el ADN y de reparación en respuesta al daño en ADN de manera respectiva (**Figura R16**).

Por otro lado, encontramos que la ausencia de actividad BRD de BET en pre-iPSCs altera tanto al paisaje transcripcional como el epigenético de las pre-iPSCs lo que se encuentra relacionado con cambios en la abundancia en cromatina de numerosos factores de transcripción y epigenéticos (**Figuras R17-R20**). Por ejemplo, entre los reguladores epigenéticos más desregulados en la cromatina en presencia de JQ1 encontramos una menor presencia de PADI4 y un aumento en los niveles de PRMT1 (**Figura R17**). Esto indica que la capacidad de reconocimiento de residuos Kac por los BRD contenidos en la familia BET participa en la orquestación de la regulación de las modificaciones en residuos de arginina, en la que intervienen procesos excluyentes de citrulinación por la familia de *deaminasas peptidilarginina* PADI y de metilación por la familia de *arginina metiltransferasas* PRMT [429,431-434]. De manera importante, estas modificaciones epigenéticas llevadas a cabo por la familia PADI y la familia PRMT se han involucrado en los mismos procesos que encontramos desregulados en pre-iPSCs tratadas con JQ1 incluyendo la regulación de la estructura de la cromatina, la reparación del ADN y el control de la transcripción génica

[427-430]. A este respecto, se sabe que la modificación por citrulinación en las histonas H3 y H4 favorece una cromatina menos condensada [428]. Además, recientemente, se ha descrito que la citrulinación mediada por PADI4 desempeña un papel importante favoreciendo la generación de iPSCs y resulta necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia murina [430]. Aunque el papel de PRMT1 en reprogramación y pluripotencia aguarda por ser explorado, se ha reportado que la metilación asimétrica H4R3me2 llevada a cabo por PRMT1 potencia la modificación por acetilación de las histonas H3 y H4 favoreciendo regiones activas de cromatina [459]. Teniendo en cuenta que en pre-iPSCs tratadas con JQ1 observamos: 1) disminución de los niveles globales de citrulinación y aumento de metilación en residuos de arginina en cromatina (**Figura R17**); 2) aumento de compactación de la cromatina dificultando la accesibilidad nucleosómica (**Figura R18**); 3) regulación a la baja de programas transcripcionales necesarios en pluripotencia (**Figuras R19-R21**); y 4) incapacidad de NANOG de activar y reprimir los programas transcripcionales necesarios para la transición pre-iPSC a iPSC (**Figura R21**), nuestros datos sugieren de la existencia de un programa molecular gobernado por la actividad BRD de BET que controla de manera indirecta el paisaje epigenético de la metilación y citrulinación de argininas a través de PRMT1 y PADI4 que resulta crítico en la transición pre-iPSC a iPSC. Futuros estudios aguardan para validar esta posibilidad y, en particular, para descifrar la contribución de PRMT1 en reprogramación y pluripotencia.

El impacto de la ausencia de actividad BRD de BET en pre-iPSCs tratadas con JQ1 en reprogramación no sólo se limita a estos dos reguladores epigenéticos relacionados con la epigenética de la arginina (**Figuras R13 y R14**). Por ejemplo, entre los 388 factores proteicos cuya presencia en cromatina de células tratadas se encuentra disminuida (>50%) se encuentra el factor de transcripción (TF) NACC1 (**Figuras R13 y R14**), que resulta necesario durante reprogramación facilitando la transición pre-iPSC a iPSC [460,461]. Otro candidato con presencia reducida en la cromatina de pre-iPSCs tratadas con JQ1 es MTA1, perteneciente al complejo deacetilador NuRD y con funciones importantes tanto en reprogramación como en el mantenimiento de pluripotencia [462,463]. Por otro lado, relacionado con el aumento de daño

en ADN (**Figura R16**) y aumento al alza de varias familias de retrovirus endógenos (ERVs) (datos no mostrados) en pre-iPSCs tratadas con JQ1 encontramos varios factores que actúan en el control de la retrotransposición endógena celular, la cual resulta importante para el control de la transcripción y cuya desregulación produce inestabilidad genómica mediada por aumento de daño en el ADN entre otras causas [464]. Entre estos candidatos reguladores de ERVs cuya presencia proteica se encuentra reducida la cromatina de pre-iPSCs tratadas con JQ1 se encuentra ZFP42 (**Figuras R13 y R14**), conocido también como REX1. Este factor de transcripción (TF) desempeña funciones importantes relacionadas con diferenciación y silenciamiento de retrovirus endógenos (ERVs) en pluripotencia [465,466]. También destaca la presencia reducida de PSPC1 (**Figuras R13 y R14**), que participa en procesos metastáticos en cáncer [467] y resulta esencial para el control a la baja de ERVs en células pluripotentes a través de un mecanismo mediado por TET2 y la hidroximetilación de moléculas de ARN [395]. Otro ejemplo cuyos niveles en cromatina se encuentran reducidos en ausencia de actividad BRD de BET es HELLS (**Figuras R13 y R14**), un importante regulador epigenético que interviene en la metilación *de novo* en ADN [468] con funciones importantes en pluripotencia [469] y control de ERVs [470]. Por último, cabe destacar entre las proteínas con presencia reducida en cromatina la demetilasa de lisinas KDM1A, también conocido como LSD1, (**Figuras R13 y R14**), que no sólo participa en la regulación de los niveles de metilación de histonas sino también en la metilación global del ADN [471] y que desempeña funciones importantes en desarrollo y pluripotencia [472,473] así como en la regulación de la retrotransposición endógena [23,474-476]. Por otro lado, de entre las 145 proteínas con mayor abundancia en cromatina (>50%) en ausencia de la actividad BRD de BET (**Figuras R13 y R14**), también se encuentran una serie de factores proteicos interesantes que podrían contribuir a la incapacidad de las pre-iPSCs tratadas con JQ1 de alcanzar el estado de pluripotencia. Por ejemplo, encontramos las demetilasas de histonas KDM5A y KDM5B (**Figuras R13 y R14**) que han sido mostradas de desempeñar papeles importantes en pluripotencia [477-479]. De manera sorprendente, y que podría estar en línea con nuestros hallazgos indicando que la pérdida de función de BRD3, al contrario

que la pérdida de función de BRD2 y BRD4, favorece la adquisición de pluripotencia (**Figuras R22-R27**), encontramos el aumento en cromatina de pre-iPSCs tratadas con JQ1 de factores que favorecen reprogramación como WDR5 y KLF4 [38,48,228,480-482] (**Figuras R13 y R14**). Por otro lado, aunque la ausencia de actividad BRD de BET no afecta a la viabilidad celular o capacidad proliferativa de las pre-iPSCs (**Figura R12**), se observó el aumento de promotores de muerte celular programada específica denominada "carontosis" en la cromatina de pre-iPSCs tratadas con JQ1 como es el caso del factor de apoptosis asociado a mitocondria AIFM1 y de la endonucleasa ENDOG [483,484] (**Figuras R13 y R14**). En conjunto, teniendo en cuenta la amplia variedad de factores deslocalizados en la cromatina de pre-iPSCs como consecuencia de la pérdida de actividad BRD de BET (**Figuras R13 y R14**), futuros estudios serán necesarios para descifrar la contribución de estos candidatos en la transición pre-iPSC a iPSC, así como en pluripotencia.

6.5 FUNCIONES NO REDUNDANTES Y OPUESTAS DE LA FAMILIA BET EN REPROGRAMACIÓN Y PLURIPOTENCIA

La actividad de reconocimiento de acetilación en residuos de lisina de la familia BET está contenida en cada uno de los dos dominios BRD en tándem que presentan los cuatro miembros de esta familia [143] (**Figura R22a**). Nosotros identificamos que sólo los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* se encuentran transcripcionalmente activos en pre-iPSCs (**Figura R22b**) y en células pluripotentes (datos no mostrados). De manera sorprendente, nuestros resultados no sólo identifican funciones no redundantes entre BRD3 y BRD4 en reprogramación y pluripotencia, sino que en estos mismos contextos celulares BRD2 presenta funciones opuestas (**Figuras R22-27 y R32**).

Respecto al contexto de reprogramación, nuestros resultados obtenidos mediante intervenciones genéticas de ganancia y pérdida de función revelan que tanto BRD3 como BRD4 resultan esenciales para la formación de iPSCs, mientras que la presencia de BRD2 dificulta la reprogramación (**Figuras R22-R27**). De manera importante, estos resultados son consistentes entre los distintos sistemas de

reprogramación y contextos celulares utilizados en este trabajo. Previo a nuestro estudio, el grupo del Dr. Esteban también identificó a BRD4 como un facilitador de reprogramación en las fases finales de la reprogramación OSKM a partir de fibroblastos murinos [224]. En concreto, los autores de este estudio reportaron que BRD4, a través de su dominio terminal CTM, coopera con KLF4 en un mecanismo de parada y liberación de la polimerasa II que favorece la activación de la red de pluripotencia en la fase final de reprogramación [224]. Además, otro estudio independiente llevado a cabo por el grupo del Dr. Hu identificó la existencia de una isoforma específica de BRD3, la cual denominaron BRD3R, cuya ganancia de función favorece la generación de iPSCs durante la reprogramación OSK de fibroblastos humanos a través de la activación de genes proliferativos [170]. Sin embargo, en este estudio los autores no aprecian que ni la ganancia de función de BRD4 ni la ganancia de función de la forma canónica de BRD3 sean suficientes para promover un aumento significativo en la eficiencia de reprogramación [170]. Estas discrepancias entre los estudios del Dr. Hu y del Dr. Esteban en cuanto a las funciones de BRD3 y BRD4 en reprogramación podrían ser reflejo de las diferentes condiciones ensayadas en cuento al origen murino y humano de las células somáticas a reprogramar y/o la combinación de factores de reprogramación utilizados. A este respecto, nuestros resultados demuestran que tanto la ganancia de función de BRD3 como de BRD4 favorecen la generación de iPSCs promoviendo la reactivación de la red de pluripotencia en pre-iPSCs (**Figura R25**). Además, teniendo en cuenta que la pérdida de función de BRD3 no puede ser compensada por BRD4 y viceversa (**Figuras R22-R24 y R26-R27**), nuestros resultados indican que existen funciones no redundantes entre estos dos miembros de la familia BET que son necesarias para la adquisición de pluripotencia. Tomando todo esto en consideración, futuros estudios serán necesarios para dilucidar de manera concreta en qué programas moleculares intervienen BRD3 y BRD4 en los intermediarios avanzados de reprogramación. En cuanto al papel BRD2 en reprogramación, nuestros ensayos de ganancia y pérdida de función demuestran que, al contrario que con BRD3 y BRD4, BRD2 actúa como una barrera de reprogramación impidiendo, al menos en parte, la

reactivación de la red de pluripotencia en pre-iPSCs (**Figuras R22-R27**). Aunque en otro contexto celular, BRD2 fue propuesto de cooperar con el complejo epigenético PRC1 y antagonizar la función de la variante de histona H2A.Z para mantener la cromatina de ESCs en un estado de "pausa" [485]. De modo interesante, la histona H2AZ ha sido propuesta de intervenir en las dinámicas de remodelación de la cromatina durante reprogramación para favorecer el acceso de factores de transcripción que intervienen en la activación de genes relacionados con la red de pluripotencia [486]. Futuros estudios serán necesarios para investigar la posible existencia de esta interrelación BRD2, PRC1 y H2AZ durante la generación de iPSCs y elucidar si contribuye a explicar, al menos en parte, el papel como barrera de reprogramación de BRD2 identificado en este trabajo.

Por otro lado, con respecto a las funciones de los miembros de la familia BET en el contexto pluripotencia, nuestros resultados indican que la pérdida de función de BRD3 y BRD4, pero no en el caso de BRD2, compromete el mantenimiento del estado celular pluripotente (**Figura R32**). De manera destacable, la ausencia de función de BRD4 fenocopia la ausencia total de actividad BRD de BET en células pluripotentes tratadas con JQ1 (**Figuras R30 y R31**). Nuestros resultados están en consonancia con la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en donde analizan de manera concreta el impacto de BRD4 en ESCs [389,449,450,456]. Aunque nosotros observamos que la ausencia de BRD3 también afecta a la capacidad de autorrenovación de las ESCs murinas, nuestros resultados sugieren que este efecto de BRD3 podría estar más ligado al estado alternativo de pluripotencia *naïve* (**Figura R32**). Teniendo en cuenta que se ha reportado la existencia de funciones distintas entre BRD2 y BRD3 en la diferenciación hacia el linaje de mesoendodermo [487], futuros estudios serán necesarios para explorar funciones específicas de BRD3 y de BRD4, e incluso BRD2, dependiendo e independientes de actividad BRD en la especificación de estados alternativos de pluripotencia incluyendo *naïve* y *primed*.

Para finalizar, teniendo en cuenta que tanto la reprogramación como las células pluripotentes han probado ser sistemas muy valiosos a la hora de crear nuevas oportunidades para interrogar los mecanismos

moleculares que controlan la toma de decisiones a nivel celular, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral tienen el potencial de abrir nuevas y excitantes líneas de estudio explorando el reconocimiento de residuos acetilados por los dominios BRD tanto en reprogramación y pluripotencia como en desarrollo y enfermedad.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. La ausencia de actividad BRD global compromete la generación de iPSCs y el mantenimiento de pluripotencia.

2. La actividad BRD de BET es dispensable al inicio de reprogramación, pero resulta clave en la transición pre-iPSC a iPSC.

3. La ausencia de actividad BRD de BET en pre-iPSCs altera la composición de la cromatina.

4. La actividad BRD de BET es necesaria para el control de la estabilidad genómica, la organización de cromatina y para la regulación del paisaje transcripcional en los intermediarios avanzados de reprogramación.

5. La actividad BRD de BET coopera con NANOG durante la adquisición de pluripotencia.

6. Los miembros BRD3 y BRD4 de la familia BET realizan funciones no redundantes y necesarias para una transición eficiente del estado celular pre-iPSC a iPSC.

7. BRD2 actúa como una barrera de reprogramación.

8. La ausencia de BRD3 y BRD4 altera el mantenimiento del estado celular pluripotente.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. APÉNDICE

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8.1. TABLA SUPLEMENTARIA 1. QUÍMICOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES

REACTIVOS QUÍMICOS		
REACTIVO	FUENTE	IDENTIFICADO
(+)-JQ1	APExBIO	A1910
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250
ABBV-075	Cayman Chemical	21033
Acrylamide:Bis-acrylamide, 30% solution	Sigma-Aldrich	A3574
Adenosine	Sigma-Aldrich	A4036
BAY-299	Cayman Chemical	19777
BAZ2-ICR	Cayman Chemical	17448
Benzonase® Nuclease	Millipore	E1014
BI-7273	Cayman Chemical	20311
BI-9564	Cayman Chemical	17897
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fisher BioReagents™	BP1605-100
BSA, Fraction V	Fisher BioReagents™	BP1605-100
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich	B9616
Bromosporine	Sigma-Aldrich	SML0992
Cell Lysis Solution	Puregene Accesories	158908
CHIR99021	Sigma-Aldrich	SML1046
Chloroform	Fisher Chemical	C/4920/15
CPI-0610	Cayman Chemical	21680
CPI-203	Cayman Chemical	15479
CPI-637	Cayman Chemical	23500
Cytidine	Sigma-Aldrich	C4654
DAPI	Sigma-Aldrich	D9542
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	Acros Organics	1.7E+08
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
DNA Hydration Solution	Qiagen	158916
DNase I	Thermo Scientific™	EN0521
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific™	K1081
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)- high glucose	Corning™	10-013-CVR
DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich	D6421

Dulbecco's Phosphate-Buffered Salt (DPBS) 1x	Corning™	21-031-CV
DPBS with MgCl2 and CaCl2	Sigma-Aldrich	D8662
Ethanol	Sigma-Aldrich	459844
Ethidium Bromide	Fisher Bioreagents	BP1302-10
Gelatin from bovine skin	Sigma-Aldrich	G9391
GelCode Blue Safe Protein Stain buffer	Thermo Scientific™	24594
Gibco™ B-27™ Supplement (50X)	Gibco™	17504044
Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco™	10270106
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco™	11140050
Gibco™ N-2 Supplement (100X)	Gibco™	17502048
Gibco™ Neurobasal™ Medium	Gibco™	21103049
Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco™	15140122
Glycogen	Roche	10901393001
GSK2801	Cayman Chemical	14120
Guanosine	Sigma-Aldrich	G6264
Hexadimethrine bromide	Sigma-Aldrich	H9268
Hygromycin B	Corning™	30-240-CR
I-BET151	Sigma-Aldrich	SML0666
I-BET762	Cayman Chemical	10676
I-BRD9	Cayman Chemical	17749
I-CBP112 (hydrochloride)	Cayman Chemical	14468
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich	I3021
Ischemin sodium salt	Tocris Bioscience	4695
2-propanol	Fisher Bioreagents	BP2618-212
L Moses dihydrochloride	Tocris Bioscience	6251
L-arginina-HCL (U-13C6, 99%; U-15N4, 99%), CNLM-539-H-0.25)	Cambridge Isotope Laboratories	CNLM-539-H-0.25
L-Arginine-HCl	Thermo Scientific™	88427
L-Glutamine solution	Sigma-Aldrich	G7513
L-Lysine-2HCL (U-13C6, 99%; U-15N2, 99%)	Cambridge Isotope Laboratories	CNLM-291-H-0.25
L-lysine-2HCL	Thermo Scientific™	88429
LP99	Cayman Chemical	17661
MS147	Dr. Ming-Ming Zhou	####

	lab (ISMMS, NY, USA)	
NI-57	Cayman Chemical	17662
OF-1	Sigma-Aldrich	SML1184
OTX015	Cayman Chemical	15947
PD 0325901	Sigma-Aldrich	PZ0162
PF-CBP1	Cayman Chemical	18811
PFI-1	Cayman Chemical	11155
PFI-3	Sigma-Aldrich	SML0939
PFI-4	Cayman Chemical	17663
Polyethylenimine (PEI)	Sigma-Aldrich	430599
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	P8340
Protein Precipitation Solution	Qiagen	158912
Puromycin Dihydrochloride	Fisher Bioreagents	BP2956-100
RNase A	Thermo Scientific™	EN0531
RNase OUT™	Invitrogen™	10777019
RNase ZAPTM RNase Decontamination Solution	Invitrogen	AM9780
RNasin® RNase Inhibitor	Promega	N2111
SGC-CBP30	Sigma-Aldrich	SML1133
Staurosporine from Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich	S5921
SYNERGEL 1	Diversified Biotech	DIVESYN-100
TC-E 5003	Santa Cruz Biotechnology	sc-397056
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	M5655
Thymidine	Sigma-Aldrich	T1895
TP-472	Cayman Chemical	20030
Tripan Azul 4 g/l en solución acuosa	VWR Chemicals	K940
Tris-Borate-EDTA Buffer	Fisher Bioreagents	BP1333-4
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	T8787
TRIzol™ Reagent	Invitrogen™	15596026
Uridine	Sigma-Aldrich	U3003

8.2. TABLA SUPLEMENTARIA 2. KITS Y ACCESORIOS

KITS COMERCIALES		
NOMBRE COMERCIAL	FABRICANTE	IDENTIFICADOR
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit	Millipore	UFC9030
Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI)	Molecular Probes™	V13245
Direct-zol RNA Miniprep Plus	Zymo Research	R2070
Dynabeads™ Protein G for Immunoprecipitation	Invitrogen™	10009D
E.Z.N.A.® Total RNA I Kit	Omega Bio-Tek	R6834-02
EZ Nucleosomal DNA Prep Kit	Zymo Research	D5220
GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich	PLED35
GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich	NA0150
Histone Extraction Kit	Abcam	ab113476
Invitrogen™ Qubit™ RNA HS Assay Kit	Invitrogen™	Q32852
jetPrime®	Polyplus Transfection™	114-07
Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich	86R
Luminata Crescendo Western HRP	Merck	WBLUR0100
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels	BIO-RAD	4561095S
Mouse Embryonic Stem Cell Kit for SILAC	Thermo Scientific™	88206
Pierce™ Silver Stain Kit	Thermo Scientific™	24612
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems™	A25742
qScript® cDNA SuperMix	Quantabio	95048-025
RIPA Lysis Buffer System	Santa Cruz Biotechnology	sc-24948
Subcelullar Protein Fractionation Kit	Thermo Scientific™,	78840
Thermo Scientific™ Kit de clonación de PCR CloneJET™	Thermo Scientific™	K1231
TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning	Invitrogen™	450641
ACCESORIOS		
NOMBRE COMERCIAL	FABRICANTE	IDENTIFICADOR
0.22µm EMD Millipore Steriflip™	Millipore	SCGP00525

ChIP DNA Clean & Concentrator™ columns	Zymo Research	D5205
Corning™ Centrifuge Tubes with CentriStar™ Cap	Corning™	430791
DynaMag™-2 Magnet	Invitrogen™	12321D
Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes	Sigma	Z666505
Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube	*Falcon®*	352235
Fuji Super RX-N	FUJIFILM	16189949
Immobilon-P PVDF Membrane	Millipore	IPVH00010
Invitrogen™ Qubit™ Assay Tubes	Invitrogen™	Q32856
MicroAMP™ Fast Optical 96-well Reaction Plates	Applied Biosystems™	4346907
NanoDrop™ 2000 Microvolume Spectrophotometer	Thermo Scientific™	ND-2000
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™	4360954
Phasemaker™ Tubes for RNA	Phasemaker™	A33248
Qubit™ 4 Fluorometer	Invitrogen™	Q33226
Refrigerated Universal MPW-260R Centrifuge	MWP	10260R
Tube rotator	VWR	444-0500

8.3. TABLA SUPLEMENTARIA 3. ADN RECOMBINANTES

PLÁSMIDO	FUNCIÓN	ORIGEN	IDENTIF.
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	Pérdida de función-KO	Addgene	#62988
PX459+sgBrd2#1	Pérdida de función-KO	Este estudio	pF1531
PX459+sgBrd2#2	Pérdida de función-KO	Este estudio	pF1532
PX459+sgBrd3#1	Pérdida de función-KO	Este estudio	pF1533
PX459+sgBrd3#2	Pérdida de función-KO	Este estudio	pF1534
PX459+sgBrd4#1	Pérdida de función-KO	Este estudio	pF1535
PX459+sgBrd4#2	Pérdida de función-KO	Este estudio	pF1536
pLKO.pim.shEV	Pérdida de función-KD	Addgene	#32682
pLKO.pim.shLuci	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF150
pLKO.pim.shBrd2#1	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF238
pLKO.pim.shBrd2#2	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF239

pLKO.pim.shBrd3#1	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF240
pLKO.pim.shBrd3#2	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF241
pLKO.pim.shBrd4#1	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF125
pLKO.pim.shBrd4#2	Pérdida de función-KD	Este estudio	pF126
pBASE (Kan)	transposasa	Dr. Jose C. Silva lab (Cambridge Univ., UK)	N/A
PB-CAG-3XFLAG-EV-pA-pgk-hph	Control de sobreexpresión	Dr. Jose C. Silva lab (Cambridge Univ., UK)	N/A
PB-CAG-3xFLAG-Brd2-pgk-hph	Sobreexpresión	Este estudio	pF262
PB-CAG-3xFLAG-Brd3-pgk-hph	Sobreexpresión	Este estudio	pF263
PB-CAG-3xFLAG-Brd4-pgk-hph	Sobreexpresión	Este estudio	pF073
PB-CAG-3xFLAG-Esrrb-pgk-hph	sobreexpresión	Este estudio	pF059
PB-CAG-3xFLAG-Klf2-pgk-hph	sobreexpresión	Este estudio	pF259
PB-CAG-3xFLAG-Nanog-pgk-hph	sobreexpresión	Este estudio	pF1002
PB-CAG-Nanog-pgk-bsd	sobreexpresión	Este estudio	pF966
pHAGE2-EF1aFull-hOct4-F2A-hKlf4-IRES-hSox2-P2A-hcMyc-W-loxP (STEMCCA)	sobreexpresión	Dr. Jianlong Wang lab (Columbia Univ., USA)	N/A
pMD2.G	Generación partículas lentivirales	Addgene	#12259
psPAX2	Generación partículas lentivirales	Addgene	#12260

8.4. TABLA SUPLEMENTARIA 4. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

ANTICUERPO	FUENTE	IDENTIF.
Mouse monoclonal anti-FLAG (M2)	Sigma-Aldrich	F1804
Rabbit polyclonal anti-TET2	Abcam	ab124297
Histone H4R3 Methylation antibody Panel Pack (H4R3me1, H4R3me2a, H4R3me2s, and secondary antibody)	Epigentek	C10019-1
Mouse monoclonal anti-ADAR1 (15.8.6)	Santa Cruz Biotechnology	sc-73408

Mouse monoclonal anti-AIF (E-1)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13116
Mouse monoclonal anti-BRD3 antibody (2088C3a)	Santa Cruz Biotechnology	sc-81202
Mouse monoclonal anti-ENDOG antibody (B-2)	Santa Cruz Biotechnology	sc-365359
Mouse monoclonal Anti-GAPDH antibody (0411)	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724
Mouse monoclonal anti-H4 antibody (F-9)	Santa Cruz Biotechnology	sc-25260
Mouse monoclonal anti-Ki67 antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-23900
Mouse monoclonal anti-KLF4 antibody (56CT5.1.6)	Abcam	ab75486
Mouse monoclonal anti-OCT3/4 Antibody (C-10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-5279
Mouse monoclonal anti-PADI4 antibody (A-11)	Santa Cruz Biotechnology	sc-365369
Mouse monoclonal anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-517348
Mouse monoclonal anti-PRMT1 antibody (B-2)	Santa Cruz Biotechnology	sc-166963
Mouse monoclonal anti-PSPC1 Antibody (C-3)	Santa Cruz Biotechnology	sc-374181
Mouse monoclonal anti-RBP2 (KDM5a) Antibody (G-12)	Santa Cruz Biotechnology	sc-365993
Mouse monoclonal anti-REX1 (ZFP42) antibody (F-1)	Santa Cruz Biotechnology	sc-514643
Mouse monoclonal anti-TRAP-a antibody (C-8)	Santa Cruz Biotechnology	sc-373916
Mouse monoclonal anti-ZNF281 Antibody (D-8)	Santa Cruz Biotechnology	sc-166933
Mouse monoclonal anti-β-Actin antibody	Sigma-Aldrich	A5441
Mouse monoclonal Anti-β-TUBULIN	Santa Cruz Biotechnology	sc-55529
Mouse TrueBlot® ULTRA: anti-Mouse Ig HRP	Rockland Immunochem.	18-8817-33
PerCP-Cy™5.5 Mouse anti-SSEA-1	BD Pharmingen™	561560
Rabbit anti-Nanog antibody, Affinity Purified	Bethyl Laboratories	A300-397A-2
Rabbit monoclonal anti-BRD4 antibody (EPR5150(2))	Abcam	ab128874
Rabbit monoclonal EZH2 (D2C9) XP® mAb	Cell Signalling Technology	#5246
Rabbit polyclonal anti-BRD2 antibody	Bethyl Laboratories	A302-583A

Rabbit polyclonal anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) antibody	Abcam	ab5103
Rabbit polyclonal anti-Histone H3 (tri methyl K4) antibody	Abcam	ab8580
Rabbit polyclonal anti-Histone H3 (tri methyl K9) antibody	Abcam	ab8898
Rabbit polyclonal Anti-Histone H3 antibody	Abcam	ab1791
Rabbit polyclonal anti-Histone H3 antibody	Abcam	ab1791
Rabbit polyclonal anti-KDM1/LSD1 antibody	Abcam	ab17721
Rabbit polyclonal anti-KDM5B antibody	Abcam	ab50958
Rabbit Polyclonal anti-Methylcytosine dioxygenase TET1 antibody	Sigma-Aldrich	09-872
Rabbit polyclonal anti-MTA1 Antibody	Bethyl Laboratories	A300-911A
Rabbit polyclonal anti-NACC1 antibody	Abcam	ab29047
Rabbit polyclonal anti-NANOG antibody	Bethyl Laboratories	A300-397A-2
Rabbit polyclonal anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody	Abcam	ab81299
Rabbit polyclonal anti-SMARCA6 (HELLS) antibody	Abcam	ab3851
Rabbit polyclonal anti-SOX2 Antibody (H-65)	Santa Cruz Biotechnology	sc-20088
Rabbit Polyclonal anti-TET1 antibody	Millipore	09-872
Rabbit polyclonal anti-TET2 antibody	Abcam	ab124297
Rabbit polyclonal anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) Antibody	Sigma-Aldrich	07-449
Rabbit monoclonal anti-WDR5 antibody (EPR11349(B))	Abcam	ab156012

8.5. TABLA SUPLEMENTARIA 5. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich

GEN	SECUENCIA
RT-qPCR	
Actb F	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAG
Actb R	TACGACCAGAGGCATACAGGGACA
Brd2 F	GCTGAGCGGCGGCGGTTCCC
Brd2 R	GTAAAGCTGGTACAGAAGCC

Brd3 F	AGCAGCAGCTCAAAGAGGC
Brd3 R	CATCTTCCGAAGGGGACTG
Brd4 F	CCTCCCAAATGTCTACAACGC
Brd4 R	TGAGCAGATATTGCAGTTGGTT
BrdT F	CAAATTGAGGTCTTAGCAGGAA
BrdT R	GGTCCTGCACTGCTTCATCT
cMyc F	AGGAAGAAATTGATGTGGTG
cMyc R	CTGGATAGTCCTTCCTTGTG
EndOct4 F	TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC
EndOct4 R	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC
EtnI F	GTTAAACCCGAGCGCTGGTTC
EtnI/II R	GCTATAAGGCCCAGAGAGAAATTTC
Gapdh F	TTGATGGCAACAATCTCCAC
Gapdh R	CGTCCCGTAGACAAAATGGT
Hdac2 F	ATGAAGGTGAAGGAGGTCGTA
Hdac2 R	GAGTCAAATTCAAGGGTTGC
hMyc F	CAGATCAGCAACAACCGAAA
hMyc R	GGCCTTTTCATTGTTTTCCA
hOct4 F	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT
hOct4 R	GTGAAGTGAGGGCTCCCATA
Hprt F	TCAGTCAACGGGGGACATAAA
Hprt R	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
Klf4 F	CTGAACAGCAGGGACTGTCA
Klf4 R	GACCTTCTTCCCCTCTTTGG
LINE F	AGTGCAGAGTTCTATCAGACCTTC
LINE R	AACCTACTTGGTCAGGATGGATG
m/h Sox2 F	GCCCTGCAGTACAACTCCAT
m/h Sox2 R	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTA
Cdh1 F	AACAACTGCATGAAGGCGGGAATC
Cdh1 R	CCTGTGCAGCTGGCTCAAATCAAA
mKlf4 F	AACCTTACCACTGTGACTGG
mKlf4 R	AAAAGTGCCTCTTCATGTGT

mOct4 F	CTGAGGGCCAGGCAGGAGCACGAG
mOct4 R	CTGTAGGGAGGGCTTCGGGCACTT
mSox2 F	GGAGTGGAAACTTTTGTCC
mSox2 R	GGGAAGCGTGTACTTATCCT
Padi1 F	TGTGTGCGTGGTAGGTGTG
Padi1 R	TCGAGGGATCGTAGACCATGT
Padi2 F	CCGCCGGGTATGAAATAGTCC
Padi2 R	CGCCGGTGTACTTGACCAC
Padi3 F	CTACAGAGGATTGTGCGTGTG
Padi3 R	AGGAACCGCCCCATAAATGTC
Padi4 F	TCTGCTCCTAAGGGCTACACA
Padi4 R	GTCCAGAGGCCATTTGGAGG
Padi6 F	TGGTAGGCATGGAAATCACCT
Padi6 R	GACGGAGCTAGAGATGTGGAT
Prickle1 F	ACCTGGAGTATGCTGGCAC
Prickle1 R	CACAGTGGATTTTTCCATCCTGA
Prmt1 F	ACCAATGCCTGCCTCATAAAG
Prmt1 R	CGATGTTGAAGTAAGCCACCAG
Pspc1 F	TAACCTGCCCACAGACATCA
Pspc1 R	TGCTCCATGTGTAGCAAAGC
Tcl1 F	GTGTACTTGGATGAGTTTCGTCG
Tcl1 R	TTGCCACATTAAAGGCAGCTC
Tet1 F	ATTGAGGTGGAGAAGTGGG
Tet1 R	GGAGAAGGGTTGGTTTGC
Tet2 F	GAACTATACATCACTGTGCGTCA
Tet2 R	CAGAACCAGGTGACCAATGAGG
shARN	
shBrd2#1 F	CCGGGATTACCATGACATCATTAAACTCGA GTTTAATGATGTCATGGTAATCTTTTTG
shBrd2#1 R	AATTCAAAAAGATTACCATGACATCATTAAA CTCGAGTTTAATGATGTCATGGTAATC
shBrd2#2 F	CCGGCCCGGAAGCCCTACACTATTACTCGA GTAATAGTGTAGGGCTTCCGGGTTTTTG
shBrd2#2 R	AATTCAAAAACCCGGAAGCCCTACACTATT ACTCGAGTAATAGTGTAGGGCTTCCGGG

shBrd3#1 F	CCGGAGCTGAACCTGCCTGATTATCCTCGA GGATAATCAGGCAGGTTCAGCTTTTTTG
shBrd3#1 R	AATTCAAAAAAGCTGAACCTGCCTGATTAT CCTCGAGGATAATCAGGCAGGTTCAGCT
shBrd3#2 F	CCGGCACAGATGATATAGTGCTAATCTCGA GATTAGCACTATATCATCTGTGTTTTTG
shBrd3#2 R	AATTCAAAAACACAGATGATATAGTGCTAA TCTCGAGATTAGCACTATATCATCTGTG
shBrd4#1 F	CCGGGATGTGTTTGAAATGCGCTTTCTCGA GAAAGCGCATTTCAAACACATCTTTTTG
shBrd4#1 R	AATTCAAAAAGATGTGTTTGAAATGCGCTT TCTCGAGAAAGCGCATTTCAAACACATC
shBrd4#2 F	CCGGGCGGCAGCTAAGTCTAGATATCTCGA GATATCTAGACTTAGCTGCCGCTTTTTG
shBrd4#2 R	AATTCAAAAAGCGGCAGCTAAGTCTAGATA TCTCGAGATATCTAGACTTAGCTGCCGC

8.6. TABLA SUPLEMENTARIA 6. SECUENCIAS SGRNAS

Las secuencias fueron obtenidas de la casa comercial Sigma-Aldrich

DIANA	SECUENCIA	FUNCIÓN	LOC. GENÓMICA
sgRNA Brd2#1 (F)	CACCGACGTCTCCGCCAACCGTGTG	Brd2 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (34118583-34118959)
sgRNA Brd2#1 (R)	AAACCACACGGTTGGCGGAGACGTC	Brd2 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (34118583-34118603)
sgRNA Brd2#2 (F)	CACCGCGTCTCCGCCAACCGTGTGT	Brd2 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (34118582-34118959)
sgRNA Brd2#2 (R)	AAACACACACGGTTGGCGGAGACGC	Brd2 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (34118581-34118602)
sgRNA Brd3#1 (F)	CACCGGGACTGCCGGGATCCCCGT	Brd3 KO1 por CRISPR-Cas9	Chr2 (27464052-27464074)
sgRNA Brd3#1 (R)	AAACACGGGGATCCCGGCAGTCCC	Brd3 KO1 por CRISPR-Cas9	Chr2 (27464054-27464075)
sgRNA Brd3#2 (F)	CACCGCAGTTGGTTAGTCTTTCGCC	Brd3 KO por CRISPR-Cas9	Chr2 (27463983-27464004)
sgRNA Brd3#2 (R)	AAACGGCGAAAGACTAACCAACTGC	Brd3 KO1 por CRISPR-Cas9	Chr2 (27463983-

			27464004)
sgRNA Brd4#1 (F)	CACCGATGTCTACGGAGAGCGGCCC	Brd4 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (32229681-32229701)
sgRNA Brd4#1 (R)	AAACGGGCCGCTCTCCGTAGACATC	Brd4 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (32229681-32229701)
sgRNA Brd4#2 (F)	CACCGTGTCTACGGAGAGCGGCCCT	Brd4 KO por CRISPR-Cas9	Crh17 (32229680-32229700)
sgRNA Brd4#2 (R)	AAACAGGGCCGCTCTCCGTAGACAC	Brd4 KO por CRISPR-Cas9	Chr17 (32229679-32229700)

8.7. TABLA SUPLEMENTARIA 7. DATOS TRANSCRIPTÓMICOS OBTENIDOS POR RNA-SEQ

Para clasificar los genes desregulados, se tomaron como referencias una significancia estadística (tTest pValor Corregido<0.05) y un aumento o disminución de dos órdenes de magnitud en los niveles de expresión, clasificándolos como "regulados al alza" (UP: 1006 transcritos) o "regulados a la baja" (DOWN: 2030 transcritos), respectivamente. A continuación, se listan 50 genes pertenecientes a cada clasificación (en orden decreciente de su factor de cambio) y su factor de cambio de expresión (Log2 FPKM media) y su significancia estadística (valor P corregido < 0.05) en muestras tratadas con JQ1 (n=2) en relación con las tratadas con vehículo (DMSO, n=2) expresado como Log2 de FPKM (JQ1/DMSO).

Lista de los 50 genes con mayor aumento de expresión

(genes "UP" de mayor a menor expresión)

Posición	Gen	Valor P Corregido	JQ1/Veh. (Log2 FPKM)
1	*Mylk*	0.0110	5.3422
2	*Nrip3*	0.0002	5.1439
3	*March3*	0.0002	4.8236
4	*Fcgr1*	0.0003	4.7791
5	*Strip2*	0.0007	4.607

6	*Hist2h2bb, Hist2h3b*	0.0002	4.5248
7	*Abhd3*	0.0010	4.1419
8	*Nupr1l*	0.0002	4.0727
9	*Glcci1*	0.0002	4.0596
10	*Fam222a*	0.0002	3.9943
11	*Hist1h1c*	0.0002	3.8847
12	*Pgm2l1*	0.0018	3.7542
13	*Kcnc3*	0.0315	3.7018
14	*Serpini1*	0.0027	3.6292
15	*Nedd9*	0.0002	3.6104
16	*Zkscan16*	0.0036	3.5987
17	*Hlf*	0.0002	3.5811
18	*Kif5c*	0.0002	3.5726
19	*Alcam*	0.0094	3.5508
20	*Pik3r3*	0.0002	3.5391
21	*Abhd15*	0.0002	3.5351
22	*Fmo5*	0.0088	3.4866
23	*Galnt10*	0.0002	3.476
24	*Kctd12*	0.0010	3.4551
25	*Fam71e1*	0.0002	3.42
26	*Hist1h2bc*	0.0005	3.4001
27	*Bmp8a*	0.0002	3.3286
28	*Trim36*	0.0015	3.3235
29	*Trim72*	0.0002	3.3058
30	*Ccno*	0.0002	3.2462
31	*Peg13*	0.0002	3.1988
32	*Hist1h4h*	0.0002	3.1563
33	*Spata33*	0.0002	3.1512
34	*Vgf*	0.0002	3.122
35	*Mafa*	0.0002	3.1164
36	*Gm4858*	0.0023	3.1122
37	*Abtb2*	0.0138	3.0464
38	*Hist1h4i*	0.0044	2.9646
39	*Thrb*	0.0008	2.9642

40	*Fzd4*	0.0244	2.9331
41	*Trim62*	0.0310	2.9232
42	*Tlcd2*	0.0002	2.9171
43	*Ctsk*	0.0094	2.9105
44	*Galr3, Gcat, H1f0*	0.0002	2.9041
45	*Gprin1*	0.0027	2.9031
46	*Fam171b*	0.0003	2.8537
47	*Nanos1*	0.0002	2.8402
48	*2210408F21Rik*	0.0014	2.8357
49	*Tmem74*	0.0034	2.812
50	*Hist1h2bp*	0.0484	2.8112

Lista de los 50 genes con mayor disminución de expresión

(genes "DOWN" de menor a mayor expresión)

Posición	Gen	Valor P Corregido	JQ1/Veh. (Log2 FPKM)
1	*Galnt15*	0.0285	-8.0483
2	*Pax8*	0.0289	-7.329
3	*Egfl6*	0.0479	-7.2834
4	*Abca12*	0.0002	-7.13
5	*Ripply1*	0.0221	-6.7769
6	*Gem*	0.0063	-6.7666
7	*Ntn5*	0.0266	-6.7144
8	*Grb10*	0.0002	-6.6595
9	*Glod5*	0.0393	-6.6304
10	*Tmprss5*	0.0002	-6.6141
11	*Cyp2b23*	0.0002	-6.5452
12	*Wdfy4*	0.0106	-6.3164
13	*Xdh*	0.0002	-6.1701
14	*Car9*	0.0002	-6.1692
15	*Muc20*	0.0023	-6.0483
16	*Tnfrsf9*	0.0082	-5.9845
17	*Alox8*	0.0002	-5.9546

18	*Sgcd*	0.0010	-5.8663
19	*Tigit*	0.0051	-5.7272
20	*Ifitm6*	0.0002	-5.659
21	*Upk3bl*	0.0002	-5.6147
22	*Aoc1*	0.0012	-5.6015
23	*Aire*	0.0002	-5.5396
24	*9430078K24Rik*	0.0139	-5.518
25	*Kcnh6*	0.0432	-5.5034
26	*Cbr2*	0.0039	-5.4924
27	*Ehf*	0.0002	-5.4813
28	*Fmnl1*	0.0002	-5.4624
29	*Ly6c1*	0.0002	-5.4462
30	*Lama3*	0.0002	-5.4116
31	*Col6a3*	0.0002	-5.3894
32	*Hif3a*	0.0002	-5.3622
33	*Alox15*	0.0002	-5.3381
34	*1700029M20Rik*	0.0245	-5.3338
35	*Fmo1*	0.0229	-5.3259
36	*Ston1*	0.0002	-5.3158
37	*Tdgf1*	0.0002	-5.2945
38	*Igfals*	0.0032	-5.2321
39	*Insc*	0.0240	-5.2141
40	*Rgs8*	0.0002	-5.2119
41	*Atg9b*	0.0002	-5.1977
42	*Vill*	0.0002	-5.189
43	*Gdf3*	0.0002	-5.1772
44	*Cd180*	0.0002	-5.167
45	*Htra3*	0.0002	-5.1568
46	*Prss22*	0.0276	-5.1088
47	*Cdh23*	0.0002	-5.1055
48	*M1ap*	0.0002	-5.0948
49	*Edn2*	0.0002	-5.0516
50	*Tspan32*	0.0002	-5.0515

8.8. TABLA SUPLEMENTARIA 8. DATOS PROTEÓMICOS OBTENIDOS POR SILAC-MS

A continuación, se explicitan las 100 proteínas con mayor deslocalización identificadas en cromatina por SILAC-MS.

Lista de las 50 proteínas con mayor presencia en CB (de mayor a menor)

Posición	Proteína	Cobertura	JQ1/DMSO (Log2)
1	Ssr4	11.05	5.690144566
2	Prmt1	9.12	3.913380434
3	Endog	4.42	3.712194508
4	Cirbp	26.74	3.507576678
5	Ywhaq	9.05	3.434126885
6	Anp32b	6.99	2.899002739
7	H1f0	30.41	2.809109317
8	Atp6v1a	10.21	2.636777683
9	Aifm1	9.21	2.412454372
10	Ywhag	13.36	2.113970398
11	Nsf	1.75	2.049325326
12	Vdac1	15.55	1.934815406
13	Hexb	1.87	1.898025332
14	Nanog	26.79	1.897480424
15	Kdm1b	5.85	1.896595212
16	Kdm5a	2.96	1.798585968
17	Mad2l1	7.32	1.744654519
18	Timeless	2.84	1.713775247
19	Lbr	5.59	1.671726285
20	Morc2a	3.30	1.571836573
21	Hist1h1d	52.04	1.570575268
22	Dgcr14	6.47	1.570082702
23	Tjp1	5.10	1.544436945
24	H2afy	70.73	1.48619152
25	Prdm2	1.99	1.456108448
26	Cetn2	15.32	1.40227945
27	Zfp871	3.19	1.314674118
28	Nt5dc2	3.08	1.304637428
29	Klc1	11.99	1.295240121

30	Bag1	10.50	1.248947958
31	H3f3c	67.65	1.233490765
32	Ppp2r5c	5.31	1.224202935
33	Phrf1	3.61	1.211551629
34	Alkbh5	7.85	1.193191963
35	Cebpd	9.33	1.178185298
36	Dynlrb1	16.67	1.171158411
37	Zfp346	7.56	1.151977553
38	Kif5b	15.89	1.147428911
39	Kdm5b	4.75	1.078676095
40	Hadhb	5.20	1.065613236
41	Vcp	21.59	1.063216914
42	Nedd8	17.28	1.041922712
43	Sfpq	30.47	1.039665613
44	H1fx	28.19	1.035745572
45	Ccdc71	2.54	1.01026581
46	Klf4	23.19	1.002506434
47	Slc7a5	2.73	1.000598792
48	Uqcrfs1	8.03	0.999385443
49	Prdx1	56.78	0.994120904
50	Kif2c	2.99	0.979795745

Lista de las 50 proteínas con menor presencia en CB (de menor a mayor)

Posición	Proteína	Cobertura	JQ1/DMSO (Log2)
1	Myh11	8.93	-6.64385619
2	Hspa2	18.96	-6.64385619
3	Hist1h2ba	54.33	-6.64385619
4	Smarca2	7.23	-6.64385619
5	Krt5	11.72	-6.64385619
6	Krt8	10.61	-6.64385619
7	Krt6a	10.85	-6.64385619
8	Actn1	9.02	-6.64385619
9	Krt1	5.97	-6.64385619
10	Ptbp2	18.27	-6.64385619
11	Rbm4b	20.17	-6.64385619
12	Krt73	7.61	-6.64385619
13	Krt79	7.16	-6.64385619

14	Krt42	10.84	-6.64385619
15	Strbp	5.71	-6.64385619
16	Scaf8	3.15	-6.64385619
17	Krt16	8.53	-6.64385619
18	Tead1	10.08	-6.64385619
19	Tia1	18.60	-6.64385619
20	Myo1g	3.81	-6.64385619
21	Fmr1	6.79	-6.64385619
22	Wdr76	10.69	-6.64385619
23	Acot9	7.74	-6.64385619
24	Tpi1	23.95	-6.64385619
25	Serpinb9b	10.61	-6.64385619
26	Dnm2	3.72	-6.64385619
27	Lin7c	13.71	-6.64385619
28	Ints6	15.07	-6.64385619
29	Rpa2	82.86	-6.64385619
30	Tars	3.60	-6.64385619
31	Padi4	5.26	-6.64385619
32	Slc2a1	3.25	-6.64385619
33	Mis18bp1	2.91	-6.64385619
34	Pcbp4	8.44	-6.64385619
35	Fyn	3.73	-6.64385619
36	Ptprj	2.84	-6.64385619
37	Prc1	6.10	-6.64385619
38	Atp2b1	3.11	-6.64385619
39	Ywhah	8.94	-6.64385619
40	Map9	5.84	-6.64385619
41	Fxr1	3.90	-6.64385619
42	Chaf1a	3.40	-6.64385619
43	Cdyl	7.35	-6.64385619
44	Prss1	8.13	-6.64385619
45	Alb	2.14	-6.64385619
46	Ccdc66	1.16	-6.64385619
47	Zfp91	2.65	-6.64385619
48	Hba	10.56	-6.64385619
49	Mgst3	8.50	-6.64385619
50	Hspa4	2.14	-6.64385619

9. LISTA DE ABREVIATURAS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2A: Péptidos autoescindibles 2A

2C: Estado de dos células

2iL: Medio libre de suero con inhibidores de MEK, GSK3 y LIF

aa: Aminoácidos

ACF: Subunidad larga del factor de ensamblaje de cromatina dependiente de ATP

ADNc: ADN complementario

ARNm: ARN mensajero

BET: Bromodominio y dominio extraterminal

BF: Campo claro

bp: Pares de bases

BRD: Bromodominio

BRD4L: BRD4 isoforma Larga

BRD4S: BRD4 isoforma corta

BSP: Bromosporina

Cas9: Proteína asociada a CRISPR 9

CDK: Quinasa dependiente de cliclina

ChIP: Innunoprecipitación de cromatina

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

DAPI: 4 ',6-diamidino-2-fenilindol)

DMSO: Dimetilsulfóxido

EMT: Transición epitelio mesenquimal

EpiLCs: Células troncales del epiblasto intra-implantación

EpiSCs: Células troncales procedentes del epiblasto post-implantación

ERK: Quinasa relacionada con señal extracelular

ESC: Célula troncal embrionarias procedentes de la ICM pre-implantación

ET: Extraterminal

EV: Vector vacío

FA: FGF2 y Acitvin A

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FPKM: Lecturas por millón de kilobases

GFP-: Ausencia de proteína verde fluorescente

GFP: Proteína verde fluorescente

GO: Ontología génica

GSEA: Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3

HAT: Acetiltransferasa de histonas

HDAC: Deacetilasa de histonas

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana

ICM: Masa celular interna

IL-6: Interleucina 6

iPSC: Célula pluripotente inducida

ISWI: Imitación de SWI de *D. melanogaster*

Kac: Residuo de lisina acetilado

KAT: Acetiltransferasa de lisinas

Kb: Kilobases

KDAC: Deacetilasa de lisinas

LIF: Factor inhibidor de leucemia

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MEF: Fibroblasto embrionario murino

MEK: MAPK/ERK quinasa

MET: Transición mesénquimo epitelial

MOZ: Dedo de zinc de la leucemia monocítica.

MS: Espectrometría de masas

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NoRC: Complejo remodelador nucleolar

NSCs: Células troncales neurales

PoliA: Poliadenina

SCR: Reprogramación celular somática

SD: Desviación estándar

SEM: Error estándar de la media

SILAC: Marcaje estable de isótopos por aminoácidos en cultivo celular

TSS: Sitio de iniciación de la transcripción

WICH: Remodelador de cromatina WSTF ISWI

WSTF: Factor de transcripción del síndrome de William

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

10. LISTA DE FIGURAS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Figura I1. Características principales de las PSCs.

Figura I2. Etapas tempranas del desarrollo embrionario.

Figura I3. Medios que permiten la autorrenovación de células pluripotentes recapitulando distintos estados de pluripotencia.

Figura I4. Principales hitos históricos relacionados con la pluripotencia inducida.

Figura I5. Aproximaciones metodológicas para la generación de iPSCs.

Figura I6. Red transcripcional y factores centrales en pluripotencia.

Figura I7. Rutas de señalización extrínsecas que participan en el control del estado celular pluripotente.

Figura I8. Factores epigenéticos y dinámica de establecimiento e interpretación del epigenoma.

Figura I9. Principales interacciones entre la circuitería de transcripción central y reguladores epigenéticos.

Figura I10. Factores epigenéticos principales en la metilación del ADN.

Figura I11. Proteínas involucradas en la regulación de los niveles de marcas de metilación importantes en el estado celular pluripotente.

Figura I12. Esquema de la dinámica de la conformación de la cromatina de acuerdo con el balance entre las actividades KATs/KDACs.

Figura I13. Dinámica de la acetilación de histonas.

Figura I14. Esquema de las distintas trayectorias celulares durante la reprogramación celular somática de MEFs.

Figura I15. Principales barreras en la generación de iPSCs.

Figura I16. Principales aplicaciones de las iPSCs.

Figura I17. Retos que presenta actualmente la aplicación clínica de la tecnología iPSC.

Figura I18. Estructura tridimensional del BRD.

Figura I19. Esquema simplificado del grupo I de proteínas BRD.

Figura I20. Esquema simplificado del grupo II de proteínas BRD.

Figura I21. Esquema simplificado del grupo III de proteínas BRD.

Figura I22. Esquema simplificado del grupo IV de proteínas BRD.

Figura I23. Esquema simplificado del grupo V de proteínas BRD.

Figura I24. Esquema simplificado del grupo VI de proteínas BRD.

Figura I25. Esquema simplificado del grupo VII de proteínas BRD.

Figura I26. Esquema simplificado del grupo VIII de proteínas BRD.

Figura I27. Esquema simplificado del grupo IX de proteínas BRD.

Figura I28. Inhibidores de los BRDs de la familia BET.

Figura I29. Inhibidor de BRDs de amplio espectro.

Figura I30. Otros inhibidores de BRDs.

Figura R1. Caracterización de la presencia de acetilación en células pluripotentes y no pluripotentes

Figura R2. La actividad BRD es necesaria durante la SCR.

Figura R3. Paisaje funcional de las proteínas BRD.

Figura R4. Análisis de los cambios dinámicos temporales de expresión de los genes que codifican proteínas BRD durante la SCR.

Figura R5. Árbol filogenético de dominios BRD en ratón e inhibidores BRD.

Figura R6. Identificación de actividad BRD específica en SCR mediante cribado químico.

Figura R7. La inhibición específica de la actividad BRD de la familia BET compromete la generación de iPSCs.

Figura R8. La inhibición de la actividad BRD de BET no compromete la MET durante reprogramación.

Figura R9. El tratamiento con JQ1 bloquea la reprogramación en estadio pre-iPSC.

Figura R10. El tratamiento con JQ1 impide la reprogramación completa de pre-iPSCs.

Figura R11. La presencia de JQ1 impide el inicio de la transición pre-iPSC a iPSC.

Figura R12. Las pre-iPSCs tratadas con JQ1 no presentan defectos en ciclo celular y viabilidad.

Figura R13. La actividad BRD de BET interviene en la composición de la cromatina de pre-iPSCs.

Figura R14. Cambios en la cromatina dependientes e independientes de actividad transcripcional en presencia de JQ1.

Figura R15. Procesos generales en los que participan las proteínas de la fracción CB afectadas por la presencia de JQ1.

Figura R16. JQ1 conlleva acumulación de daño en el ADN de pre-iPSCs. Figura

Figura R17. JQ1 altera la disponibilidad en la cromatina de factores que la regulan estructuralmente.

Figura R18. JQ1 incrementa la condensación nuclear afectando a la accesibilidad en la cromatina.

Figura R19. La presencia de JQ1 conlleva cambios transcripcionales relacionados con la red de pluripotencia.

Figura R20. La actividad BRD de BET participa en la activación y represión de genes asociados con categorías específicas de procesos biológicos.

Figura R21. JQ1 compromete la regulación transcripcional ejercida por NANOG necesaria para facilitar la adquisición de pluripotencia.

Figura R22. Existencia de funciones redundantes entre BRD3 y BRD4 opuestas a BRD2 a nivel transcripcional en pre-iPSCs.

Figura R23. La pérdida de función de BRD3 y BRD4 compromete la generación de iPSCs.

Figura R24. La ausencia de BRD2 facilita la transición pre-iPSC a iPSC.

Figura R25. Funciones opuestas de BRD2 con respecto a BRD3 y BRD4 en la transición pre-iPSC a iPSC.

Figura R26. Funciones opuestas de BRD2 con respeto a BRD3 y BRD4 en la reprogramación de pre-iPSCs de origen mesenquimal.

Figura R27. El efecto de BET en intermediarios de SCR es recapitulado en ensayos clásicos de SCR de MEF.

Figura R28. La actividad BRD es esencial para el mantenimiento del estado celular pluripotente.

Figura R29. La actividad BRD de BET es esencial para el mantenimiento del estado celular pluripotente.

Figura R30. El mantenimiento de la pluripotencia en iPSCs tratadas con JQ1 es posible mediante las condiciones de cultivo SL+2i.

Figura R31. La ausencia de actividad BRD de BET no puede ser compensada por medio SL+2i en la transición pre-iPSC a iPSC.

Figura R32. BRD3 y BRD4, pero no BRD2, son importantes para el mantenimiento del estado celular pluripotente *naïve*.

11. BIBLIOGRAFÍA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Solter, D. *et al.* Epigenetic mechanisms in early mammalian development. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 69, 11-17, doi:10.1101/sqb.2004.69.11 (2004).
2 Rossant, J. & Tam, P. P. L. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Cell stem cell* 20, 18-28, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.004 (2017).
3 Tarkowski, A. K. Experiments on the Development of Isolated Blastomeres of Mouse Eggs. *Nature* 184, 1286-1287, doi:10.1038/1841286a0 (1959).
4 Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell* 4, 487-492, doi:10.1016/j.stem.2009.05.015 (2009).
5 Kim, S. M. & Kim, J. S. A Review of Mechanisms of Implantation. *Development & reproduction* 21, 351-359, doi:10.12717/dr.2017.21.4.351 (2017).
6 Hackett, J. A. & Surani, M. A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell stem cell* 15, 416-430, doi:10.1016/j.stem.2014.09.015 (2014).
7 Brons, I. G. M. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191-195, doi:10.1038/nature05950 (2007).
8 Smith, A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. 144, 365-373, doi:10.1242/dev.142679 %J Development (2017).
9 Li, M. & Izpisua Belmonte, J. C. Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nature Cell Biology* 20, 382-392, doi:10.1038/s41556-018-0067-6 (2018).
10 Kinoshita, M. *et al.* Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell stem cell*, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.005 (2020).
11 Kinoshita, M. & Smith, A. Pluripotency Deconstructed. 60, 44-52, doi:https://doi.org/10.1111/dgd.12419 (2018).
12 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156, doi:10.1038/292154a0 (1981).
13 Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. 78, 7634-7638, doi:10.1073/pnas.78.12.7634 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (1981).
14 Smith, A. G. & Hooper, M. L. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Developmental biology* 121, 1-9, doi:10.1016/0012-1606(87)90132-1 (1987).
15 Smith, A. G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690, doi:10.1038/336688a0 (1988).
16 Williams, R. L. *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687, doi:10.1038/336684a0 (1988).
17 Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199, doi:10.1038/nature05972 (2007).
18 Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A. & Wilson, V. In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *Cell Reports* 2, 1571-1578, doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.022 (2012).
19 Kojima, Y. *et al.* The Transcriptional and Functional Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak. *Cell stem cell* 14, 107-120, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.014 (2014).

20 Wu, J. *et al.* An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* 521, 316-321, doi:10.1038/nature14413 (2015).
21 Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441, 1061-1067, doi:10.1038/nature04955 (2006).
22 Morgani, S., Nichols, J. & Hadjantonakis, A.-K. The many faces of Pluripotency: in vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Developmental Biology* 17, 7, doi:10.1186/s12861-017-0150-4 (2017).
23 Macfarlan, T. S. *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* 487, 57-63, doi:10.1038/nature11244 (2012).
24 Baker, C. L. & Pera, M. F. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell stem cell* 22, 25-34, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.011 (2018).
25 Li, M. & Belmonte, J. C. I. Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nature Reviews Genetics* 18, 180-191, doi:10.1038/nrg.2016.156 (2017).
26 Briggs, R. & King, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. 38, 455-463, doi:10.1073/pnas.38.5.455 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (1952).
27 King, T. J. & Briggs, R. CHANGES IN THE NUCLEI OF DIFFERENTIATING GASTRULA CELLS, AS DEMONSTRATED BY NUCLEAR TRANSPLANTATION. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 321-325, doi:10.1073/pnas.41.5.321 (1955).
28 Gurdon, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology* 10, 622-640 (1962).
29 Gurdon, J. B., Laskey, R. A. & Reeves, O. R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of embryology and experimental morphology* 34, 93-112 (1975).
30 Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. & Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology* 11, 1553-1558, doi:https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00459-6 (2001).
31 Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 309, 1369-1373, doi:10.1126/science.1116447 (2005).
32 Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000, doi:https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X (1987).
33 Xie, H., Ye, M., Feng, R. & Graf, T. Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell* 117, 663-676, doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00419-2 (2004).
34 Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L. & Graf, T. Reprogramming of Committed T Cell Progenitors to Macrophages and Dendritic Cells by C/EBPα and PU.1 Transcription Factors. *Immunity* 25, 731-744, doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.09.011 (2006).
35 Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D. A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β-cells. *Nature* 455, 627-632, doi:10.1038/nature07314 (2008).
36 Vierbuchen, T. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-1041, doi:10.1038/nature08797 (2010).

37 Ieda, M. *et al.* Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell* 142, 375-386, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.002 (2010).
38 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
39 Yu, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. 318, 1917-1920, doi:10.1126/science.1151526 %J Science (2007).
40 Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861-872, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
41 Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317, doi:10.1038/nature05934 (2007).
42 Maherali, N. *et al.* Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell stem cell* 1, 55-70, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.014 (2007).
43 Wernig, M. *et al.* In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324, doi:10.1038/nature05944 (2007).
44 Boland, M. J. *et al.* Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461, 91-94, doi:10.1038/nature08310 (2009).
45 Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z. & Gao, S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell stem cell* 5, 135-138, doi:10.1016/j.stem.2009.07.001 (2009).
46 Zhao, X.-y. *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461, 86-90, doi:10.1038/nature08267 (2009).
47 Stadtfeld, M., Maherali, N., Borkent, M. & Hochedlinger, K. A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nature Methods* 7, 53-55, doi:10.1038/nmeth.1409 (2010).
48 Patel, M. & Yang, S. Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports* 6, 367-380, doi:10.1007/s12015-010-9123-8 (2010).
49 Anokye-Danso, F. *et al.* Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell stem cell* 8, 376-388, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001 (2011).
50 Sandmaier, S. E. S. & Telugu, B. P. V. L. in *Cell Reprogramming: Methods and Protocols* (eds Paul J. Verma & Huseyin Sumer) 29-36 (Springer New York, 2015).
51 Kim, Y., Jeong, J. & Choi, D. Small-molecule-mediated reprogramming: a silver lining for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine* 52, 213-226, doi:10.1038/s12276-020-0383-3 (2020).
52 Soldner, F. *et al.* Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell* 136, 964-977, doi:10.1016/j.cell.2009.02.013 (2009).
53 Kaji, K. *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775, doi:10.1038/nature07864 (2009).
54 Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770, doi:10.1038/nature07863 (2009).
55 Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan*

Academy. Series B, Physical and biological sciences 85, 348-362, doi:10.2183/pjab.85.348 (2009).

56 Yu, J. *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, N.Y.)* 324, 797-801, doi:10.1126/science.1172482 (2009).

57 Kim, D. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4, 472-476, doi:10.1016/j.stem.2009.05.005 (2009).

58 Warren, L. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7, 618-630, doi:10.1016/j.stem.2010.08.012 (2010).

59 Buganim, Y. *et al.* Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 150, 1209-1222, doi:10.1016/j.cell.2012.08.023 (2012).

60 Apostolou, E. & Hochedlinger, K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 502, 462-471, doi:10.1038/nature12749 (2013).

61 Park, I.-H. *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146, doi:10.1038/nature06534 (2008).

62 Takahashi, K. & Yamanaka, S. A developmental framework for induced pluripotency. 142, 3274-3285, doi:10.1242/dev.114249 %J Development (2015).

63 Smith, Z. D., Sindhu, C. & Meissner, A. Molecular features of cellular reprogramming and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 139-154, doi:10.1038/nrm.2016.6 (2016).

64 Gökbuget, D. & Blelloch, R. Epigenetic control of transcriptional regulation in pluripotency and early differentiation. 146, dev164772, doi:10.1242/dev.164772 %J Development (2019).

65 Boyer, L. A., Mathur, D. & Jaenisch, R. Molecular control of pluripotency. *Current Opinion in Genetics & Development* 16, 455-462, doi:https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.08.009 (2006).

66 Ng, H.-H. & Surani, M. A. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature Cell Biology* 13, 490-496, doi:10.1038/ncb0511-490 (2011).

67 Young, Richard A. Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell* 144, 940-954, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032 (2011).

68 Nichols, J. *et al.* Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95, 379-391, doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9 (1998).

69 Schöler, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. & Gruss, P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *The EMBO journal* 8, 2543-2550, doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08392.x (1989).

70 Niwa, H., Miyazaki, J.-i. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* 24, 372-376, doi:10.1038/74199 (2000).

71 Thomson, M. *et al.* Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145, 875-889, doi:10.1016/j.cell.2011.05.017 (2011).

72 Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17, 126-140, doi:10.1101/gad.224503 (2003).

73 Chew, J. L. *et al.* Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 25, 6031-6046, doi:10.1128/mcb.25.14.6031-6046.2005 (2005).
74 Rodda, D. J. *et al.* Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of biological chemistry* 280, 24731-24737, doi:10.1074/jbc.M502573200 (2005).
75 Mitsui, K. *et al.* The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631-642, doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00393-3 (2003).
76 Chambers, I. *et al.* Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 643-655, doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1 (2003).
77 Chen, X. *et al.* Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* 133, 1106-1117, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.043 (2008).
78 Festuccia, N. *et al.* Esrrb Is a Direct Nanog Target Gene that Can Substitute for Nanog Function in Pluripotent Cells. *Cell stem cell* 11, 477-490, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.08.002 (2012).
79 Yeo, J.-C. *et al.* Klf2 Is an Essential Factor that Sustains Ground State Pluripotency. *Cell stem cell* 14, 864-872, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.015 (2014).
80 Bourillot, P.-Y. & Savatier, P. Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biology* 8, 125, doi:10.1186/1741-7007-8-125 (2010).
81 Morey, L., Santanach, A. & Di Croce, L. Pluripotency and Epigenetic Factors in Mouse Embryonic Stem Cell Fate Regulation. *Molecular and cellular biology* 35, 2716-2728, doi:10.1128/mcb.00266-15 (2015).
82 Jaenisch, R. & Young, R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* 132, 567-582, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015 (2008).
83 Rahl, P. B. *et al.* c-Myc Regulates Transcriptional Pause Release. *Cell* 141, 432-445, doi:10.1016/j.cell.2010.03.030 (2010).
84 Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & development* 12, 2048-2060, doi:10.1101/gad.12.13.2048 (1998).
85 Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460, 118-122, doi:10.1038/nature08113 (2009).
86 Martello, G., Bertone, P. & Smith, A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *The EMBO journal* 32, 2561-2574, doi:10.1038/emboj.2013.177 (2013).
87 Ye, S., Li, P., Tong, C. & Ying, Q. L. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *The EMBO journal* 32, 2548-2560, doi:10.1038/emboj.2013.175 (2013).
88 Chen, C. Y. *et al.* Bcl3 Bridges LIF-STAT3 to Oct4 Signaling in the Maintenance of Naïve Pluripotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33, 3468-3480, doi:10.1002/stem.2201 (2015).
89 Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292, doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X (2003).

90 Kunath, T. *et al.* FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. 134, 2895-2902, doi:10.1242/dev.02880 %J Development (2007).
91 Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. & Dailey, L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes & development* 9, 2635-2645, doi:10.1101/gad.9.21.2635 (1995).
92 Ying, Q.-L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).
93 Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A. & Nichols, J. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* 16, 516-528, doi:10.1038/ncb2965 (2014).
94 Marks, H. *et al.* The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell* 149, 590-604, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.026 (2012).
95 Kim, S.-H. *et al.* ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal. *Stem Cell Research* 13, 1-11, doi:https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.001 (2014).
96 Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 128, 635-638, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006 (2007).
97 Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* 17, 487-500, doi:10.1038/nrg.2016.59 (2016).
98 Roundtree, I. A. & He, C. RNA epigenetics—chemical messages for posttranscriptional gene regulation. *Current Opinion in Chemical Biology* 30, 46-51, doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.024 (2016).
99 Ebrahimi, A. *et al.* Bromodomain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming. *Nature Chemical Biology* 15, 519-528, doi:10.1038/s41589-019-0264-z (2019).
100 Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. & Ramalho-Santos, M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 36-47, doi:10.1038/nrm3036 (2011).
101 Gasser, S. M. Visualizing Chromatin Dynamics in Interphase Nuclei. 296, 1412-1416, doi:10.1126/science.1067703 %J Science (2002).
102 Giadrossi, S., Dvorkina, M. & Fisher, A. G. Chromatin organization and differentiation in embryonic stem cell models. *Current Opinion in Genetics & Development* 17, 132-138, doi:https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.02.012 (2007).
103 Meshorer, E. & Misteli, T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 540-546, doi:10.1038/nrm1938 (2006).
104 Long, H. K., Prescott, S. L. & Wysocka, J. Ever-Changing Landscapes: Transcriptional Enhancers in Development and Evolution. *Cell* 167, 1170-1187, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.018 (2016).
105 Wang, J. *et al.* A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444, 364-368, doi:10.1038/nature05284 (2006).
106 Liang, J. *et al.* Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 10, 731-739, doi:10.1038/ncb1736 (2008).
107 Ho, L. & Crabtree, G. R. Chromatin remodelling during development. *Nature* 463, 474-484, doi:10.1038/nature08911 (2010).

108 Chen, P. B. *et al.* Hdac6 regulates Tip60-p400 function in stem cells. *eLife* 2, e01557, doi:10.7554/eLife.01557 (2013).

109 Fazzio, T. G., Huff, J. T. & Panning, B. An RNAi Screen of Chromatin Proteins Identifies Tip60-p400 as a Regulator of Embryonic Stem Cell Identity. *Cell* 134, 162-174, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.031 (2008).

110 Kagey, M. H. *et al.* Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430-435, doi:10.1038/nature09380 (2010).

111 Jamaladdin, S. *et al.* Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells. 111, 9840-9845, doi:10.1073/pnas.1321330111 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2014).

112 Yuan, P. *et al.* Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes & development* 23, 2507-2520, doi:10.1101/gad.1831909 (2009).

113 Boyer, L. A. *et al.* Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353, doi:10.1038/nature04733 (2006).

114 O'Carroll, D. *et al.* The Polycomb-Group GeneEzh2 Is Required for Early Mouse Development. 21, 4330-4336, doi:10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001 %J Molecular and Cellular Biology (2001).

115 Landeira, D. *et al.* Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nature Cell Biology* 12, 618-624, doi:10.1038/ncb2065 (2010).

116 Leitch, H. G. *et al.* Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 311-316, doi:10.1038/nsmb.2510 (2013).

117 Altun, G., Loring, J. F. & Laurent, L. C. DNA methylation in embryonic stem cells. 109, 1-6, doi:https://doi.org/10.1002/jcb.22374 (2010).

118 Hackett, Jamie A. *et al.* Synergistic Mechanisms of DNA Demethylation during Transition to Ground-State Pluripotency. *Stem cell reports* 1, 518-531, doi:https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.010 (2013).

119 Kim, M. & Costello, J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med* 49, e322, doi:10.1038/emm.2017.10 (2017).

120 Wu, H. & Zhang, Y. Charting oxidized methylcytosines at base resolution. *Nature structural & molecular biology* 22, 656-661, doi:10.1038/nsmb.3071 (2015).

121 Lister, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322, doi:10.1038/nature08514 (2009).

122 Meissner, A. *et al.* Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766-770, doi:10.1038/nature07107 (2008).

123 Kohli, R. M. & Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472-479, doi:10.1038/nature12750 (2013).

124 von Meyenn, F. *et al.* Comparative Principles of DNA Methylation Reprogramming during Human and Mouse In Vitro Primordial Germ Cell Specification. *Developmental Cell* 39, 104-115, doi:https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.015 (2016).

125 Ficz, G. *et al.* FGF signaling inhibition in ESCs drives rapid genome-wide demethylation to the epigenetic ground state of pluripotency. *Cell stem cell* 13, 351-359, doi:10.1016/j.stem.2013.06.004 (2013).

126 Habibi, E. *et al.* Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Two Distinct Interconvertible DNA Methylomes of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell stem cell* 13, 360-369, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.002 (2013).
127 Dawlaty, Meelad M. *et al.* Tet1 Is Dispensable for Maintaining Pluripotency and Its Loss Is Compatible with Embryonic and Postnatal Development. *Cell stem cell* 9, 166-175, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.010 (2011).
128 Koh, K. P. *et al.* Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell stem cell* 8, 200-213, doi:10.1016/j.stem.2011.01.008 (2011).
129 Dawlaty, Meelad M. *et al.* Loss of Tet Enzymes Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Developmental Cell* 29, 102-111, doi:https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.003 (2014).
130 Fidalgo, M. *et al.* Zfp281 Coordinates Opposing Functions of Tet1 and Tet2 in Pluripotent States. *Cell stem cell* 19, 355-369, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.025 (2016).
131 Bernstein, B. E. *et al.* A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* 125, 315-326, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041 (2006).
132 Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature Cell Biology* 8, 532-538, doi:10.1038/ncb1403 (2006).
133 Mikkelsen, T. S. *et al.* Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560, doi:10.1038/nature06008 (2007).
134 Pan, G. *et al.* Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 1, 299-312, doi:10.1016/j.stem.2007.08.003 (2007).
135 Stock, J. K. *et al.* Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nature Cell Biology* 9, 1428-1435, doi:10.1038/ncb1663 (2007).
136 Mattout, A. & Meshorer, E. Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 334-341, doi:https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.02.001 (2010).
137 Ng, H. H., Ciccone, D. N., Morshead, K. B., Oettinger, M. A. & Struhl, K. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: A potential mechanism for position-effect variegation. 100, 1820-1825, doi:10.1073/pnas.0437846100 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2003).
138 Santos-Rosa, H., Bannister, A. J., Dehe, P. M., Géli, V. & Kouzarides, T. Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin. *The Journal of biological chemistry* 279, 47506-47512, doi:10.1074/jbc.M407949200 (2004).
139 Meneghini, M. D., Wu, M. & Madhani, H. D. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* 112, 725-736, doi:10.1016/S0092-8674(03)00123-5 (2003).
140 Sniekers, S. *et al.* Erratum: Genome-wide association meta-analysis of 78,308 individuals identifies new loci and genes influencing human intelligence. *Nature Genetics* 49, 1558-1558, doi:10.1038/ng1017-1558c (2017).
141 Ernst, J. *et al.* Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473, 43-49, doi:10.1038/nature09906 (2011).

142 Li, J., Moazed, D. & Gygi, S. P. Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *The Journal of biological chemistry* 277, 49383-49388, doi:10.1074/jbc.M209294200 (2002).
143 Zaware, N. & Zhou, M.-M. Bromodomain biology and drug discovery. *Nature Structural & Molecular Biology* 26, 870-879, doi:10.1038/s41594-019-0309-8 (2019).
144 Brownell, J. E. & Allis, C. D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current Opinion in Genetics & Development* 6, 176-184, doi:https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)80048-7 (1996).
145 Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352, doi:10.1038/38664 (1997).
146 Wolffe, A. P. Sinful repression. *Nature* 387, 16-17, doi:10.1038/387016a0 (1997).
147 Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 536-550, doi:10.1038/nrm3841 (2014).
148 Verdin, E. & Ott, M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* 16, 258-264, doi:10.1038/nrm3931 (2015).
149 Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R. & Arnesen, T. The world of protein acetylation. *Biochimica et biophysica acta* 1864, 1372-1401, doi:10.1016/j.bbapap.2016.06.007 (2016).
150 Fujisawa, T. & Filippakopoulos, P. Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 246-262, doi:10.1038/nrm.2016.143 (2017).
151 Ramanathan, B. & Smerdon, M. J. Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *The Journal of biological chemistry* 264, 11026-11034 (1989).
152 Piekna-Przybylska, D., Bambara, R. A. & Balakrishnan, L. Acetylation regulates DNA repair mechanisms in human cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15, 1506-1517, doi:10.1080/15384101.2016.1176815 (2016).
153 Balakrishnan, L., Stewart, J., Polaczek, P., Campbell, J. L. & Bambara, R. A. Acetylation of Dna2 endonuclease/helicase and flap endonuclease 1 by p300 promotes DNA stability by creating long flap intermediates. *The Journal of biological chemistry* 285, 4398-4404, doi:10.1074/jbc.m109.086397 (2010).
154 Carter, R. J. & Parsons, J. L. Base excision repair: A pathway regulated by post-translational modifications. MCB.00030-00016, doi:10.1128/MCB.00030-16 %J Molecular and Cellular Biology (2016).
155 Chatterjee, S., Senapati, P. & Kundu, T. K. Post-translational modifications of lysine in DNA-damage repair. *Essays in biochemistry* 52, 93-111, doi:10.1042/bse0520093 (2012).
156 Creyghton, M. P. *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. 107, 21931-21936, doi:10.1073/pnas.1016071107 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2010).
157 Adam, R. C. *et al.* Pioneer factors govern super-enhancer dynamics in stem cell plasticity and lineage choice. *Nature* 521, 366-370, doi:10.1038/nature14289 (2015).
158 Krejcí, J. *et al.* Genome-wide reduction in H3K9 acetylation during human embryonic stem cell differentiation. *Journal of cellular physiology* 219, 677-687, doi:10.1002/jcp.21714 (2009).

159 Qiao, Y., Wang, R., Yang, X., Tang, K. & Jing, N. Dual roles of histone H3 lysine 9 acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *The Journal of biological chemistry* 290, 2508-2520, doi:10.1074/jbc.M114.603761 (2015).
160 Efroni, S. *et al.* Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell stem cell* 2, 437-447, doi:10.1016/j.stem.2008.03.021 (2008).
161 Jurkowska, R. Z. *et al.* H3K14ac is linked to methylation of H3K9 by the triple Tudor domain of SETDB1. *Nature Communications* 8, 2057, doi:10.1038/s41467-017-02259-9 (2017).
162 Taunton, J., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. 272, 408-411, doi:10.1126/science.272.5260.408 %J Science (1996).
163 Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M. & Hrabeta, J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International journal of molecular sciences* 18, doi:10.3390/ijms18071414 (2017).
164 Verdone, L., Agricola, E., Caserta, M. & Di Mauro, E. Histone acetylation in gene regulation. *Briefings in functional genomics & proteomics* 5, 209-221, doi:10.1093/bfgp/ell028 (2006).
165 Gallinari, P., Marco, S. D., Jones, P., Pallaoro, M. & Steinkühler, C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research* 17, 195-211, doi:10.1038/sj.cr.7310149 (2007).
166 Marmorstein, R. Structure of histone acetyltransferases. *Journal of molecular biology* 311, 433-444, doi:10.1006/jmbi.2001.4859 (2001).
167 Yang, X. J. & Seto, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310-5318, doi:10.1038/sj.onc.1210599 (2007).
168 Marmorstein, R. & Roth, S. Y. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 155-161, doi:https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00173-8 (2001).
169 Liang, G., Taranova, O., Xia, K. & Zhang, Y. Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation. *The Journal of biological chemistry* 285, 25516-25521, doi:10.1074/jbc.M110.142059 (2010).
170 Shao, Z. *et al.* The acetyllysine reader BRD3R promotes human nuclear reprogramming and regulates mitosis. *Nature Communications* 7, 10869, doi:10.1038/ncomms10869 (2016).
171 Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, doi:10.1101/cshperspect.a019448 (2015).
172 Buganim, Y. *et al.* The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell stem cell* 15, 295-309, doi:10.1016/j.stem.2014.07.003 (2014).
173 Theunissen, T. W. & Jaenisch, R. Molecular control of induced pluripotency. *Cell stem cell* 14, 720-734, doi:10.1016/j.stem.2014.05.002 (2014).
174 Hou, P. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science (New York, N.Y.)* 341, 651-654, doi:10.1126/science.1239278 (2013).
175 Apostolou, E. & Stadtfeld, M. Cellular trajectories and molecular mechanisms of iPSC reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 52, 77-85, doi:10.1016/j.gde.2018.06.002 (2018).

176 Tran, K. A. *et al.* Defining Reprogramming Checkpoints from Single-Cell Analyses of Induced Pluripotency. *Cell Rep* 27, 1726-1741.e1725, doi:10.1016/j.celrep.2019.04.056 (2019).
177 Schwarz, B. A. *et al.* Prospective Isolation of Poised iPSC Intermediates Reveals Principles of Cellular Reprogramming. *Cell stem cell* 23, 289-305.e285, doi:10.1016/j.stem.2018.06.013 (2018).
178 O'Malley, J. *et al.* High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. *Nature* 499, 88-91, doi:10.1038/nature12243 (2013).
179 Schiebinger, G. *et al.* Optimal-Transport Analysis of Single-Cell Gene Expression Identifies Developmental Trajectories in Reprogramming. *Cell* 176, 928-943.e922, doi:10.1016/j.cell.2019.01.006 (2019).
180 Guo, L. *et al.* Resolving Cell Fate Decisions during Somatic Cell Reprogramming by Single-Cell RNA-Seq. *Molecular cell* 73, 815-829.e817, doi:10.1016/j.molcel.2019.01.042 (2019).
181 Haridhasapavalan, K. K., Raina, K., Dey, C., Adhikari, P. & Thummer, R. P. An Insight into Reprogramming Barriers to iPSC Generation. *Stem Cell Rev Rep* 16, 56-81, doi:10.1007/s12015-019-09931-1 (2020).
182 Zunder, E. R., Lujan, E., Goltsev, Y., Wernig, M. & Nolan, G. P. A continuous molecular roadmap to iPSC reprogramming through progression analysis of single-cell mass cytometry. *Cell stem cell* 16, 323-337, doi:10.1016/j.stem.2015.01.015 (2015).
183 Unternaehrer, J. J. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition factor SNAIL paradoxically enhances reprogramming. *Stem cell reports* 3, 691-698, doi:10.1016/j.stemcr.2014.09.008 (2014).
184 Gingold, J. A. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies opposing functions of Snai1 and Snai2 on the Nanog dependency in reprogramming. *Molecular cell* 56, 140-152, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.014 (2014).
185 Hawkins, K. E. *et al.* NRF2 Orchestrates the Metabolic Shift during Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Cell Rep* 14, 1883-1891, doi:10.1016/j.celrep.2016.02.003 (2016).
186 Kida, Y. S. *et al.* ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. *Cell stem cell* 16, 547-555, doi:10.1016/j.stem.2015.03.001 (2015).
187 Zhou, G., Meng, S., Li, Y., Ghebre, Y. T. & Cooke, J. P. Optimal ROS Signaling Is Critical for Nuclear Reprogramming. *Cell Reports* 15, 919-925, doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.084 (2016).
188 Mathieu, J. & Ruohola-Baker, H. Metabolic remodeling during the loss and acquisition of pluripotency. *Development (Cambridge, England)* 144, 541-551, doi:10.1242/dev.128389 (2017).
189 Liu, X. *et al.* Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT–MET mechanism for optimal reprogramming. *Nature Cell Biology* 15, 829-838, doi:10.1038/ncb2765 (2013).
190 Cacchiarelli, D. *et al.* Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* 162, 412-424, doi:10.1016/j.cell.2015.06.016 (2015).
191 Polo, J. M. *et al.* A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151, 1617-1632, doi:10.1016/j.cell.2012.11.039 (2012).

192 Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. & Hochedlinger, K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell* 2, 230-240, doi:10.1016/j.stem.2008.02.001 (2008).
193 Kim, J. *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. 201103113, doi:10.1073/pnas.1103113108 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2011).
194 Kurian, L. *et al.* Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods* 10, 77-83, doi:10.1038/nmeth.2255 (2013).
195 Zhu, S. *et al.* Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* 508, 93-97, doi:10.1038/nature13020 (2014).
196 Stumpf, P. S. & MacArthur, B. D. Machine Learning of Stem Cell Identities From Single-Cell Expression Data via Regulatory Network Archetypes. *Frontiers in genetics* 10, 2, doi:10.3389/fgene.2019.00002 (2019).
197 Li, D. *et al.* Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming. *Cell stem cell* 21, 819-833.e816, doi:10.1016/j.stem.2017.10.012 (2017).
198 Knaupp, A. S. *et al.* Transient and Permanent Reconfiguration of Chromatin and Transcription Factor Occupancy Drive Reprogramming. *Cell stem cell* 21, 834-845.e836, doi:10.1016/j.stem.2017.11.007 (2017).
199 Chen, J. *et al.* Hierarchical Oct4 Binding in Concert with Primed Epigenetic Rearrangements during Somatic Cell Reprogramming. *Cell Reports* 14, 1540-1554, doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.013 (2016).
200 Chronis, C. *et al.* Cooperative Binding of Transcription Factors Orchestrates Reprogramming. *Cell* 168, 442-459.e420, doi:10.1016/j.cell.2016.12.016 (2017).
201 Soufi, A., Donahue, G. & Zaret, K. S. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151, 994-1004, doi:10.1016/j.cell.2012.09.045 (2012).
202 Narayan, S., Bryant, G., Shah, S., Berrozpe, G. & Ptashne, M. OCT4 and SOX2 Work as Transcriptional Activators in Reprogramming Human Fibroblasts. *Cell Rep* 20, 1585-1596, doi:10.1016/j.celrep.2017.07.071 (2017).
203 Soufi, A. *et al.* Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* 161, 555-568, doi:10.1016/j.cell.2015.03.017 (2015).
204 Yin, Y. *et al.* Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science (New York, N.Y.)* 356, doi:10.1126/science.aaj2239 (2017).
205 Hanna, J. *et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462, 595-601, doi:10.1038/nature08592 (2009).
206 Apostolou, E. *et al.* Genome-wide Chromatin Interactions of the Nanog Locus in Pluripotency, Differentiation, and Reprogramming. *Cell stem cell* 12, 699-712, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.013 (2013).
207 Wei, Z. *et al.* Klf4 Organizes Long-Range Chromosomal Interactions with the Oct4 Locus in Reprogramming and Pluripotency. *Cell stem cell* 13, 36-47, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.010 (2013).
208 Denholtz, M. *et al.* Long-range chromatin contacts in embryonic stem cells reveal a role for pluripotency factors and polycomb proteins in genome organization. *Cell stem cell* 13, 602-616, doi:10.1016/j.stem.2013.08.013 (2013).
209 de Wit, E. *et al.* The pluripotent genome in three dimensions is shaped around pluripotency factors. *Nature* 501, 227-231, doi:10.1038/nature12420 (2013).

210 Stadhouders, R. *et al.* Transcription factors orchestrate dynamic interplay between genome topology and gene regulation during cell reprogramming. *Nature Genetics* 50, 238-249, doi:10.1038/s41588-017-0030-7 (2018).
211 Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K. & Sharp, P. A. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* 169, 13-23, doi:10.1016/j.cell.2017.02.007 (2017).
212 Papp, B. & Plath, K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 152, 1324-1343, doi:10.1016/j.cell.2013.02.043 (2013).
213 Mikkelsen, T. S. *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55, doi:10.1038/nature07056 (2008).
214 Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology* 26, 1269-1275, doi:10.1038/nbt.1502 (2008).
215 Onder, T. T. *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 483, 598-602, doi:10.1038/nature10953 (2012).
216 Cheloufi, S. *et al.* The histone chaperone CAF-1 safeguards somatic cell identity. *Nature* 528, 218-224, doi:10.1038/nature15749 (2015).
217 Zhuang, Q. *et al.* NCoR/SMRT co-repressors cooperate with c-MYC to create an epigenetic barrier to somatic cell reprogramming. *Nature Cell Biology* 20, 400-412, doi:10.1038/s41556-018-0047-x (2018).
218 Roost, M. S. *et al.* DNA methylation and transcriptional trajectories during human development and reprogramming of isogenic pluripotent stem cells. *Nat Commun* 8, 908, doi:10.1038/s41467-017-01077-3 (2017).
219 Chen, J. *et al.* H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nature Genetics* 45, 34-42, doi:10.1038/ng.2491 (2013).
220 Sridharan, R. *et al.* Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1γ in reprogramming to pluripotency. *Nature Cell Biology* 15, 872-882, doi:10.1038/ncb2768 (2013).
221 Chen, J. *et al.* Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nature Genetics* 45, 1504-1509, doi:10.1038/ng.2807 (2013).
222 Jackson, Steven A., Olufs, Zachariah P. G., Tran, Khoa A., Zaidan, Nur Z. & Sridharan, R. Alternative Routes to Induced Pluripotent Stem Cells Revealed by Reprogramming of the Neural Lineage. *Stem cell reports* 6, 302-311, doi:https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.009 (2016).
223 Di Stefano, B. *et al.* C/EBPα creates elite cells for iPSC reprogramming by upregulating Klf4 and increasing the levels of Lsd1 and Brd4. *Nat Cell Biol* 18, 371-381, doi:10.1038/ncb3326 (2016).
224 Liu, L. *et al.* Transcriptional pause release is a rate-limiting step for somatic cell reprogramming. *Cell stem cell* 15, 574-588, doi:10.1016/j.stem.2014.09.018 (2014).
225 Orkin, Stuart H. & Hochedlinger, K. Chromatin Connections to Pluripotency and Cellular Reprogramming. *Cell* 145, 835-850, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.019 (2011).
226 Krijger, Peter Hugo L. *et al.* Cell-of-Origin-Specific 3D Genome Structure Acquired during Somatic Cell Reprogramming. *Cell stem cell* 18, 597-610, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.007 (2016).
227 Beagan, J. A. *et al.* Local Genome Topology Can Exhibit an Incompletely Rewired 3D-Folding State during Somatic Cell Reprogramming. *Cell stem cell* 18, 611-624, doi:10.1016/j.stem.2016.04.004 (2016).

228 Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery* 16, 115-130, doi:10.1038/nrd.2016.245 (2017).
229 Doss, M. X. & Sachinidis, A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells* 8, doi:10.3390/cells8050403 (2019).
230 Cho, C., Duong, T. T. & Mills, J. A. A Mini Review: Moving iPSC-Derived Retinal Subtypes Forward for Clinical Applications for Retinal Degenerative Diseases. *Advances in experimental medicine and biology* 1185, 557-561, doi:10.1007/978-3-030-27378-1_91 (2019).
231 Chiacchiera, F. *et al.* Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/β-Catenin Transcriptional Activity. *Cell stem cell* 18, 91-103, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.019 (2016).
232 Nicetto, D. & Zaret, K. S. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Current Opinion in Genetics & Development* 55, 1-10, doi:https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.013 (2019).
233 Percharde, M. *et al.* A LINE1-Nucleolin Partnership Regulates Early Development and ESC Identity. *Cell* 174, 391-405.e319, doi:10.1016/j.cell.2018.05.043 (2018).
234 Tran, K. A., Dillingham, C. M. & Sridharan, R. Coordinated removal of repressive epigenetic modifications during induced reversal of cell identity. *The EMBO journal* 38, e101681, doi:10.15252/embj.2019101681 (2019).
235 Brumbaugh, J., Di Stefano, B. & Hochedlinger, K. Reprogramming: identifying the mechanisms that safeguard cell identity. *Development (Cambridge, England)* 146, doi:10.1242/dev.182170 (2019).
236 Tapia, N. & Schöler, H. R. Molecular Obstacles to Clinical Translation of iPSCs. *Cell stem cell* 19, 298-309, doi:10.1016/j.stem.2016.06.017 (2016).
237 Garreta, E., Sanchez, S., Lajara, J., Montserrat, N. & Belmonte, J. C. I. Roadblocks in the Path of iPSC to the Clinic. *Current transplantation reports* 5, 14-18, doi:10.1007/s40472-018-0177-x (2018).
238 Huang, C.-Y. *et al.* Human iPSC banking: barriers and opportunities. *Journal of Biomedical Science* 26, 87, doi:10.1186/s12929-019-0578-x (2019).
239 Dhalluin, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496, doi:10.1038/20974 (1999).
240 Smith, S. G. & Zhou, M. M. The Bromodomain: A New Target in Emerging Epigenetic Medicine. *ACS chemical biology* 11, 598-608, doi:10.1021/acschembio.5b00831 (2016).
241 Filippakopoulos, P. *et al.* Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 149, 214-231, doi:10.1016/j.cell.2012.02.013 (2012).
242 Muller, S., Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e29, doi:10.1017/s1462399411001992 (2011).
243 Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 337-356, doi:10.1038/nrd4286 (2014).
244 Tamkun, J. W. *et al.* brahma: A regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF 2 SWI 2. *Cell* 68, 561-572, doi:10.1016/0092-8674(92)90191-E (1992).

245 Owen, D. J. *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p. 19, 6141-6149, doi:https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6141 (2000).
246 Zeng, L. & Zhou, M.-M. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* 513, 124-128, doi:https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03309-9 (2002).
247 Mujtaba, S., Zeng, L. & Zhou, M. M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26, 5521-5527, doi:10.1038/sj.onc.1210618 (2007).
248 Filippakopoulos, P. & Knapp, S. The bromodomain interaction module. *FEBS letters* 586, 2692-2704, doi:10.1016/j.febslet.2012.04.045 (2012).
249 Dancy, B. M. & Cole, P. A. Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chemical reviews* 115, 2419-2452, doi:10.1021/cr500452k (2015).
250 Ortega, E. *et al.* Transcription factor dimerization activates the p300 acetyltransferase. *Nature* 562, 538-544, doi:10.1038/s41586-018-0621-1 (2018).
251 Burley, S. K. & Roeder, R. G. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual review of biochemistry* 65, 769-799, doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.004005 (1996).
252 Avvakumov, N. & Côté, J. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 26, 5395-5407, doi:10.1038/sj.onc.1210608 (2007).
253 Vezzoli, A. *et al.* Molecular basis of histone H3K36me3 recognition by the PWWP domain of Brpf1. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 617-619, doi:10.1038/nsmb.1797 (2010).
254 Ullah, M. *et al.* Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes. *Molecular and cellular biology* 28, 6828-6843, doi:10.1128/mcb.01297-08 (2008).
255 Perez-Campo, F. M., Borrow, J., Kouskoff, V. & Lacaud, G. The histone acetyl transferase activity of monocytic leukemia zinc finger is critical for the proliferation of hematopoietic precursors. *Blood* 113, 4866-4874, doi:10.1182/blood-2008-04-152017 (2009).
256 Panagopoulos, I. *et al.* Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Human Molecular Genetics* 10, 395-404, doi:10.1093/hmg/10.4.395 %J Human Molecular Genetics (2001).
257 Mishima, Y. *et al.* The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood* 118, 2443-2453, doi:10.1182/blood-2011-01-331892 (2011).
258 Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S. & Côté, J. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology* 24, 1884-1896, doi:10.1128/mcb.24.5.1884-1896.2004 (2004).
259 Monden, T. *et al.* p120 acts as a specific coactivator for 9-cis-retinoic acid receptor (RXR) on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/RXR heterodimers. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 13, 1695-1703, doi:10.1210/mend.13.10.0353 (1999).
260 Mashtalir, N. *et al.* Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes. *Cell* 175, 1272-1288.e1220, doi:10.1016/j.cell.2018.09.032 (2018).
261 Dirscherl, S. S. & Krebs, J. E. Functional diversity of ISWI complexes. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82, 482-489, doi:10.1139/o04-044 (2004).

262 Atala, A. Re: CECR2 is involved in spermatogenesis and forms a complex with SNF2H in the testis. *The Journal of urology* 188, 1043-1044, doi:10.1016/j.juro.2012.05.042 (2012).
263 Xiao, A. *et al.* WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457, 57-62, doi:10.1038/nature07668 (2009).
264 Koo, S. J. *et al.* ATAD2 is an epigenetic reader of newly synthesized histone marks during DNA replication. *Oncotarget* 7, 70323-70335, doi:10.18632/oncotarget.11855 (2016).
265 Zou, J. X., Revenko, A. S., Li, L. B., Gemo, A. T. & Chen, H.-W. ANCCA, an estrogen-regulated AAA+ ATPase coactivator for ERα, is required for coregulator occupancy and chromatin modification. 104, 18067-18072, doi:10.1073/pnas.0705814104 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2007).
266 Zou, J. X. *et al.* Androgen-induced coactivator ANCCA mediates specific androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer research* 69, 3339-3346, doi:10.1158/0008-5472.Can-08-3440 (2009).
267 Wu, S. Y. & Chiang, C. M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry* 282, 13141-13145, doi:10.1074/jbc.R700001200 (2007).
268 Rahman, S. *et al.* The Brd4 Extraterminal Domain Confers Transcription Activation Independent of pTEFb by Recruiting Multiple Proteins, Including NSD3. 31, 2641-2652, doi:10.1128/MCB.01341-10 %J Molecular and Cellular Biology (2011).
269 Shen, C. *et al.* NSD3-Short Is an Adaptor Protein that Couples BRD4 to the CHD8 Chromatin Remodeler. *Molecular cell* 60, 847-859, doi:10.1016/j.molcel.2015.10.033 (2015).
270 Zhang, Q. *et al.* Structural Mechanism of Transcriptional Regulator NSD3 Recognition by the ET Domain of BRD4. *Structure (London, England : 1993)* 24, 1201-1208, doi:10.1016/j.str.2016.04.019 (2016).
271 Hnisz, D. *et al.* Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 155, 934-947, doi:10.1016/j.cell.2013.09.053 (2013).
272 Morinière, J. *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664-668, doi:10.1038/nature08397 (2009).
273 Shi, J. *et al.* Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer cell* 25, 210-225, doi:10.1016/j.ccr.2014.01.028 (2014).
274 Schröder, S. *et al.* Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes. *The Journal of biological chemistry* 287, 1090-1099, doi:10.1074/jbc.M111.282855 (2012).
275 Rodriguez, R. M. *et al.* Aberrant epigenetic regulation of bromodomain BRD4 in human colon cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90, 587-595, doi:10.1007/s00109-011-0837-0 (2012).
276 Jain, A. K. & Barton, M. C. Regulation of p53: TRIM24 enters the RING. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 3668-3674, doi:10.4161/cc.8.22.9979 (2009).
277 Sanchez, R. & Zhou, M.-M. The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends in biochemical sciences* 36, 364-372, doi:https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.005 (2011).

278 Zeng, L. *et al.* Structural insights into human KAP1 PHD finger–bromodomain and its role in gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 626-633, doi:10.1038/nsmb.1416 (2008).
279 Ivanov, A. V. *et al.* PHD Domain-Mediated E3 Ligase Activity Directs Intramolecular Sumoylation of an Adjacent Bromodomain Required for Gene Silencing. *Molecular cell* 28, 823-837, doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.012 (2007).
280 Xi, Q. *et al.* A poised chromatin platform for TGF-β access to master regulators. *Cell* 147, 1511-1524, doi:10.1016/j.cell.2011.11.032 (2011).
281 Xue, J. *et al.* Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear β-catenin degradation. *Nat Commun* 6, 6156, doi:10.1038/ncomms7156 (2015).
282 Khetchoumian, K. *et al.* TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *The Journal of biological chemistry* 279, 48329-48341, doi:10.1074/jbc.M404779200 (2004).
283 Gibson, T. J., Ramu, C., Gemünd, C. & Aasland, R. The APECED polyglandular autoimmune syndrome protein, AIRE-1, contains the SAND domain and is probably a transcription factor. *Trends in biochemical sciences* 23, 242-244, doi:10.1016/s0968-0004(98)01231-6 (1998).
284 Granito, A. *et al.* PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis. *The American journal of gastroenterology* 105, 125-131, doi:10.1038/ajg.2009.596 (2010).
285 Seeler, J. S. *et al.* Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Molecular and cellular biology* 21, 3314-3324, doi:10.1128/mcb.21.10.3314-3324.2001 (2001).
286 Bottomley, M. J. *et al.* The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nature structural biology* 8, 626-633, doi:10.1038/89675 (2001).
287 Ansieau, S. & Sergeant, A. [BS69 and RACK7, a potential novel class of tumor suppressor genes]. *Pathologie-biologie* 51, 397-399, doi:10.1016/s0369-8114(03)00019-1 (2003).
288 Wen, H. *et al.* ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature* 508, 263-268, doi:10.1038/nature13045 (2014).
289 Fossey, S. C. *et al.* Identification and characterization of PRKCBP1, a candidate RACK-like protein. *Mamm Genome* 11, 919-925, doi:10.1007/s003350010174 (2000).
290 Malovannaya, A. *et al.* Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell* 145, 787-799, doi:10.1016/j.cell.2011.05.006 (2011).
291 Savitsky, P. *et al.* Multivalent Histone and DNA Engagement by a PHD/BRD/PWWP Triple Reader Cassette Recruits ZMYND8 to K14ac-Rich Chromatin. *Cell Reports* 17, 2724-2737, doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.014 (2016).
292 Yao, N. *et al.* The Structure of the ZMYND8/Drebrin Complex Suggests a Cytoplasmic Sequestering Mechanism of ZMYND8 by Drebrin. *Structure (London, England : 1993)* 25, 1657-1666.e1653, doi:10.1016/j.str.2017.08.014 (2017).
293 Li, D. & Roberts, R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58, 2085-2097, doi:10.1007/pl00000838 (2001).

294 Zeng, L. *et al.* Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association. *Journal of the American Chemical Society* 127, 2376-2377, doi:10.1021/ja044885g (2005).
295 Hewings, D. S. *et al.* Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions. *Journal of medicinal chemistry* 55, 9393-9413, doi:10.1021/jm300915b (2012).
296 Jennings, L. E., Measures, A. R., Wilson, B. G. & Conway, S. J. Phenotypic screening and fragment-based approaches to the discovery of small-molecule bromodomain ligands. *Future medicinal chemistry* 6, 179-204, doi:10.4155/fmc.13.197 (2014).
297 Brand, M. *et al.* Small Molecule Inhibitors of Bromodomain–Acetyl-lysine Interactions. *ACS chemical biology* 10, 22-39, doi:10.1021/cb500996u (2015).
298 Gallenkamp, D., Gelato, K. A., Haendler, B. & Weinmann, H. Bromodomains and their pharmacological inhibitors. *ChemMedChem* 9, 438-464, doi:10.1002/cmdc.201300434 (2014).
299 Romero, F. A. *et al.* Disrupting Acetyl-Lysine Recognition: Progress in the Development of Bromodomain Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 59, 1271-1298, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01514 (2016).
300 Schiedel, M. & Conway, S. J. Small molecules as tools to study the chemical epigenetics of lysine acetylation. *Current Opinion in Chemical Biology* 45, 166-178, doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.06.015 (2018).
301 Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067-1073, doi:10.1038/nature09504 (2010).
302 French, C. A. *et al.* BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer research* 63, 304-307 (2003).
303 Nicodeme, E. *et al.* Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468, 1119-1123, doi:10.1038/nature09589 (2010).
304 Zhang, G. *et al.* Down-regulation of NF-κB transcriptional activity in HIV-associated kidney disease by BRD4 inhibition. *The Journal of biological chemistry* 287, 28840-28851, doi:10.1074/jbc.m112.359505 (2012).
305 Moros, A. *et al.* Synergistic antitumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma. *Leukemia* 28, 2049-2059, doi:10.1038/leu.2014.106 (2014).
306 Wong, C. *et al.* The bromodomain and extra-terminal inhibitor CPI203 enhances the antiproliferative effects of rapamycin on human neuroendocrine tumors. *Cell Death & Disease* 5, e1450-e1450, doi:10.1038/cddis.2014.396 (2014).
307 Riveiro, M. E. *et al.* OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, exhibits antitumor activity in non-small cell and small cell lung cancer models harboring different oncogenic mutations. 7 (2016).
308 Albrecht, B. K. *et al.* Identification of a Benzoisoxazoloazepine Inhibitor (CPI-0610) of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Family as a Candidate for Human Clinical Trials. *Journal of medicinal chemistry* 59, 1330-1339, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01882 (2016).
309 Dawson, M. A. *et al.* Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* 478, 529-533, doi:10.1038/nature10509 (2011).
310 Wyspiańska, B. S. *et al.* BET protein inhibition shows efficacy against JAK2V617F-driven neoplasms. *Leukemia* 28, 88-97, doi:10.1038/leu.2013.234 (2014).

311 Picaud, S. *et al.* PFI-1, a highly selective protein interaction inhibitor, targeting BET Bromodomains. *Cancer research* 73, 3336-3346, doi:10.1158/0008-5472.Can-12-3292 (2013).
312 Odenike, O. *et al.* Results from the first-in-human study of mivebresib (ABBV-075), a pan-inhibitor of bromodomain and extra terminal proteins, in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. 37, 7030-7030, doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7030 (2019).
313 Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904-917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017 (2011).
314 Whyte, Warren A. *et al.* Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes. *Cell* 153, 307-319, doi:10.1016/j.cell.2013.03.035 (2013).
315 Zuber, J. *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478, 524-528, doi:10.1038/nature10334 (2011).
316 Asangani, I. A. *et al.* Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* 510, 278-282, doi:10.1038/nature13229 (2014).
317 Pérez-Salvia, M. & Esteller, M. Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics* 12, 323-339, doi:10.1080/15592294.2016.1265710 (2017).
318 Vidler, L. R., Brown, N., Knapp, S. & Hoelder, S. Druggability analysis and structural classification of bromodomain acetyl-lysine binding sites. *Journal of medicinal chemistry* 55, 7346-7359, doi:10.1021/jm300346w (2012).
319 Wu, Q. *et al.* A chemical toolbox for the study of bromodomains and epigenetic signaling. *Nature Communications* 10, 1915, doi:10.1038/s41467-019-09672-2 (2019).
320 Borah, J. C. *et al.* A small molecule binding to the coactivator CREB-binding protein blocks apoptosis in cardiomyocytes. *Chemistry & biology* 18, 531-541, doi:10.1016/j.chembiol.2010.12.021 (2011).
321 Chekler, E. L. *et al.* Transcriptional Profiling of a Selective CREB Binding Protein Bromodomain Inhibitor Highlights Therapeutic Opportunities. *Chemistry & biology* 22, 1588-1596, doi:10.1016/j.chembiol.2015.10.013 (2015).
322 Picaud, S. *et al.* Generation of a Selective Small Molecule Inhibitor of the CBP/p300 Bromodomain for Leukemia Therapy. *Cancer research* 75, 5106-5119, doi:10.1158/0008-5472.Can-15-0236 (2015).
323 Hay, D. A. *et al.* Discovery and optimization of small-molecule ligands for the CBP/p300 bromodomains. *Journal of the American Chemical Society* 136, 9308-9319, doi:10.1021/ja412434f (2014).
324 Hammitzsch, A. *et al.* CBP30, a selective CBP/p300 bromodomain inhibitor, suppresses human Th17 responses. 201501956, doi:10.1073/pnas.1501956112 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2015).
325 Conery, A. R. *et al.* Bromodomain inhibition of the transcriptional coactivators CBP/EP300 as a therapeutic strategy to target the IRF4 network in multiple myeloma. *eLife* 5, doi:10.7554/eLife.10483 (2016).
326 Taylor, A. M. *et al.* Fragment-Based Discovery of a Selective and Cell-Active Benzodiazepinone CBP/EP300 Bromodomain Inhibitor (CPI-637). *ACS medicinal chemistry letters* 7, 531-536, doi:10.1021/acsmedchemlett.6b00075 (2016).

327 Chen, P. *et al.* Discovery and Characterization of GSK2801, a Selective Chemical Probe for the Bromodomains BAZ2A and BAZ2B. *Journal of medicinal chemistry* 59, 1410-1424, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00209 (2016).
328 Drouin, L. *et al.* Structure enabled design of BAZ2-ICR, a chemical probe targeting the bromodomains of BAZ2A and BAZ2B. *Journal of medicinal chemistry* 58, 2553-2559, doi:10.1021/jm501963e (2015).
329 Moustakim, M. *et al.* Discovery of a PCAF Bromodomain Chemical Probe. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 56, 827-831, doi:10.1002/anie.201610816 (2017).
330 Clark, P. G. *et al.* LP99: Discovery and Synthesis of the First Selective BRD7/9 Bromodomain Inhibitor. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54, 6217-6221, doi:10.1002/anie.201501394 (2015).
331 Martin, L. J. *et al.* Structure-Based Design of an in Vivo Active Selective BRD9 Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* 59, 4462-4475, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01865 (2016).
332 Theodoulou, N. H. *et al.* Discovery of I-BRD9, a Selective Cell Active Chemical Probe for Bromodomain Containing Protein 9 Inhibition. *Journal of medicinal chemistry* 59, 1425-1439, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00256 (2016).
333 Fedorov, O. *et al.* Selective targeting of the BRG/PB1 bromodomains impairs embryonic and trophoblast stem cell maintenance. *Science advances* 1, e1500723, doi:10.1126/sciadv.1500723 (2015).
334 Vangamudi, B. *et al.* The SMARCA2/4 ATPase Domain Surpasses the Bromodomain as a Drug Target in SWI/SNF-Mutant Cancers: Insights from cDNA Rescue and PFI-3 Inhibitor Studies. *Cancer research* 75, 3865-3878, doi:10.1158/0008-5472.Can-14-3798 (2015).
335 Tallant, C. *et al.* Molecular basis of histone tail recognition by human TIP5 PHD finger and bromodomain of the chromatin remodeling complex NoRC. *Structure (London, England : 1993)* 23, 80-92, doi:10.1016/j.str.2014.10.017 (2015).
336 Collins, N. *et al.* An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* 32, 627-632, doi:10.1038/ng1046 (2002).
337 Zhou, Y. *et al.* Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing. *Nature Cell Biology* 11, 1010-1016, doi:10.1038/ncb1914 (2009).
338 Huang, H., Rambaldi, I., Daniels, E. & Featherstone, M. Expression of the Wdr9 gene and protein products during mouse development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 227, 608-614, doi:10.1002/dvdy.10344 (2003).
339 Pattabiraman, S. *et al.* Mouse BRWD1 is critical for spermatid postmeiotic transcription and female meiotic chromosome stability. *Journal of Cell Biology* 208, 53-69, doi:10.1083/jcb.201404109 %J Journal of Cell Biology (2014).
340 Altaf, M. *et al.* NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *The Journal of biological chemistry* 285, 15966-15977, doi:10.1074/jbc.M110.117069 (2010).
341 Obri, A. *et al.* ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* 505, 648-653, doi:10.1038/nature12922 (2014).
342 Rao, R. C. & Dou, Y. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nature reviews. Cancer* 15, 334-346, doi:10.1038/nrc3929 (2015).

343 Milne, T. A. *et al.* MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Molecular cell* 10, 1107-1117, doi:https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00741-4 (2002).
344 Yang, X.-J. MOZ and MORF acetyltransferases: Molecular interaction, animal development and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1818-1826, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.014 (2015).
345 Klein, B. J. *et al.* Bivalent interaction of the PZP domain of BRPF1 with the nucleosome impacts chromatin dynamics and acetylation. *Nucleic Acids Research* 44, 472-484, doi:10.1093/nar/gkv1321 %J Nucleic Acids Research (2015).
346 Feng, Y. *et al.* BRPF3-HBO1 regulates replication origin activation and histone H3K14 acetylation. *The EMBO journal* 35, 176-192, doi:10.15252/embj.201591293 (2016).
347 Belkina, A. C. & Denis, G. V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nature reviews. Cancer* 12, 465-477, doi:10.1038/nrc3256 (2012).
348 Wang, C.-Y. & Filippakopoulos, P. Beating the odds: BETs in disease. *Trends in biochemical sciences* 40, 468-479, doi:https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.06.002 (2015).
349 Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. & Tjian, R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science (New York, N.Y.)* 288, 1422-1425, doi:10.1126/science.288.5470.1422 (2000).
350 Sdelci, S. *et al.* Mapping the chemical chromatin reactivation landscape identifies BRD4-TAF1 cross-talk. *Nature Chemical Biology* 12, 504-510, doi:10.1038/nchembio.2080 (2016).
351 Wang, P. J. & Page, D. C. Functional substitution for TAF II 250 by a retroposed homolog that is expressed in human spermatogenesis. *Human Molecular Genetics* 11, 2341-2346, doi:10.1093/hmg/11.19.2341 %J Human Molecular Genetics (2002).
352 Gong, F. *et al.* Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes & development* 29, 197-211, doi:10.1101/gad.252189.114 (2015).
353 Shen, H. *et al.* Suppression of Enhancer Overactivation by a RACK7-Histone Demethylase Complex. *Cell* 165, 331-342, doi:10.1016/j.cell.2016.02.064 (2016).
354 Guo, R. *et al.* BS69/ZMYND11 reads and connects histone H3.3 lysine 36 trimethylation-decorated chromatin to regulated pre-mRNA processing. *Molecular cell* 56, 298-310, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.022 (2014).
355 Ciró, M. *et al.* ATAD2 Is a Novel Cofactor for MYC, Overexpressed and Amplified in Aggressive Tumors. 0008-5472.CAN-0009-2131, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2131 %J Cancer Research (1909).
356 Revenko, A. S., Kalashnikova, E. V., Gemo, A. T., Zou, J. X. & Chen, H. W. Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark. *Molecular and cellular biology* 30, 5260-5272, doi:10.1128/mcb.00484-10 (2010).
357 Leachman, N. T., Brellier, F., Ferralli, J., Chiquet-Ehrismann, R. & Tucker, R. P. ATAD2B is a phylogenetically conserved nuclear protein expressed during neuronal differentiation and tumorigenesis. *Development, growth & differentiation* 52, 747-755, doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01211.x (2010).

358 Cammas, F. *et al.* Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *Journal of cell science* 115, 3439-3448 (2002).
359 Dupont, S. *et al.* FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGFβ Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. *Cell* 136, 123-135, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.051 (2009).
360 Agricola, E., Randall, R. A., Gaarenstroom, T., Dupont, S. & Hill, C. S. Recruitment of TIF1γ to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Molecular cell* 43, 85-96, doi:10.1016/j.molcel.2011.05.020 (2011).
361 Shang, E., Wang, X., Wen, D., Greenberg, D. A. & Wolgemuth, D. J. Double bromodomain-containing gene Brd2 is essential for embryonic development in mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 908-917, doi:10.1002/dvdy.21911 (2009).
362 Houzelstein, D. *et al.* Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Molecular and cellular biology* 22, 3794-3802, doi:10.1128/mcb.22.11.3794-3802.2002 (2002).
363 You, L., Chen, L., Penney, J., Miao, D. & Yang, X. J. Expression atlas of the multivalent epigenetic regulator Brpf1 and its requirement for survival of mouse embryos. *Epigenetics* 9, 860-872, doi:10.4161/epi.28530 (2014).
364 Tanaka, Y. *et al.* Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein. *Mechanisms of Development* 95, 133-145, doi:https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00360-9 (2000).
365 Yao, T. P. *et al.* Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93, 361-372, doi:10.1016/s0092-8674(00)81165-4 (1998).
366 Xu, W. *et al.* Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nature Genetics* 26, 229-232, doi:10.1038/79973 (2000).
367 Bu, P., Evrard, Y. A., Lozano, G. & Dent, S. Y. R. Loss of Gcn5 Acetyltransferase Activity Leads to Neural Tube Closure Defects and Exencephaly in Mouse Embryos. 27, 3405-3416, doi:10.1128/MCB.00066-07 %J Molecular and Cellular Biology (2007).
368 Bultman, S. *et al.* A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Molecular cell* 6, 1287-1295, doi:10.1016/s1097-2765(00)00127-1 (2000).
369 Reyes, J. C. *et al.* Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *The EMBO journal* 17, 6979-6991, doi:10.1093/emboj/17.23.6979 (1998).
370 Kim, J. & Kaartinen, V. Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 46, 329-333, doi:10.1002/dvg.20401 (2008).
371 Huang, X., Gao, X., Diaz-Trelles, R., Ruiz-Lozano, P. & Wang, Z. Coronary development is regulated by ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling component BAF180. *Developmental biology* 319, 258-266, doi:10.1016/j.ydbio.2008.04.020 (2008).
372 Banting, G. S. *et al.* CECR2, a protein involved in neurulation, forms a novel chromatin remodeling complex with SNF2L. *Human Molecular Genetics* 14, 513-524, doi:10.1093/hmg/ddi048 %J Human Molecular Genetics (2005).

373 Maurice, T. *et al.* Altered Memory Capacities and Response to Stress in p300/CBP-Associated Factor (PCAF) Histone Acetylase Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology* 33, 1584-1602, doi:10.1038/sj.npp.1301551 (2008).
374 Gregory, G. D. *et al.* Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. *Molecular and cellular biology* 27, 8466-8479, doi:10.1128/mcb.00993-07 (2007).
375 Tanaka, Y. *et al.* Dual function of histone H3 lysine 36 methyltransferase ASH1 in regulation of Hox gene expression. *PloS one* 6, e28171, doi:10.1371/journal.pone.0028171 (2011).
376 Lamonica, J. M. *et al.* Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. doi:10.1073/pnas.1102140108 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2011).
377 Stonestrom, A. J. *et al.* Functions of BET proteins in erythroid gene expression. *Blood* 125, 2825-2834, doi:10.1182/blood-2014-10-607309 (2015).
378 Gaucher, J. *et al.* Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *The EMBO journal* 31, 3809-3820, doi:10.1038/emboj.2012.233 (2012).
379 Shang, E., Nickerson, H. D., Wen, D., Wang, X. & Wolgemuth, D. J. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. 134, 3507-3515, doi:10.1242/dev.004481 %J Development (2007).
380 Matzuk, Martin M. *et al.* Small-Molecule Inhibition of BRDT for Male Contraception. *Cell* 150, 673-684, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.045 (2012).
381 Philipps, D. L. *et al.* The dual bromodomain and WD repeat-containing mouse protein BRWD1 is required for normal spermiogenesis and the oocyte–embryo transition. *Developmental biology* 317, 72-82, doi:https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.018 (2008).
382 Singhal, N. *et al.* Chromatin-Remodeling Components of the BAF Complex Facilitate Reprogramming. *Cell* 141, 943-955, doi:10.1016/j.cell.2010.04.037 (2010).
383 Kadoch, C. & Crabtree, G. R. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. *Science advances* 1, e1500447, doi:10.1126/sciadv.1500447 (2015).
384 Ho, L. *et al.* An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is an essential component of the core pluripotency transcriptional network. 106, 5187-5191, doi:10.1073/pnas.0812888106 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2009).
385 Takebayashi, S.-i. *et al.* Murine esBAF chromatin remodeling complex subunits BAF250a and Brg1 are necessary to maintain and reprogram pluripotency-specific replication timing of select replication domains. *Epigenetics & Chromatin* 6, 42, doi:10.1186/1756-8935-6-42 (2013).
386 Kaeser, M. D., Aslanian, A., Dong, M. Q., Yates, J. R., 3rd & Emerson, B. M. BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 32254-32263, doi:10.1074/jbc.M806061200 (2008).
387 Morozumi, Y. *et al.* Atad2 is a generalist facilitator of chromatin dynamics in embryonic stem cells. *Journal of Molecular Cell Biology* 8, 349-362, doi:10.1093/jmcb/mjv060 %J Journal of Molecular Cell Biology (2016).

388 Wu, T., Pinto, H. B., Kamikawa, Y. F. & Donohoe, M. E. The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression. *Stem cell reports* 4, 390-403, doi:10.1016/j.stemcr.2015.01.012 (2015).

389 Di Micco, R. *et al.* Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell Rep* 9, 234-247, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.055 (2014).

390 Costa, Y. *et al.* NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* 495, 370-374, doi:10.1038/nature11925 (2013).

391 Lee, D.-F. *et al.* Combining competition assays with genetic complementation strategies to dissect mouse embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Nature Protocols* 7, 729-748, doi:10.1038/nprot.2012.018 (2012).

392 Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89, 271-277, doi:https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6 (1986).

393 Fuentes-Iglesias, A. *et al.* An Optimized Immunoprecipitation Protocol for Assessing Protein-RNA Interactions In Vitro. *STAR Protocols* 1, 100093, doi:https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100093 (2020).

394 Guallar, D. *et al.* ADAR1-Dependent RNA Editing Promotes MET and iPSC Reprogramming by Alleviating ER Stress. *Cell stem cell* 27, 300-314.e311, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.04.016 (2020).

395 Guallar, D. *et al.* RNA-dependent chromatin targeting of TET2 for endogenous retrovirus control in pluripotent stem cells. *Nature Genetics* 50, 443-451, doi:10.1038/s41588-018-0060-9 (2018).

396 Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324 (2009).

397 Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 47, W256-W259, doi:10.1093/nar/gkz239 %J Nucleic Acids Research (2019).

398 Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R. & Day, I. N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29, E88-88, doi:10.1093/nar/29.17.e88 (2001).

399 Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352 (2009).

400 Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882, doi:10.1093/nar/25.24.4876 %J Nucleic Acids Research (1997).

401 Wu, T., Kamikawa, Y. F. & Donohoe, M. E. Brd4's Bromodomains Mediate Histone H3 Acetylation and Chromatin Remodeling in Pluripotent Cells through P300 and Brg1. *Cell Rep* 25, 1756-1771, doi:10.1016/j.celrep.2018.10.003 (2018).

402 Cieply, B. *et al.* Multiphasic and Dynamic Changes in Alternative Splicing during Induction of Pluripotency Are Coordinated by Numerous RNA-Binding Proteins. *Cell Rep* 15, 247-255, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.025 (2016).

403 Shao, Z. *et al.* Reprogramming by De-bookmarking the Somatic Transcriptional Program through Targeting of BET Bromodomains. *Cell Rep* 16, 3138-3145, doi:10.1016/j.celrep.2016.08.060 (2016).

404 Li, R. *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell* 7, 51-63, doi:10.1016/j.stem.2010.04.014 (2010).
405 Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell stem cell* 7, 64-77, doi:10.1016/j.stem.2010.04.015 (2010).
406 Brambrink, T. *et al.* Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell* 2, 151-159, doi:10.1016/j.stem.2008.01.004 (2008).
407 Silva, J. *et al.* Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS biology* 6, e253, doi:10.1371/journal.pbio.0060253 (2008).
408 Silva, J. *et al.* Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722-737, doi:10.1016/j.cell.2009.07.039 (2009).
409 Yang, J. *et al.* Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell stem cell* 7, 319-328, doi:10.1016/j.stem.2010.06.022 (2010).
410 Kim, E. J. Y. *et al.* BAK/BAX-Mediated Apoptosis Is a Myc-Induced Roadblock to Reprogramming. *Stem cell reports* 10, 331-338, doi:https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.019 (2018).
411 Banito, A. *et al.* Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & development* 23, 2134-2139, doi:10.1101/gad.1811609 (2009).
412 Utikal, J. *et al.* Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145-1148, doi:10.1038/nature08285 (2009).
413 Yang, Z. *et al.* Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Molecular cell* 19, 535-545, doi:10.1016/j.molcel.2005.06.029 (2005).
414 Zhang, M., Yang, C., Liu, H. & Sun, Y. Induced pluripotent stem cells are sensitive to DNA damage. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 11, 320-326, doi:10.1016/j.gpb.2013.09.006 (2013).
415 Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* 18, 85-98, doi:10.1038/cr.2007.115 (2008).
416 Morrison, A. J. *et al.* INO80 and γ-H2AX Interaction Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling to DNA Damage Repair. *Cell* 119, 767-775, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.037 (2004).
417 Young, Lauren M. *et al.* TIMELESS Forms a Complex with PARP1 Distinct from Its Complex with TIPIN and Plays a Role in the DNA Damage Response. *Cell Reports* 13, 451-459, doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.017 (2015).
418 Paull, T. T. *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10, 886-895, doi:https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00610-2 (2000).
419 Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078, doi:10.1038/nature08467 (2009).
420 Garcia, P. L. *et al.* JQ1 Induces DNA Damage and Apoptosis, and Inhibits Tumor Growth in a Patient-Derived Xenograft Model of Cholangiocarcinoma. 17, 107-118, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0922 %J Molecular Cancer Therapeutics (2018).
421 Zhang, J. *et al.* BRD4 facilitates replication stress-induced DNA damage response. *Oncogene* 37, 3763-3777, doi:10.1038/s41388-018-0194-3 (2018).

422 Miller, A. L. *et al.* The BET inhibitor JQ1 attenuates double-strand break repair and sensitizes models of pancreatic ductal adenocarcinoma to PARP inhibitors. *EBioMedicine* 44, 419-430, doi:10.1016/j.ebiom.2019.05.035 (2019).
423 Marión, R. M. *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153, doi:10.1038/nature08287 (2009).
424 Ruiz, S. *et al.* Limiting replication stress during somatic cell reprogramming reduces genomic instability in induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 6, 8036, doi:10.1038/ncomms9036 (2015).
425 Wu, T. *et al.* Histone variant H2A.X deposition pattern serves as a functional epigenetic mark for distinguishing the developmental potentials of iPSCs. *Cell stem cell* 15, 281-294, doi:10.1016/j.stem.2014.06.004 (2014).
426 Gao, Y. & Gao, S. Quality control: H2A.X links to better iPSCs. *Cell stem cell* 15, 259-260, doi:10.1016/j.stem.2014.08.011 (2014).
427 Pal, S. & Sif, S. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. 213, 306-315, doi:https://doi.org/10.1002/jcp.21180 (2007).
428 Tanikawa, C. *et al.* Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53–PADI4 pathway. *Nature Communications* 3, 676, doi:10.1038/ncomms1676 (2012).
429 Fuhrmann, J. & Thompson, P. R. Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. *ACS chemical biology* 11, 654-668, doi:10.1021/acschembio.5b00942 (2016).
430 Christophorou, M. A. *et al.* Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature* 507, 104-108, doi:10.1038/nature12942 (2014).
431 Wang, Y. *et al.* Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylimination. 306, 279-283, doi:10.1126/science.1101400 %J Science (2004).
432 Cuthbert, G. L. *et al.* Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553, doi:10.1016/j.cell.2004.08.020 (2004).
433 Raijmakers, R. *et al.* Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *Journal of molecular biology* 367, 1118-1129, doi:10.1016/j.jmb.2007.01.054 (2007).
434 Molina-Serrano, D., Schiza, V. & Kirmizis, A. Cross-talk among epigenetic modifications: lessons from histone arginine methylation. *Biochemical Society transactions* 41, 751-759, doi:10.1042/bst20130003 (2013).
435 Torres-Padilla, M.-E., Parfitt, D.-E., Kouzarides, T. & Zernicka-Goetz, M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445, 214-218, doi:10.1038/nature05458 (2007).
436 Blanc, R. S. & Richard, S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular cell* 65, 8-24, doi:10.1016/j.molcel.2016.11.003 (2017).
437 Zuo, Z.-y. *et al.* Klf4 methylated by Prmt1 is required for lineage segregation of epiblast and primitive endoderm. 2020.2004.2024.059055, doi:10.1101/2020.04.24.059055 %J bioRxiv (2020).
438 Asaga, H., Nakashima, K., Senshu, T., Ishigami, A. & Yamada, M. Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. 70, 46-51, doi:https://doi.org/10.1189/jlb.70.1.46 (2001).
439 Neeli, I., Khan, S. N. & Radic, M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, 1895-1902, doi:10.4049/jimmunol.180.3.1895 (2008).

440 Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8, 3, doi:10.1186/1756-8935-8-3 (2015).
441 Becker, J. S., Nicetto, D. & Zaret, K. S. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends in genetics : TIG* 32, 29-41, doi:10.1016/j.tig.2015.11.001 (2016).
442 Ayrapetov, M. K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y. & Price, B. D. DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9169-9174, doi:10.1073/pnas.1403565111 (2014).
443 Taniguchi, Y. The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *International journal of molecular sciences* 17, doi:10.3390/ijms17111849 (2016).
444 Borck, P. C., Guo, L. W. & Plutzky, J. BET Epigenetic Reader Proteins in Cardiovascular Transcriptional Programs. *Circulation research* 126, 1190-1208, doi:10.1161/circresaha.120.315929 (2020).
445 Schwarz, B. A., Bar-Nur, O., Silva, J. C. & Hochedlinger, K. Nanog is dispensable for the generation of induced pluripotent stem cells. *Current biology : CB* 24, 347-350, doi:10.1016/j.cub.2013.12.050 (2014).
446 Carter, A. C., Davis-Dusenbery, B. N., Koszka, K., Ichida, J. K. & Eggan, K. Nanog-independent reprogramming to iPSCs with canonical factors. *Stem cell reports* 2, 119-126, doi:10.1016/j.stemcr.2013.12.010 (2014).
447 Sridharan, R. *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364-377, doi:10.1016/j.cell.2009.01.001 (2009).
448 Saunders, A. *et al.* The SIN3A/HDAC Corepressor Complex Functionally Cooperates with NANOG to Promote Pluripotency. *Cell Reports* 18, 1713-1726, doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.055 (2017).
449 Liu, W. *et al.* BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Cell Death & Differentiation* 21, 1950-1960, doi:10.1038/cdd.2014.124 (2014).
450 Horne, G. A. *et al.* Nanog requires BRD4 to maintain murine embryonic stem cell pluripotency and is suppressed by bromodomain inhibitor JQ1 together with Lefty1. *Stem cells and development* 24, 879-891, doi:10.1089/scd.2014.0302 (2015).
451 Finley, L. W. S. *et al.* Pluripotency transcription factors and Tet1/2 maintain Brd4-independent stem cell identity. *Nature Cell Biology* 20, 565-574, doi:10.1038/s41556-018-0086-3 (2018).
452 Mattout, A., Biran, A. & Meshorer, E. Global epigenetic changes during somatic cell reprogramming to iPS cells. *Journal of Molecular Cell Biology* 3, 341-350, doi:10.1093/jmcb/mjr028 %J Journal of Molecular Cell Biology (2011).
453 Shukla, V., Vaissière, T. & Herceg, Z. Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 637, 1-15, doi:https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.012 (2008).
454 Biran, A. & Meshorer, E. in *Stem Cell Epigenetics* Vol. 17 (eds Eran Meshorer & Giuseppe Testa) 207-230 (Academic Press, 2020).
455 Ichida, J. K. *et al.* Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nature Chemical Biology* 10, 632-639, doi:10.1038/nchembio.1552 (2014).
456 Gonzales-Cope, M., Sidoli, S., Bhanu, N. V., Won, K.-J. & Garcia, B. A. Histone H4 acetylation and the epigenetic reader Brd4 are critical regulators of pluripotency in

embryonic stem cells. *BMC Genomics* 17, 95, doi:10.1186/s12864-016-2414-y (2016).
457 Li, X. *et al.* Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell stem cell* 17, 195-203, doi:10.1016/j.stem.2015.06.003 (2015).
458 Floyd, S. R. *et al.* The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature* 498, 246-250, doi:10.1038/nature12147 (2013).
459 Huang, S., Litt, M. & Felsenfeld, G. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes & development* 19, 1885-1893, doi:10.1101/gad.1333905 (2005).
460 Faiola, F. *et al.* NAC1 Regulates Somatic Cell Reprogramming by Controlling Zeb1 and E-cadherin Expression. *Stem cell reports* 9, 913-926, doi:https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.002 (2017).
461 Choi, H. *et al.* Nac1 facilitates pluripotency gene activation for establishing somatic cell reprogramming. *Biochemical and biophysical research communications* 518, 253-258, doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.043 (2019).
462 Lessard, J. A. & Crabtree, G. R. Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 503-532, doi:10.1146/annurev-cellbio-051809-102012 (2010).
463 Ozmadenci, D. *et al.* Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nature Communications* 6, 7398, doi:10.1038/ncomms8398 (2015).
464 Bourque, G. *et al.* Ten things you should know about transposable elements. *Genome biology* 19, 199, doi:10.1186/s13059-018-1577-z (2018).
465 Scotland, K. B., Chen, S., Sylvester, R. & Gudas, L. J. Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 1863-1877, doi:10.1002/dvdy.22037 (2009).
466 Guallar, D. *et al.* Expression of endogenous retroviruses is negatively regulated by the pluripotency marker Rex1/Zfp42. *Nucleic Acids Research* 40, 8993-9007, doi:10.1093/nar/gks686 %J Nucleic Acids Research (2012).
467 Yeh, H.-W. *et al.* PSPC1 mediates TGF-β1 autocrine signalling and Smad2/3 target switching to promote EMT, stemness and metastasis. *Nature Cell Biology* 20, 479-491, doi:10.1038/s41556-018-0062-y (2018).
468 Zhu, H. *et al.* Lsh is involved in de novo methylation of DNA. 25, 335-345, doi:https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600925 (2006).
469 Huang, X. & Wang, J. The extended pluripotency protein interactome and its links to reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development* 28, 16-24, doi:https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.08.003 (2014).
470 Dunican, D. S. *et al.* Lsh regulates LTR retrotransposon repression independently of Dnmt3b function. *Genome biology* 14, R146, doi:10.1186/gb-2013-14-12-r146 (2013).
471 Wang, J. *et al.* The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nature Genetics* 41, 125-129, doi:10.1038/ng.268 (2009).
472 Whyte, W. A. *et al.* Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation. *Nature* 482, 221-225, doi:10.1038/nature10805 (2012).
473 Wang, J. *et al.* Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446, 882-887, doi:10.1038/nature05671 (2007).

474 Ancelin, K. *et al.* Maternal LSD1/KDM1A is an essential regulator of chromatin and transcription landscapes during zygotic genome activation. *eLife* 5, doi:10.7554/eLife.08851 (2016).
475 Macfarlan, T. S. *et al.* Endogenous retroviruses and neighboring genes are coordinately repressed by LSD1/KDM1A. *Genes & development* 25, 594-607, doi:10.1101/gad.2008511 (2011).
476 Yang, F. *et al.* DUX-miR-344-ZMYM2-Mediated Activation of MERVL LTRs Induces a Totipotent 2C-like State. *Cell stem cell* 26, 234-250.e237, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.004 (2020).
477 Wang, W. P. *et al.* The EP300, KDM5A, KDM6A and KDM6B chromatin regulators cooperate with KLF4 in the transcriptional activation of POU5F1. *PloS one* 7, e52556, doi:10.1371/journal.pone.0052556 (2012).
478 Xie, L. *et al.* KDM5B regulates embryonic stem cell self-renewal and represses cryptic intragenic transcription. 30, 1473-1484, doi:https://doi.org/10.1038/emboj.2011.91 (2011).
479 Schmitz, S. U. *et al.* Jarid1b targets genes regulating development and is involved in neural differentiation. *The EMBO journal* 30, 4586-4600, doi:10.1038/emboj.2011.383 (2011).
480 Ang, Y.-S. *et al.* Wdr5 Mediates Self-Renewal and Reprogramming via the Embryonic Stem Cell Core Transcriptional Network. *Cell* 145, 183-197, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.003 (2011).
481 Ghaleb, A. M. & Yang, V. W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene* 611, 27-37, doi:https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.02.025 (2017).
482 Shi, Y. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds. *Cell stem cell* 3, 568-574, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.004 (2008).
483 Bano, D. & Prehn, J. H. M. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine* 30, 29-37, doi:https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016 (2018).
484 Tichy, E. D., Stephan, Z. A., Osterburg, A., Noel, G. & Stambrook, P. J. Mouse embryonic stem cells undergo charontosis, a novel programmed cell death pathway dependent upon cathepsins, p53, and EndoG, in response to etoposide treatment. *Stem Cell Research* 10, 428-441, doi:https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.01.010 (2013).
485 Surface, L. E. *et al.* H2A.Z.1 Monoubiquitylation Antagonizes BRD2 to Maintain Poised Chromatin in ESCs. *Cell Rep* 14, 1142-1155, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.100 (2016).
486 Dong, F. *et al.* Dynamic Changes in Occupancy of Histone Variant H2A.Z during Induced Somatic Cell Reprogramming. *Stem cells international* 2016, 3162363, doi:10.1155/2016/3162363 (2016).
487 Fernandez-Alonso, R. *et al.* Brd4-Brd2 isoform switching coordinates pluripotent exit and Smad2-dependent lineage specification. *EMBO reports* 18, 1108-1122, doi:10.15252/embr.201643534 (2017).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

12. CURRICULUM VITAE

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Tras finalizar mi formación académica de Licenciatura y Máster en la Universidade de Santiago de Compostela (USC), decidí explorar la posibilidad de iniciarme en la carrera investigadora. Por ello, realicé una estancia en el laboratorio de Bioquímica del Linfocito T con el Dr. Francisco Javier Salgado en el CIBUS (USC), en donde me familiaricé durante algo más de un año con técnicas básicas de biología celular y molecular. En el 2016 comencé una nueva etapa como estudiante de doctorado bajo la supervisión del Dr. Miguel Fidalgo y el Dr. Anxo Vidal, realizando mi investigación dentro del grupo de *Stem Cells and Human Diseases* (CiMUS, USC) del Dr. Miguel Fidalgo. Durante esta etapa predoctoral he participado de manera activa en distintos proyectos de investigación desarrollados en el grupo del Dr. Fidalgo y en colaboración. Fruto de mi actividad investigadora realizada hasta el momento he podido contribuir como coautor en 4 publicaciones en revistas prestigiosas de revisión por pares a nivel internacional como *Nature Genetics* y *Cell Stem Cell*. Además, como fruto de mis investigaciones centradas en la función de las proteínas conteniendo bromodominios en reprogramación y pluripotencia, actualmente nos encontramos en las etapas finales de preparación de dos manuscritos para enviar a revisión por pares en los que figuro como primer autor. Durante mi corta carrera investigadora, he adquirido las habilidades necesarias para trabajar de manera independiente con una gran variedad de técnicas celulares y moleculares, así como ómicas y su posterior análisis bioinformático. En definitiva, considero que esta etapa predoctoral me ha proporcionado el bagaje necesario para desarrollar trabajos de investigación de calidad de manera autónoma e independiente.

12.1 Números de identificación

SCOPUS Author ID: 57200853158

Open Researcher and Contributor ID (ORCID): 0000-0002-6700-9611

12.2 Formación académica

Licenciatura en Bioloxía Molecular e Biotecnoloxía (Universidade de Santiago de Compostela) 2012.

Máster Universitario en Investigación Biomédica (Universidade de Santiago de Compostela) 2013.

12.3 Publicaciones científicas

1. Fuentes-Iglesias A, Garcia-Outeiral V, **Pardavila JA**, Wang J, Fidalgo M, Guallar D. An Optimized Immunoprecipitation Protocol for Assessing Protein-RNA Interactions In Vitro. **STAR Protocols**. 2020 Sep 18;1(2):100093. IF: no disponible (revista *open access* de nueva creación del grupo *Cell Press*).

En este trabajo he contribuido a optimizar una novedosa técnica para explorar interacciones proteína-RNA en el emergente campo de las modificaciones químicas del ARN.

2. Guallar D, Fuentes-Iglesias A, Souto Y, Ameneiro C, Freire-Agulleiro O, **Pardavila JA**, Escudero A, Garcia-Outeiral V, Moreira T, Saenz C, Xiong H, Liu D, Xiao S, Hou Y, Wu K, Torrecilla D, Hartner JC, Blanco MG, Lee LJ, López M, Walkley CR, Wang J, Fidalgo M. ADAR1-Dependent RNA Editing Promotes MET and iPSC Reprogramming by Alleviating ER Stress. **Cell Stem Cell**. 2020 Aug 6;27(2):300-314.e11. IF: 21.464 (D1)

En este estudio he participado de manera directa en una gran variedad de aproximaciones experimentales y analíticas (ej. experimentos de reprogramación, análisis de expresión génica y proteica mediante ensayos de RT-qPCR y WB, análisis de microscopía fluorescente y citometría de flujo, así como análisis *in silico* incluyendo GSEA).

3. Seoane-Collazo P, Roa J, Rial-Pensado E, Liñares-Pose L, Beiroa D, Ruíz-Pino F, López-González T, Morgan DA, **Pardavila JA**, Sánchez-Tapia MJ, Martínez-Sánchez N, Contreras C, Fidalgo M, Diéguez C, Coppari R, Rahmouni K, Nogueiras R, Tena-Sempere M, López M.

SF1-Specific AMPKα1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. **Diabetes**. 2018 Nov;67(11):2213-2226. IF: 7.199 (D1)

En este trabajo participé en el diseño y elaboración de nuevos constructos para la experimentos de ganancia de función de las formas salvaje y mutantes de AMPKα1, incluyendo la generación de partículas lentivirales para su utilización en modelo *in vivo* de ratón.

4. Guallar D, Bi X*, **Pardavila JA***, Huang X*, Saenz C, Shi X, Zhou H, Faiola F, Ding J, Haruehanroengra P, Yang F, Li D, Sanchez-Priego C, Saunders A, Pan F, Valdes VJ, Kelley K, Blanco MG, Chen L, Wang H, Sheng J, Xu M, Fidalgo M, Shen X, Wang J. RNA-dependent chromatin targeting of TET2 for endogenous retrovirus control in pluripotent stem cells. **Nature Genetics**. 2018 Mar;50(3):443-451. IF: 25.455 (D1)

En esta publicación en la que figuro con igual contribución en segunda posición, he contribuido de manera directa en el diseño, elaboración y detección por citometría de flujo de nuevos sensores de las modificaciones químicas en el ARN (m5C y hm5C), así como ensayos de IP-CoIP entre otras aproximaciones experimentales tanto a nivel celular como molecular.

12.4 Proyectos

1. PID2019-105739GB-I00. *Impacto del metabolismo y envejecimiento en pluripotencia a través de la regulación epigenética (IMAGINE)*. Agencia Estatal de Investigación (AEI). PI: Miguel Fidalgo (USC). 01/06/2020-31/05/2023.

2. ED431F 2016/016. *Investigando las bases moleculares que regulan los estados alternativos de pluripotencia*. Conselleria de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (Xunta de Galicia). PI: Miguel Fidalgo (USC). 01/01/2016-31/12/2020.

3. BFU2016-80899-P. *Análisis de la acción conjunta de la familia de proteínas "Ten-eleven translocation" y las proteínas con bromo dominios durante la generación de células pluripotentes inducidas*.

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. PI: Miguel Fidalgo (USC). 01/01/2017-31/12/2020.

12.5 Contratos, méritos tecnológicos o de transferencia

1. 01/02/2017-29/04/2017: Investigador en formación en el proyecto "*Investigando las bases moleculares que regulan los estados alternativos de pluripotencia*" Conselleria de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. (USC).

2. 30/04/2017-29/04/2020: Investigador en formación en el proyecto de investigación "*Análisis de la acción conjunta de la familia de proteínas Ten-eleven translocation y las proteínas con bromo dominios durante la generación de células pluripotentes inducidas*" Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. (USC).

3. 2016-2020: Investigador perteneciente al grupo de investigación "*Mecanismos moleculares da enfermidade (MeMoEn)*", con código GI-2119 y adscrito al CiMUS (USC).

12.7 Participación en congresos, simposios y talleres

Hasta la fecha he participado como autor en 20 contribuciones de diseminación de resultados científicos tanto a nivel nacional e internacional. A continuación, se indican los más relevantes:

1. **Pardavila JA**, Garcia-Outeiral V, Fuentes-Iglesias A, Guallar D, Fidalgo M. *BET-Dependent Temporal Regultaion of Chromatin Architecture is a Key Step for Ground Pluripotent State Acquisition***. *II Annual CiMUS Workshop***. Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS). Santiago de Compostela (Spain). 12/07/2019.

2. **Pardavila JA**, Fuentes-Iglesias A, Garcia-Outeiral V, Escudero A, Souto Y, Ameneiro A, Guallar D, Fidalgo M. *BET Family of Proteins Influences Nuclear Reorganization During Somatic Cell Reprogramming.* ***VII Xornada de Investigación***

BIOINTEGRASAUDE 2019. IDIS, INIBIC and IISGS. Santiago de Compostela (*Spain*). 15/05/2019.

3. **Pardavila JA**, Fuentes-Iglesias A, Garcia-Outeiral V, Escudero A, Souto Y, Ameneiro C, Guallar D, Fidalgo M. *BET Family of Proteins Influences Nuclear Reorganization During Somatic Cell Reprogramming*. ***13th EMBL Conference: Transcription and Chromatin. European Molecular Biology Laboratory***. *EMBL*. Heidelberg (*Germany*). 25/08/2018-28/08/2018.

4. **Pardavila JA**, Garcia-Outeiral V, Fuentes-Iglesias A, Fidalgo M. *Bromodomain and Extraterminal Domain Family of Proteins Regulate Cell Reprogramming through Nuclear Reorganization*. ***I Annual CiMUS Workshop***. Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS). Santiago de Compostela (*Spain*). 15/06/2018.

5. **Pardavila JA**. *BET Family of Proteins Influences Nuclear Reorganization During Somatic Cell Reprogramming.* **Programa de conferencias *"Happy Friday"***. *Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases* (CiMUS). Santiago de Compostela (*Spain*). 24/05/2019.

12.8 Participación en cursos y seminarios de formación

1. Seguridad en la utilización de botellas y líquidos criogénicos. 19/04/2016-19/04/2016 (4 horas). Org: Praxair (Praxair-Departamento de Gases Especiales). Loc: Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS).

2. Riesgos laborales en el laboratorio. 19/10/2018-19/10/2018 (4 horas). Org: Universidade de Santiago de Compostela (USC). Loc: Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS).

3. *How to improve your scientific presentations*. 27/09/2019-28/09/2019 (16 horas). Org: Fundación Dr. Antonio Esteve. Loc: Centro Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

4. Publicación de alto impacto en biomedicina. 08/02/2018-08/02/2018 (4 horas). Org: Universidade de Santiago de Compostela (USC). Loc: Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS).

5. *Scientific integrity: How to publish reproducible results*. 23/05/2019-23/05/2019 (4 horas). Org: European Molecular Biology Organization (EMBO). Loc: Centro de Estudios Avanzados (USC).

13. AGRADECIMIENTOS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Decir en primer lugar que les estoy muy agradecido a todas las personas, agentes e instituciones que, de manera directa o indirecta, han hecho posible la elaboración de esta tesis doctoral.

Inmensamente agradecido a mi tutor y director, el doctor Miguel Ángel Fidalgo Pérez, por su participación directa e inestimable y también por su gran paciencia, incansable labor didáctica, entusiasmo contagioso y toda la confianza depositada en mí. Saber y saber enseñar, es saber dos veces. *Para o que queiras veciño*.

Así mismo, agradezco a mi codirector de tesis, el doctor Anxo Vidal Figueroa, su generosidad e interés permanente por mi trabajo, así como el respeto y disponibilidad mostrados en todo momento, incluso antes de comenzar esta etapa. Quiero hacerlo extensible además a todos los miembros de su grupo.

Agradezco también a todo el personal del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), tanto su labor profesional como su siempre positiva actitud y, muchas veces, paciencia.

Quiero mostrar además mi agradecimiento hacia todos los miembros de la Unidad *Stem Cells & Epitranscriptomics* (formada por los grupos de *Stem Cells & Human Diseases* y *Epitranscriptomics & Ageing*) presentes y pasados, especialmente a la doctora Diana Guallar, investigadora principal del grupo hermano, y a los compañeros que han participado de manera más directa en este trabajo: Adriana, Alejandro, Tiago, Vera y Yara. Muchas gracias *cracks*.

Por supuesto, se lo agradezco a la persona que me animó a comenzar esta etapa, a quién está ahí en lo bueno y en lo malo y me acompañó durante un tiempo en lo mejor y lo peor. Muchas gracias, Laura.

Finalmente, tengo que agradecerles a las cuatro personas que más quiero el haber estado ahí siempre, apoyando, confiando y animando en todo momento. A mis padres y hermanas, no tengo palabras para describir mi agradecimiento hacia vosotros. Gracias siempre, por todo.