

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Farmacia

Facultad de Farmacia



TESIS DOCTORAL

**Disecionando el papel de Polycomb en la regulación
de genes bivalentes a través del ciclo celular en células
madre embrionarias**

Helena Gómez Asenjo

Director:
David Landeira Frías

Granada - 2022



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Disecionando el papel de Polycomb en la regulación de genes bivalentes a través del ciclo celular en células madre embrionarias

TESIS DOCTORAL

Universidad de Granada
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II
Facultad de Farmacia

Memoria presentada por

Helena Gómez Asenjo

para optar al grado de

Doctora Internacional por la Universidad de Granada

Programa de Doctorado en Farmacia (B15.56.1)

Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Helena Gómez Asenjo
ISBN: 978-84-1117-475-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/76833>

CRITERIOS DE CALIDAD PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

QUALITY CRITERIA TO APPLY FOR THE DEGREE OF PHD BY THE UNIVERSITY OF GRANADA

- ❖ Publicación en una revista de impacto en el ámbito de conocimiento de la tesis doctoral firmada por el doctorando, que incluya parte de los resultados de la tesis.
Publication in a relevant journal in the field of knowledge of the Doctoral Thesis signed by the doctoral student, which includes part of the results of the Thesis.

Helena G. Asenjo, Amador Gallardo, Lourdes López-Onieva, Irene Tejada, Jordi Martorell-Marugán, Pedro Carmona-Sáez, David Landeira (2020) **Polycomb regulation is coupled to cell cycle transition in pluripotent stem cells**. Science Advances Vol 6, Issue 10. eaay4768. DOI: 10.1126/sciadv.aay4768

Este artículo ha sido publicado en la revista Science Advances (ISSN: 2375-2548), con un factor de impacto en el año 2019 de 13.117 y en el 2020 de 14.143, ocupando la posición 4 de las 128 de la categoría MULTIDISCIPLINARY SCIENCES del Rank title del Journal Citation Reports Science Edition en el año de publicación (2020). Esta revista pertenece al cuartil Q1.

This article has been published in Science Advances (ISSN: 2375-2548), with an impact factor of 13.117 in 2019 and 14.143 in 2020, occupying the 5th position of a total of 72 in the Multidisciplinary Sciences category of Rank title of Journal Citation Reports Science Edition in the year of publication (2020). This journal belongs to Q1 quartile.

CRITERIOS DE CALIDAD PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR CON MENCIÓN INTERNACIONAL POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

QUALITY CRITERIA TO APPLY FOR THE DEGREE OF INTERNATIONAL PHD BY THE UNIVERSITY OF GRANADA

- ❖ Estancia de al menos tres meses en un centro de investigación de prestigio de un país extranjero. *Stay of at least three months in a prestigious research centre in a foreign country.*

Estancia de tres meses en el Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), Colonia, (Alemania), desde el 5 de octubre de 2020 hasta el 5 de enero de 2021 para la realización del proyecto “Análisis funcional de interacciones tridimensionales de cromatina mediadas por Polycomb a través del ciclo celular en células pluripotentes”, supervisado por el Dr. Álvaro Rada-Iglesias. Esta estancia fue financiada por una beca internacional EMBO (número 8777).

Three-month stay at the Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), Cologne, (Germany), from October 5th 2020 to January 5th 2021 to carry out the project " Functional analysis of Polycomb-mediated chromatin looping across cell cycle in pluripotent stem cells", supervised by Dr. Álvaro Rada-Iglesias. This stay was funded by an EMBO Scientific Exchange Grant (number 8777).

- ❖ Informe de la tesis por dos expertas/os doctoras/es pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación no española.

Thesis report by two PhD experts belonging to a non-Spanish higher education institution or research institute.

Experta/*Expert* #1: Ana Isabel Casas Guijarro from University Hospital Essen, Essen, (Germany)

Experto/*Expert* #2: Sara de la Cruz Molina from Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, (Germany)

- ❖ Idioma de presentación de la tesis / *Thesis presentation language.*

Esta tesis ha sido redactada y será defendida en español. Además, siguiendo los requerimientos de la Universidad de Granada, algunas partes aparecen redactadas en inglés (Resumen y Conclusiones). Dichas secciones serán defendidas en inglés.

This Thesis has been written and will be defended in Spanish. In addition, following the requirements of the University of Granada, some parts are also written in English (Abstract and Conclusions). Such sections will be defended in English.

Resumen

Las células madre embrionarias (ESCs) se caracterizan por poseer un potencial de división infinito al mismo tiempo que son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares que componen un organismo adulto. En la última década, numerosos estudios han sugerido que este potencial de las ESCs para diferenciarse varía durante la transición a lo largo del ciclo celular, siendo la fase G1 aquella en la que las células parecen ser más proclives a diferenciarse. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan esta capacidad de diferenciación dependiente de ciclo celular continúan siendo un enigma. Los complejos represores Polycomb (PRCs) son reguladores epigenéticos que reprimen los genes del desarrollo embrionario en ESCs, catalizando modificaciones postraduccionales de histonas e interviniendo en la organización tridimensional de la cromatina. En esta tesis, mostramos que la actividad de los PRCs cambia a lo largo del ciclo celular, dando lugar a variaciones en la organización tridimensional y el estado transcripcional de los genes diana de Polycomb en ESCs de ratón (mESCs). El reclutamiento de PRCs a sus promotores diana está enriquecido en la fase G2 en comparación con las fases S y G1. Esto está acoplado con un aumento de las interacciones tridimensionales entre promotores diana y una reducción de la síntesis de RNA nascente durante S y G2. La eliminación de subunidades de PRCs desestructura esta organización tridimensional y regulación transcripcional dependiente de ciclo. En esta tesis doctoral, propongo que la actividad dinámica de los PRCs a lo largo del ciclo celular establece las bases de un ciclo epigenético que favorece un estado de cromatina resistente a diferenciación durante S y G2, mientras que facilita la salida de pluripotencia y diferenciación celular en fase G1.

Summary

Embryonic stem cells (ESCs) are endorsed with an indefinite cell division potential while being able to differentiate into all cell types that compose an adult organism. Over the last decade, several studies have suggested that the potential of stem cells to differentiate vary during cell cycle transition, being G1 the phase of the cell cycle in which cells seem to be more prone to enter cell differentiation. Importantly, the molecular mechanisms regulating this cell cycle-dependent differentiation ability are unknown. Polycomb repressor complexes (PRCs) are epigenetic regulators that repress developmental genes in ESCs through the catalysis of histone modifications and supporting three-dimensional (3D) organization of chromatin within the cell nucleus. In this thesis, we demonstrate that the activity of PRCs changes during cell cycle transition, leading to variations in chromatin interactions and gene expression of PRC target developmental genes in mouse ESCs. Recruitment of PRCs to target promoters is particularly enriched during G2 as compared to G1 and S phases and it is coupled to higher 3D chromatin interactions and downregulation of target genes. Genetic ablation of different Polycomb subunits interfere with the cell cycle dependent regulation of chromatin organization and RNA synthesis from target promoters. Thus, I propose that the dynamic activity of PRCs across cell cycle is the basis of an epigenetic cycle that favours a chromatin setup that facilitates pluripotency exit and cell differentiation in G1.

Tabla de contenido

Introducción	13
1.- Las células madre embrionarias de ratón (mESCs)	14
1.1.- Origen de las mESCs.....	14
1.2.- Pluripotencia en ESCs.....	17
1.3.-Estados de pluripotencia en mESCs	19
1.4.- Bases moleculares de la pluripotencia.....	21
1.5.- Diferencias entre células madre embrionarias de ratón y humanas.....	24
1.6.-Potenciales aplicaciones en biomedicina	25
2.- Regulación epigenética en mESCs	27
2.1.- Estructura de la cromatina en ESCs	27
2.2.- Mecanismos de regulación epigenética en ESCs	28
2.2.1.- Modificaciones postraduccionales de histonas: la cromatina bivalente	28
2.2.2.- Los complejos represores Polycomb (PRCs).....	31
2.2.2.1.- Composición y actividad de los PRCs en mESCs	32
2.2.2.2.- Reclutamiento de los complejos Polycomb a sus dianas.....	36
2.2.2.3.- Control del establecimiento de dominios Polycomb	39
2.2.2.4.- Polycomb como regulador de la estructura de la cromatina ..	42
2.2.2.5.- Represión transcripcional mediada por Polycomb	43
3.- Epigenética y ciclo celular en mESCs.....	47
3.1.- El ciclo celular pluripotente	47
3.1.1.- Mecanismos de regulación del ciclo celular en mESCs	48
3.2.- Ciclo celular y salida de pluripotencia	51
3.2.1.- Mecanismos que regulan la salida de pluripotencia en G1	54
3.3.- Regulación Polycomb a través del ciclo celular.....	56
3.3.1.- Mantenimiento y propagación de dominios Polycomb tras replicación	57
3.3.2.- Conexión entre regulación Polycomb y ciclo celular	58
Objetivos	61
Resultados	63
Capítulo I	63
Estudio de las bases moleculares de la regulación génica ejercida por PRC2 de manera específica de fase de ciclo celular en mESCs	63
1.- El reclutamiento de Ezh2 a los promotores bivalentes incrementa durante las fases S y G2.....	64

2.- Jarid2 y EPOP muestran patrones de reclutamiento inversos a lo largo del ciclo celular.....	67
3.- La transcripción se reduce y la Ser5-RNAPII se acumula en las dianas de PRC2 durante fase S y G2.....	71
4.- La regulación dependiente de ciclo de PRC2 es especialmente evidente en los promotores de los factores de transcripción asociados a desarrollo embrionario	73
5.- La regulación dependiente de ciclo de PRC2 se ve afectada en mESCs mutantes para Jarid2.....	78
Capítulo II	81
Estudio de las bases moleculares de la regulación génica ejercida por PRC2 de manera específica de fase de ciclo celular en mESCs	81
1.- Ring1b se recluta de forma similar a sus promotores diana durante G1, S y G2.	82
2.- El reclutamiento de Rybp a los promotores diana de Ring1b durante S y G2 está asociado a un incremento de H2AK119ub1 y una mayor represión transcripcional.....	84
3.- La acumulación de Cbx7 en los promotores diana correlaciona con un aumento de las interacciones de los promotores diana en S y G2.	87
4.- Las dianas comunes de PRC2/cPRC1/vPRC1 están enriquecidas en factores de transcripción asociados a desarrollo embrionario y están reguladas a través del ciclo celular de manera más evidente.	91
5.- La eliminación de Ring1b provoca una pérdida de las interacciones tridimensionales de cromatina e induce un aumento de la expresión en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 en G2.	93
Discusión.....	98
1.- El reclutamiento de los PRCs a sus genes dianas está regulado a través del ciclo celular.....	100
2.- La unión diferencial de los PRCs tiene consecuencias en la represión transcripcional de sus genes diana durante el ciclo celular.....	105
3.- La acumulación de cPRC1 en G2 correlaciona con un incremento de las interacciones tridimensionales de cromatina.	110
4.- Los complejos represores Polycomb colaboran para reprimir promotores de factores de transcripción asociados a desarrollo embrionario durante el ciclo celular.....	112
5.- La actividad dinámica de Polycomb establece un ciclo epigenético que favorece un estado de la cromatina compatible con inicio de diferenciación en G1 en ESCs.	114
Conclusiones	118
Conclusions	121

Materiales y métodos	124
1.- Cultivos celulares	125
1.1- Condiciones de cultivo	125
1.2.-Generación de líneas FUCCI y separación por citometría	125
1.3.- Análisis del perfil de ciclo celular con yoduro de propidio	126
2.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	126
2.1.- ChIP-qPCR	128
2.2.- ChIP-seq.....	128
3.- Análisis de expresión génica	128
3.1.- Extracción de RNA Naciente (4sU-seq)	128
3.2.- Retrotranscripción de RNA	129
4.- Análisis de estructura tridimensional de cromatina	129
4.1.- 4C-seq	129
4.2.- Capture-C.....	131
5.- Análisis bioinformático	132
5.1.- Clasificación de promotores	132
5.2.- ChIP	133
5.3.- 4sU-seq	133
5.4.- 4C	134
5.5.- Capture-C.....	134
5.6.- Análisis estadístico	135
6.- Western Blot.....	135
6.1.- Extractos totales de proteína.....	135
6.2.- Subfraccionamiento celular	136
Anexos	138
Anexo I. Resultados: Capítulo I.	139
Anexo II. Resultados: Capítulo II.	142
Anexo III. Materiales y métodos	143
Abreviaturas	147
Referencias	149

Introducción

1.- Las células madre embrionarias de ratón (mESCs)

1.1.- Origen de las mESCs

Los estudios con células madre embrionarias (*embryonic stem cells*, ESCs) tienen su origen en los teratocarcinomas, tumores malignos que se caracterizan por la presencia de múltiples tejidos diferenciados asociados, a su vez, a células indiferenciadas. En 1964, un estudio pionero permitió elucidar que estas células indiferenciadas, conocidas como células de carcinoma embrionario (*embryonal carcinoma cells*, ECCs), eran capaces de generar todos los tipos celulares constitutivos del tumor y proliferar indefinidamente tras ser inyectadas en ratones (BelagKleinsmith and Pierce, 1964). En la década de 1970 se comenzó a poner a punto la metodología para cultivar las ECCs *in vitro* a partir de explantes de teratocarcinomas (Kahan and Ephrussi, 1970), lo que promovió el desarrollo de condiciones de cultivo que permitieron el mantenimiento de la pluripotencia de estas células (Martin, 1975) y que pusieron de manifiesto su capacidad para formar estructuras denominadas cuerpos embrioides, las cuales, presentaban propiedades de diferenciación similares a los embriones tempranos (Martin and Evans, 1975). A pesar de que la similitud de las ECCs con las células del embrión temprano seguía siendo cuestionable, en 1981 dos laboratorios independientes consiguieron derivar líneas celulares embrionarias a partir de blastocistos de ratón empleando las mismas condiciones de cultivo que ya habían sido optimizadas para la expansión de las ECCs (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Esto impulsó grandes avances en el campo de la biología del desarrollo y convirtió a las ESCs en un modelo esencial para estudiar las primeras etapas del desarrollo embrionario en mamíferos.

Las células madre embrionarias de ratón (*mouse embryonic stem cells*, mESCs) derivan del blastocisto preimplantacional de ratón. Tras la fertilización del ovocito, el embrión comienza un proceso de 5 días de duración en el que se suceden una serie de divisiones y eventos de diferenciación que lo prepararán para que implante en el útero materno (Figura 1.1A). Este periodo comienza con la segmentación del cigoto en blastómeros, que se dividen exponencialmente hasta conformar la mórula. A continuación, el primer evento de diferenciación tiene lugar: las células situadas en la periferia de la mórula se diferencian a trofoblasto (*trophoblast*, TE), mientras

que las situadas en el interior dan lugar a la masa celular interna (*inner cell mass*, ICM) (Johnson and Ziomek, 1981) de la que es posible derivar las mESCs para su cultivo *in vitro* y que aparece embebida en una cavidad acuosa conocida como blastocele. Esta estructura embrionaria con capacidad de implantar posteriormente en el útero materno es conocida como blastocisto y comienza a visualizarse con claridad a partir de los 3.5 días postfertilización o estadio 3.5 (E3.5). El segundo evento de diferenciación se produce a partir de la ICM en el E4 dando lugar a dos poblaciones de células: el epiblasto (*epiblast*, EPI) y el endodermo primitivo (*primitive endoderm*, PrE). A pesar de que inicialmente algunos estudios sugirieron que esta segunda diferenciación también se basaba en un “modelo de polarización” dependiente de la posición de las células dentro de la ICM (Enders et al., 1978; Rossant, 1975), estudios más recientes han demostrado que sigue un patrón conocido como “*salt and pepper*” (sal y pimienta) en el que las células precursoras del PrE y del EPI aparecen intercaladas dentro de la masa celular interna (Chazaud et al., 2006; Rossant et al., 2003), antes de que estas dos poblaciones se separen en dos capas independientes (Meilhac et al., 2009; Plusa et al., 2008). Mientras que las células del TE y el PrE dan lugar a la formación del tejido extraembrionario (placenta y saco vitelino, respectivamente), las células del EPI permanecen pluripotentes y, por tanto, son capaces de diferenciarse a células pertenecientes a los tres linajes celulares (ectodermo, mesodermo y endodermo) que conformarán el futuro embrión.

Cada uno de los tipos celulares que constituyen el blastocisto en todos sus estadios, se caracteriza por la expresión de programas de transcripción específicos (Figura 1.1B). Las células del TE pueden distinguirse por la expresión del factor de transcripción *Cdx2* cuya activación induce la expresión de otros genes específicos de trofotodermo como son *Eomes*, *Itga7* y *Cdh3* (Niwa et al., 2005; Strumpf et al., 2005). Por su parte, las células de la ICM pueden distinguirse por la expresión del factor de pluripotencia *Oct4*, el cual reprime la actividad de *Cdx2* en estas células (Niwa et al., 2005), lo que permite la segregación de ambas poblaciones. Tras la diferenciación de la ICM a EPI y PrE, cada uno de los tejidos mantiene la expresión de una serie de marcadores específicos que inhiben la actividad de los marcadores del tejido opuesto. De este modo, el gen *Nanog* permanece expresado exclusivamente en las células destinadas a EPI, inhibiendo en éstas la expresión del marcador específico de PrE *Gata6* (Chazaud et al., 2006). Esta actividad complementaria es lo que permite

observar en E3.5 un patrón de “*salt and pepper*” en la expresión de ambas proteínas dentro de la ICM (Figura 1.1A). La expresión de *Gata6* en las células de PrE promueve la expresión de otros genes específicos de endodermo primitivo como *Pdgfra*, *Sox17*, *Gata4*, *Sox7* y *Hnf4*. (Arceci et al., 1993; Artus et al., 2010; Artus et al., 2011; Bessonard et al., 2014; Duncan et al., 1994; Rossant et al., 2003; Saiz et al., 2016). En la ICM y en el EPI los genes *Oct4*, *Nanog* y *Sox2* han sido descritos como esenciales para el mantenimiento del estado pluripotente de estas células (Martin et al., 2004; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998) por lo que se sitúan en el centro de la red de factores de transcripción de pluripotencia (Avilion et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998; Wicklow et al., 2014).

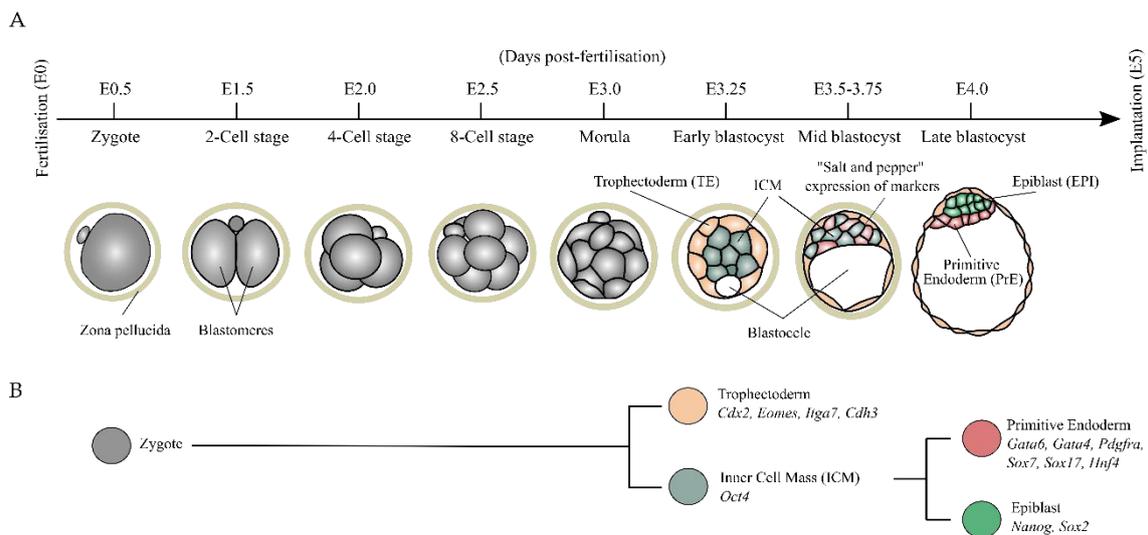


Figura 1.1.- Estadios del desarrollo embrionario temprano de ratón. A) Esquema del proceso de desarrollo preimplantacional del embrión de ratón. Tras la fertilización, el cigoto (E0.5) sufre una serie de rondas de división celular que llevarán a la formación de la mórula (E3.0). Posteriormente, las células de la mórula se diferencian a trofectodermo (naranja, TE) y a células de la masa celular interna (azul, ICM) dando lugar a la estructura embrionaria conocida como blastocisto (E3.25-3.5). A continuación, las células de la ICM se diferencian a células del epiblasto (verde) y del endodermo primitivo (rojo) siguiendo un patrón de “*salt and pepper*”, originando el blastocisto tardío (E4), que será posteriormente capaz de implantar en el útero materno. Se muestra en la línea temporal superior el estadio (E) en días post-fertilización. Figura adaptada de (Saiz and Plusa, 2013) **B)** Representación esquemática de los linajes celulares por los que van transicionando las células del embrión temprano en los diferentes estadios del desarrollo preimplantacional. Los colores se corresponden con las células representadas en la figura 1.1A. Se indican los marcadores específicos más representativos de cada uno de los linajes.

En términos generales, se hace referencia a las mESCs como aquellas células derivadas de la ICM del blastocisto intermedio en E3.5-4 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), ya que la facilidad para trabajar con los blastocistos de ratón en este estadio lo hace el punto de partida ideal y, por tanto, el más extendido. Sin embargo,

también ha sido posible derivar estas células a partir de blastómeros únicos (Chung et al., 2006) o mediante la disociación de la mórula (Eistetter, 1989) e, incluso, a partir de células del epiblasto postimplantacional en E5.5 (*epiblast embryonic stem cells*, EpiESCs) a través de reprogramación epigenética hasta mESCs bajo condiciones apropiadas de cultivo (Bao et al., 2009). Esto plantea un debate acerca del origen exacto de las mESCs y su analogía con las células de un estadio concreto del desarrollo embrionario *in vivo*. En este sentido, diversos estudios apuntan que, en una población de mESCs cultivadas *in vitro* en las condiciones de cultivo originales (*leukemia inhibitory factor*, LIF + *fetal bovine serum*, FBS), resulta en una población heterogénea donde se observan subpoblaciones que se caracterizan por la expresión diferencial de marcadores específicos de diversos estadios del desarrollo (Boroviak et al., 2014; Brook and Gardner, 1997; Macfarlan et al., 2012; Tang et al., 2010). Sin embargo, en ausencia de suero y haciendo uso de los inhibidores PD0325901 y CHIR99021 que bloquean diferentes rutas de señalización (medio 2i/LIF) (*véase sección 1.5*), se ha demostrado que, mediante el análisis de los perfiles de expresión de factores de transcripción y marcadores de señalización de células únicas, se puede establecer una equivalencia entre las mESCs *in vitro* con las células del epiblasto preimplantacional (E4.5) (Boroviak et al., 2014). Por tanto, **la heterogeneidad de la población de mESCs depende de las condiciones de cultivo** (Boroviak et al., 2014; Hayashi et al., 2008; Toyooka et al., 2008).

1.2.- Pluripotencia en ESCs

Las células madre se definen por su capacidad de generar de forma indefinida dos tipos de progenie: células hijas con el mismo potencial de diferenciarse y proliferar, y células hijas destinadas a diferenciarse. De este modo, las ESCs se caracterizan por su habilidad de autorrenovación que les permite **proliferar indefinidamente en un estado indiferenciado**, manteniendo al mismo tiempo un estado de pluripotencia que les otorga la capacidad para **diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales** que conforman un organismo completo: endodermo, mesodermo y ectodermo. Los primeros experimentos *in vivo* que demostraron que las células del embrión preimplantacional tienen la habilidad de producir cualquier tipo celular y, por tanto, son pluripotentes, se produjeron en la década de los 70, cuando se injertaron embriones de ratón en sitios extrauterinos

dando lugar a teratocarcinomas (Diwan and Stevens, 1976; Solter et al., 1970). Los teratomas son tumores benignos que contienen células diferenciadas de las tres capas germinales, por lo que la pluripotencia de las ESCs puede evaluarse analizando la contribución a los tres linajes: endodermo, mesodermo y ectodermo. Asimismo, otro ensayo que demuestra de forma clara la existencia la capacidad de pluripotencia de las ESCs, consiste en la formación de quimeras mediante inyección de ESCs directamente en la ICM de un blastocisto o en un embrión en otra etapa de desarrollo anterior (Tam and Rossant, 2003). Estas células inyectadas son capaces dar lugar a la formación de un organismo quimera completo, contribuyendo también a la línea germinal. Otra variante de este ensayo consiste en el uso de blastocistos tetraploides donde la células originales que conforman la ICM presentan una desventaja competitiva en el crecimiento, por lo que los embriones que sobreviven derivan prácticamente de la línea de ESCs inyectada (Eakin et al., 2005; Nagy et al., 1990). La inyección de ESCs individuales en blastocistos da lugar también a la formación de quimeras en un 30-40% de los casos, lo que demuestra que la pluripotencia es una característica patente a nivel de célula individual (Martello and Smith, 2014). Además, las ESCs pueden diferenciarse *in vitro* a diversos linajes celulares, lo que demuestra que la pluripotencia también se mantiene en células cultivadas *in vitro*. Un ejemplo de ello es la formación de cuerpos embrioides, agregados tridimensionales de células pluripotentes cultivadas en suspensión e inducidas a diferenciarse espontáneamente mediante la eliminación de los factores que mantienen la pluripotencia del medio de cultivo, lo que permite la obtención de células pertenecientes a los tres linajes celulares (Kurosawa, 2007).

Para el mantenimiento de este potencial de autorrenovación y proliferación ilimitado, las células madre pluripotentes (*pluripotent stem cells*, PSCs) manifiestan una **alta capacidad para conservar el tamaño de los telómeros**, por lo que pueden proliferar evitando el desgaste de éstos y, por tanto, la inestabilidad genómica. Así, las ESCs se caracterizan por una elevada actividad de la telomerasa (Liu et al., 2007) reforzada por la activación de un mecanismo alternativo de elongación de telómeros (*alternative lengthening of telomeres*, Alt) (Kim et al., 2021). En consistencia, la reprogramación de células somáticas hasta el estadio de célula madre embrionaria (células pluripotentes inducidas o *induced pluripotent stem cells*, iPSCs) resulta en la elongación de los telómeros (Marion et al., 2009; Zeng et al., 2014), lo que se asocia

con un mejor mantenimiento de la pluripotencia (Wang et al., 2017a). Sin embargo, el incremento de la actividad de la telomerasa no es el único mecanismo por el que las ESC preservan la estabilidad genómica. La tasa de mutación en células somáticas es elevada, de alrededor de 10^{-4} . Este alto nivel de daño en el DNA no es compatible con que las ESCs generen un organismo completo sano. Por ello, estas células se caracterizan también por una **frecuencia de mutación de alrededor de 3 órdenes de magnitud más baja que la hallada en células somáticas**, de alrededor de 10^{-7} , basada en un mecanismo directo de supresión de mutaciones intragénicas y recombinación mitótica (Cervantes et al., 2002; Hong et al., 2007).

1.3.-Estados de pluripotencia en mESCs

Las características moleculares de las mESCs se han correlacionado al estado de pluripotencia de las células de la ICM y del epiblasto preimplantacional *in vivo*, conocido como estado de **pluripotencia naïve** (Nichols and Smith, 2009). En contraste, las células derivadas del epiblasto postimplantacional o EpiESCs retienen una configuración de pluripotencia alternativa conocida como **pluripotencia primed** (del inglés “preparado”) (Nichols and Smith, 2009). Estos diferentes estados de pluripotencia se basan en las diferencias moleculares y funcionales de ambos tipos de células pluripotentes, derivadas en distintos momentos del desarrollo (embrión pre- o post- implantacional), lo que inevitablemente influye en sus características y su función.

Las condiciones de cultivo condicionan la identidad de las ESCs y, por tanto, su estado de pluripotencia. La clave inicial para derivar mESCs *in vitro* fue co-cultivar estas células con fibroblastos de embrión de ratón (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) en medio con FBS (Evans and Kaufman, 1981), lo que ahora se sabe que era esencial debido a que los MEFs producen la citoquina LIF, la cual activa rutas de señalización celular que inhiben diferenciación y promueven la autorrenovación (Rathjen et al., 1990). La identificación de este factor como esencial para el mantenimiento de la pluripotencia, permitió posteriormente el cultivo de mESCs en medio FBS/LIF sin MEFs (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). En el año 2008, se estableció una nueva condición de cultivo basada en el empleo de inhibidores de participan en diferentes rutas de señalización, PD0325901 y

CHIR99021, que actúan en la ruta Erk y la ruta Wnt respectivamente. Este nuevo medio de cultivo, conocido como medio 2i/LIF, permitió el cultivo de mESCs de forma estable, manteniendo la autorrenovación y la pluripotencia y sin necesidad de adicionar FBS (Silva et al., 2008; Ying et al., 2008).

Ambas condiciones, FBS/LIF y 2i/LIF, permiten expandir células en estado de pluripotencia *naïve*. Sin embargo, **las células cultivadas en FBS/LIF se encuentran en un estado metaestable, en el que transicionan continuamente entre el estado de pluripotencia *naïve* y un estado más cercano al *primed*** (Toyooka et al., 2008). Esta idea deriva de la observación de que en medio FBS/LIF, las células dentro de la población de mESCs expresan de forma heterogénea *Nanog* y otros factores de transcripción de pluripotencia como *Rex1*, *Stella* y *Klf4* (Abranches et al., 2013; Chambers et al., 2007; Hayashi et al., 2008; Toyooka et al., 2008), mientras que, por el contrario, las células crecidas en 2i/LIF expresan estos factores de forma homogénea (Figura 1.2), por lo que se clasifican dentro de un estado más *naïve* también conocido como *ground state* (Wray et al., 2011).

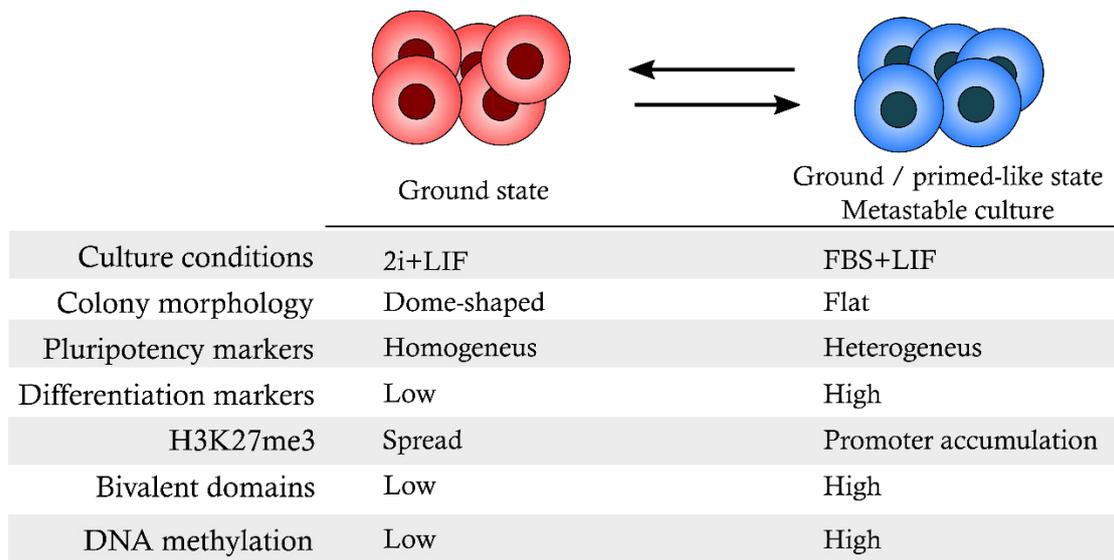


Figura 1.2. Estados de pluripotencia y características de las mESCs según las condiciones de cultivo *in vitro*. Las mESCs cultivadas en 2i+LIF o en suero complementado con LIF (FBS+LIF) muestran diferencias en su fenotipo y características biológicas (primera columna). Esto condiciona la identidad de las mESCs y su estado de pluripotencia. Así, en base al estado de pluripotencia, las células en 2i+LIF se clasifican dentro de un estado más *naïve* o *ground state* (segunda columna) mientras que las células cultivadas en FBS+LIF se clasifican dentro de un estado metaestable que oscila entre el estado *naïve*/ground y el *primed* (tercera columna). Las flechas bidireccionales indican que ambos estados de pluripotencia son interconvertibles. Los niveles de H3K27me3 se refieren a los niveles de la marca encontrados en promotores bivalentes.

Así, las mESCs cultivadas en 2i/LIF presentan características transcripcionales, morfológicas y epigenéticas que las diferencian de las cultivadas en FBS/LIF (Figura 1.2). Morfológicamente, las colonias en 2i son más homogéneas y muestran un aspecto esférico y tridimensional, mientras que las crecidas en FBS presentan un fenotipo de colonia más plano y heterogéneo. Además, análisis de transcriptómica han revelado que las mESCs en FBS/LIF muestran una mayor expresión de genes asociados a desarrollo en relación con 2i/LIF (Marks et al., 2012; van Mierlo et al., 2019). A nivel epigenético, las células crecidas en 2i/LIF presentan, además, una hipometilación global del DNA (Leitch et al., 2013) y se les ha asociado con niveles reducidos de trimetilación en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) en análisis comparativos de inmunoprecipitación de cromatina (Marks et al., 2012). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que los niveles de trimetilación de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27me3) y del complejo que cataliza esta marca (*polycomb repressor complex 2*, PRC2) (véase sección 2.2.2) son significativamente mayores en 2i en comparación con FBS, y que las diferencias halladas anteriormente se deben a cambios en la distribución de la marca (van Mierlo et al., 2019). En consecuencia, los dominios bivalentes en los que aparece esta marca asociada simultáneamente a la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) y que se asocian a genes de desarrollo (véase sección 2.2.1), aparecen más enriquecidos en H3K27me3 en los promotores en la condición FBS/LIF, por lo que el enriquecimiento en este tipo de dominios se ha relacionado habitualmente con las células cultivadas en esta condición. Entre ambas condiciones, también se han descrito diferencias a nivel funcional como el control del ciclo celular (véase sección 3.1.1). Sin embargo, a pesar de todas estas diferencias, el potencial de diferenciación de las mESCs es similar en 2i/LIF y FBS/LIF. Las células creciendo en 2i y en FBS son interconvertibles, lo que demuestra que el epigenoma entre ambos estados de pluripotencia es altamente dinámico (Habibi et al., 2013).

1.4.- Bases moleculares de la pluripotencia

El estado de pluripotencia en ESCs se mantiene a través de un conjunto de señales externas que actúan en cooperación con una robusta y jerarquizada red de genes asociados a pluripotencia, lo que permite a la célula ejercer control sobre la decisión entre autorrenovarse y diferenciarse. La importancia de estos factores de

transcripción de pluripotencia en la adquisición y el mantenimiento de este estado, quedó demostrada en el año 2006 por el laboratorio de Yamanaka, cuando consiguieron reprogramar células somáticas a células pluripotentes inducidas (iPSCs) adicionando al medio de cultivo una combinación de estos factores de pluripotencia e induciendo así un estado de pluripotencia *de novo* (Takahashi and Yamanaka, 2006). El núcleo de esta red de genes reguladores de la pluripotencia (*pluripotency gene regulatory network*, PGRN) está conformado por tres factores de transcripción: **Oct4**, **Sox2** y **Nanog** (Figura 1.3) (Li and Izpisua Belmonte, 2018; Ng and Surani, 2011; Young, 2011).

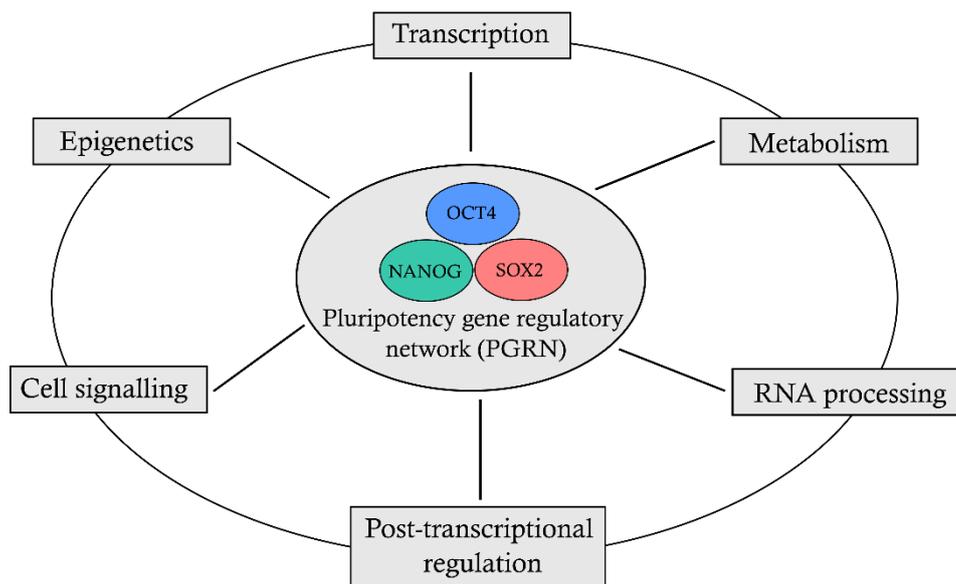


Figura 1.3.- La red de genes reguladores de la pluripotencia mantiene la identidad de las mESCs. *Oct4*, *Nanog* y *Sox2* forman el núcleo de la red de pluripotencia (PGRN), que interviene regulando la transcripción de genes mediante la activación de otros factores de pluripotencia o silenciando genes de linaje. Además, esta red también actúa en otros niveles de regulación que incluyen la regulación postranscripcional del procesamiento del RNA, la traducción, la señalización celular, la modificación y el recambio de proteínas y la regulación metabólica.

Oct4, también conocido como POU5F1, fue uno de los primeros factores identificados como regulador de la pluripotencia en ESCs (Okamoto et al., 1990; Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990), y es esencial para el mantenimiento de ésta tanto *in vivo* como *in vitro* (Nichols et al., 1998). En la ICM del blastocisto se expresa a niveles muy altos y su expresión decrece durante el desarrollo embrionario, lo que lo hace un marcador ideal en ensayos de diferenciación (Brambrink et al., 2008). La sobreexpresión de *Oct4* promueve diferenciación a mesodermo mientras que la reducción de la expresión de tan solo un 50% desencadena diferenciación a

trofotodermo (Niwa et al., 2000). De acuerdo con todo esto, los embriones mutantes para *Oct4* no son capaces de constituir la ICM y por tanto no se desarrollan más allá del estadio de blastocisto (Nichols et al., 1998).

Sox2, por su parte, resulta esencial para el desarrollo del epiblasto. Como sucede con *Oct4*, *Sox2* se encuentra altamente expresado en la ICM, donde es esencial para retener el estado de pluripotencia promoviendo la expresión de *Oct4* (Avilion et al., 2003; Masui et al., 2007), gracias a la formación de heterodímeros Sox2-Oct4 que hacen que estos dos factores cooperen en la regulación de sus dianas, incluyendo ellos mismos (Chew et al., 2005). Cambios en la expresión de *Sox2* también tienen consecuencias en diferenciación: mientras que la pérdida de la expresión de *Sox2* también promueve diferenciación a trofotodermo, una sobreexpresión de este factor induce diferenciación a neuroectodermo (Kopp et al., 2008). Además, la mutación de *Sox2 in vivo* resulta letal debido a fallos en la implantación ocasionados por la ausencia de células de epiblasto y la deformación de la estructura del embrión (Avilion et al., 2003). Es importante resaltar, que la expresión de *Sox2* no se encuentra restringida solo a ESCs sino que también se detecta en muchas células madre progenitoras adultas (Arnold et al., 2011).

Nanog es el tercer factor de pluripotencia que forma parte del *core* de la PGRN. Éste también se expresa a altos niveles, tanto en la ICM como en el epiblasto, y es necesario para la formación de ambos tejidos (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Como sucede con los embriones mutantes para *Oct4* y *Sox2*, los embriones mutantes para *Nanog* también muestran fallos en el desarrollo. Sin embargo, al contrario que sucede con los mutantes de *Oct4* y *Sox2*, las ESCs derivadas de mutantes de *Nanog* pueden mantenerse en cultivo, lo que indica que *Nanog* no es indispensable para la autorrenovación (Silva et al., 2009). Sin embargo, en contraste con esto, la sobreexpresión de *Nanog in vitro* permite que las mESCs se autorrenueven y proliferen independientemente de la presencia de LIF (Chambers et al., 2003).

Este trío de factores de pluripotencia (también abreviado como OSN) no funciona de forma independiente, sino que está integrado dentro de una compleja red de regulación en la que también se encuentran implicados otros factores de transcripción asociados a pluripotencia, como ESRRB, KLF4, TFCEP2L1 y MYC (Li and Belmonte, 2017; Li and Izpisua Belmonte, 2018). *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* regulan su

propia expresión mediante la unión a sus propios promotores y ocupan a la vez un alto porcentaje de dianas, lo que indica que estos tres factores cooperan en la regulación génica de éstas (Chen et al., 2008). La capacidad de regular la expresión de estas dianas recae en su capacidad para interactuar con otros factores de transcripción y maquinaria epigenética, entre los que se incluyen complejos remodeladores de la cromatina (Ho and Crabtree, 2010; Liang et al., 2008), metiltransferasas de histonas (Yuan et al., 2009), factores asociados a regiones potenciadoras de la expresión o *enhancers* (Kagey et al., 2010) y factores de pluripotencia (Wang et al., 2006). Además de la regulación transcripcional y a nivel epigenético, la PGRN también participa en múltiples niveles de regulación, incluyendo la regulación postranscripcional del procesamiento del RNA, la traducción, la modificación y el recambio de proteínas y la regulación metabólica (Figura 1.3) (Li and Izpisua Belmonte, 2018).

1.5.- Diferencias entre células madre embrionarias de ratón y humanas

Las células madre humanas (*human embryonic stem cells*, hESCs) fueron aisladas casi dos décadas después que las mESCs a partir de blastocistos de embriones humanos procedentes de fertilización *in vitro* con fines clínicos (Thomson et al., 1998). A pesar de que estas células y las derivadas de ratón tienen características comunes como la expresión del factor de pluripotencia *Oct4*, la capacidad de autorrenovación y la perpetuación del estado pluripotente, diversos estudios hacen referencia a las diferencias en las marcas moleculares y las rutas de señalización existentes entre ambas especies. Así, las hESCs no requieren ser cultivadas en presencia de LIF para mantener la pluripotencia (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998), pero sí precisan de factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*, Fgf) y Activina A (Bertero et al., 2015; Humphrey et al., 2004; Thomson et al., 1998). Cada una de estas moléculas activa y promueve diferentes rutas de señalización, lo que evidencia las **diferencias de ambas líneas de ESCs en las rutas de señalización que gobiernan el mantenimiento de la pluripotencia.**

Otra característica que diferencia a ambos tipos celulares es la capacidad de diferenciarse espontáneamente a células madre del trofoblasto (*trophectoderm stem cells*, TSCs) ya que, al contrario que las mESCs (Niwa et al., 2000), las hESCs si son

capaces de diferenciarse a células de este linaje en cultivo (Odorico et al., 2001). Esto pone en evidencia también las **diferencias existentes en relación con el estadio del desarrollo al que se corresponden cada una de las líneas con sus respectivos modelos *in vivo***. En este sentido, las primeras derivaciones de células de epiblasto postimplantacional (EpiESCs) de ratón en E5.5 en el año 2007 elucidaron que estas células presentan características más cercanas a las hESCs, tanto a nivel de requerimientos de cultivo como de patrones de expresión, redes transcripcionales y estatus epigenético (Brons et al., 2007; Kojima et al., 2014; Tesar et al., 2007). Esta disparidad puede deberse a las diferencias en el proceso de desarrollo embrionario de ambas especies y a que la restricción de linajes en las primeras etapas del desarrollo en humano se produce a un ritmo más lento (Rossant, 2015). Además, el modo de **regulación del ciclo celular por la maquinaria de ciclo en ambas líneas también muestra ciertas diferencias** (*véase sección 3.1.1*) (Liu et al., 2019). De cualquier modo, estas diferencias sugieren que hay que ser precavidos al extrapolar los datos que se han acumulado sobre las propiedades de las mESCs a los estudios con células madre embrionarias humanas. En la última década, diversos grupos de investigación han centrado sus objetivos en derivar ESC humanas que presenten una similitud mayor a las de ratón con el fin de poder extrapolar todos los datos generados y poder aplicarlos al ámbito de la biomedicina en humanos (Chan et al., 2013; Chen et al., 2018a; Chen et al., 2015; Guo et al., 2017; Qin et al., 2016; Takashima et al., 2014; Ware et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016).

1.6.-Potenciales aplicaciones en biomedicina

El potencial de las ESCs para autorrenovarse manteniéndose indefinidamente en cultivo y, a su vez, diferenciarse a cualquier linaje celular, las hace un **modelo ideal, no solo para el estudio del desarrollo embrionario temprano, sino también para explotar su uso en medicina regenerativa**. Estas células son potencialmente capaces de diferenciarse a más de 200 tipos celulares de las tres capas germinales bajo condiciones de cultivo definidas, lo que permite su uso en terapia celular regenerativa. Actualmente, existen 19 ensayos clínicos completados o en proceso de reclutamiento de voluntarios en los que se emplean células diferenciadas derivadas de hESCs para el tratamiento de diferentes enfermedades o condiciones, como por ejemplo cardiopatía isquémica, infertilidad, degeneración macular, esclerosis lateral

amiotrófica, Parkinson, insuficiencia primaria ovárica e incluso para COVID-19, entre otros (información recogida en www.clinicaltrials.gov). Además, en el último año se han desarrollado modelos de embriones humanos *in vitro* a partir de hESCs e iPSCs (Liu et al., 2021; Yu et al., 2021), denominados blastoides, en los que se puede analizar la biología del desarrollo en humanos sin las limitaciones éticas y técnicas de este campo. Esto ha abierto una nueva puerta en el ámbito de la biomedicina, con mucho potencial para el estudio de la fertilización *in vitro* y testado de medicamentos (Moris et al., 2021). No obstante, **el dilema ético que genera la destrucción de embriones humanos para obtener hESCs ha sido y continúa siendo un factor limitante para el desarrollo de las terapias basadas en células madre embrionarias.** Este dilema se refleja claramente en las diferentes legislaciones que existen en todo el mundo y que regulan la investigación con hESCs (Sharma, 2019). Es importante resaltar también más allá de estos conflictos éticos, que **el principal problema para aplicar las terapias basadas en hESCs es la seguridad**, ya que estas células pueden resultar ser una navaja de doble filo, puesto que el trasplante directo de éstas puede generar en un alto porcentaje de casos teratomas (Murry and Keller, 2008). La única forma de asegurar que esto no sucede es realizar los trasplantes con células previamente diferenciadas y comprobando la ausencia total de células sin diferenciar. A pesar de que esta metodología está dando buenos resultados en modelos animales para algunos tipos de diferenciaciones, problemas en algunos ensayos reclaman una mejora de los métodos para purificar la población de células diferenciadas (Volarevic et al., 2018).

2.- Regulación epigenética en mESCs

2.1.- Estructura de la cromatina en ESCs

El material genético eucariota, desde levaduras a humanos, se empaqueta en el núcleo de la célula como cromatina, una estructura compuesta por DNA y proteínas. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, constituido por un octámero de histonas envuelto por alrededor de 145-147 pares de bases (pb) de DNA. Cada octámero está compuesto por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. La cromatina es susceptible de modificarse a través de diversos mecanismos que permiten que el genoma empaquetado esté accesible para la maquinaria implicada en transcripción, replicación de DNA y reparación (Luger et al., 2012). En las regiones en las que la cromatina está más compactada no es accesible a la maquinaria de transcripción, lo que se conoce como cromatina inactiva o heterocromatina. Por el contrario, las regiones menos compactadas permiten una mayor accesibilidad de estos complejos al material genético y una tasa más alta de actividad transcripcional. A este segundo estado abierto de la cromatina se le denomina eucromatina.

El estado de la cromatina en ESCs presenta características que la distinguen de la cromatina somática. La **cromatina pluripotente está más accesible** y, por tanto, más abierta, lo que se traduce en un estado menos condensado y en **una ratio eucromatina/heterocromatina significativamente mayor que en células somáticas**. Las primeras evidencias de esto provienen de estudios con microscopía electrónica en células madre humanas, donde se observó una mayor prevalencia de heterocromatina en células diferenciadas en relación con ESCs (Park et al., 2004). La cromatina en ESCs aparece más homogéneamente repartida en el núcleo, con bloques de heterocromatina menos evidentes (Efroni et al., 2008). Esto se ha observado también *in vivo*: las células de la ICM del blastocisto de ratón comparten el mismo estado de la cromatina que las mESCs *in vitro* (Ahmed et al., 2010). Este estado de la cromatina tan característico de ESCs se ha propuesto como una **conformación necesaria para mantener la plasticidad genómica** que les permite diferenciarse a cualquier tipo celular.

2.2.- Mecanismos de regulación epigenética en ESCs

La palabra epigenética significa “sobre o por encima de la genética”, haciendo referencia a aquellos procesos que alteran la actividad génica sin alterar la secuencia de DNA y que dan lugar a modificaciones que pueden transmitirse a la progenie (Berger et al., 2009). El epigenoma permite mantener programas de transcripción específicos que definen la identidad de una célula. La regulación epigenética se establece por diversos mecanismos como modificaciones del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas, incorporación de nuevas variantes de histonas o la acción de RNAs no codificantes. Estas modificaciones epigenéticas controlan el programa de expresión pluripotente y conforman el característico estado de cromatina presente en ESCs.

2.2.1.- Modificaciones postraduccionales de histonas: la cromatina bivalente

Las histonas que conforman el nucleosoma poseen colas en el extremo amino terminal cuya secuencia está altamente conservada en eucariotas. Las modificaciones postraduccionales (*post-translational modifications*, PTMs) de estas histonas actúan como punto de control de la expresión génica a través de dos posibles mecanismos no excluyentes: 1) alteración de las propiedades biofísicas del nucleosoma mediante cambios estéricos de las interacciones histona-histona y/o histona-DNA y 2) modulación de la interacción y reclutamiento de factores de regulación (Taverna et al., 2007). Se han descrito al menos ocho tipos de PTMs diferentes, como acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación entre otras. Estas modificaciones pueden producirse a su vez en diferentes residuos o posiciones en la cadena de aminoácidos, lo que puede implicar diferentes funciones como regulación de la transcripción, reparación, replicación o condensación. De este modo, en genes transcripcionalmente activos sus promotores están generalmente marcados con las PTMs de trimetilación en la lisina 4 y/o trimetilación de la lisina 36 de la histona 3 (H3K4me3 y H3K36me3 respectivamente), mientras que los promotores de genes inactivos están habitualmente marcados por la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) (Figura 2.1A) (Kouzarides, 2007).

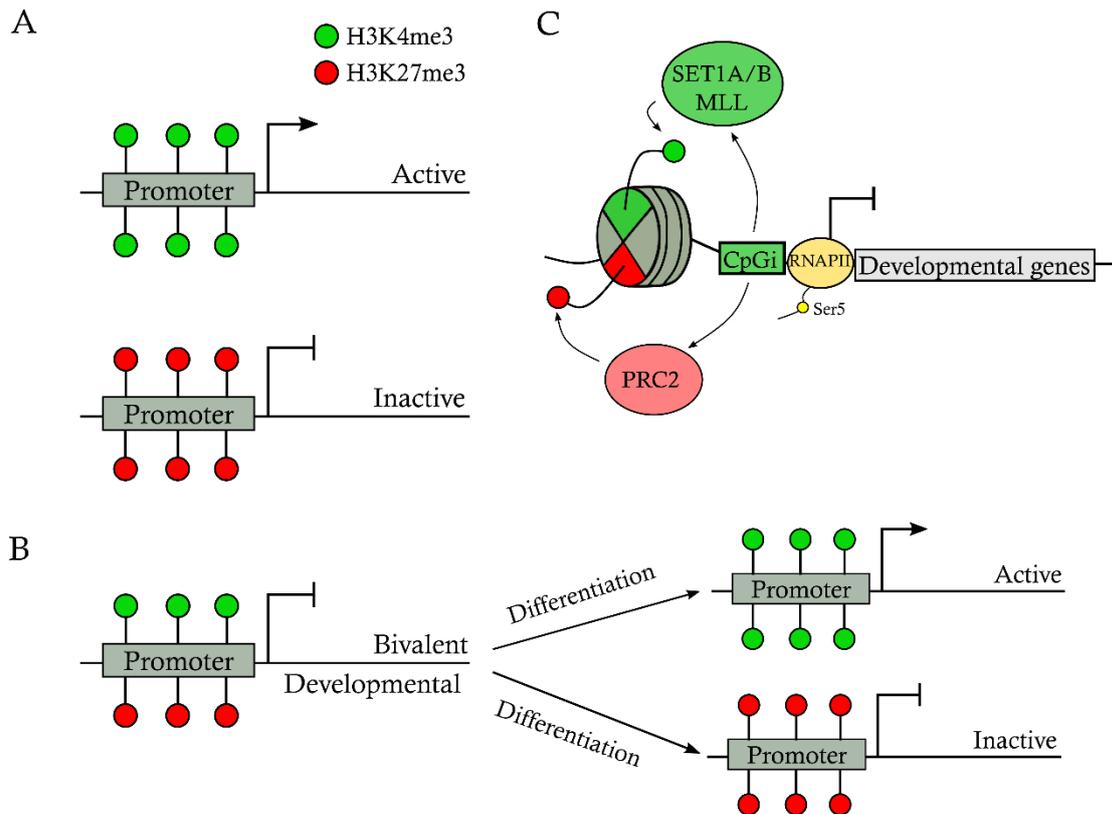


Figura 2.1. La cromatina bivalente mantiene preparados los genes del desarrollo para la diferenciación en mESCs. *A)* Representación de las marcas de histonas presentes en los nucleosomas de los genes activos (arriba) e inactivos (abajo). Los genes activos se caracterizan por la presencia de la marca de trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3, círculos verdes) mientras que los genes inactivos exhiben la marca de trimetilación de lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3, círculos rojos). *B)* Representación de las modificaciones postraduccionales de histonas que caracterizan un promotor bivalente. En estos promotores se pueden identificar de forma simultánea la marca de activación H3K4me3 (círculos verdes) y la marca represora H3K27me3 (círculos rojos) en histonas H3 opuestas, lo que permite que los genes del desarrollo se encuentren en un estado “primed” o preparado para activarse (flecha superior) o inactivarse (flecha inferior), dependiendo de la señalización y el linaje hacia el que se dirija la diferenciación. *C)* Los promotores bivalentes contienen islas CpG que ejercen un papel esencial para reclutar las metiltransferasas que establecen las marcas bivalentes (SET1A/B, MLL / PRC2). La forma de la RNAPII fosforilada en la Ser5 (círculo amarillo) aparece especialmente asociada a este tipo de promotores unida al sitio de inicio de la transcripción.

En el año 2006, se describió por primera vez la **coexistencia de dos marcas con funciones opuestas en promotores en mESCs**: las marcas de activación e inactivación, H3K4me3 y H3K27me3 respectivamente, aparecen simultáneamente marcando nucleosomas de forma asimétrica en histonas H3 opuestas (Voigt et al., 2012) en promotores de genes asociados a desarrollo embrionario (Figura 2.1B) (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007). Esta conformación epigenética se ha designado como **cromatina bivalente** y ha sido descrita también en hESCs y en células del epiblasto preimplantacional en embriones de ratón (Pan et al., 2007; Rugg-Gunn et al., 2010; Zhao et al., 2007), así como en

pez cebra (Lindeman et al., 2011). Entre hESCs y mESCs, un porcentaje muy alto de estas regiones bivalentes solapan y más de 2000 genes se han clasificado como bivalentes en ambas especies. La bivalencia ha sido descrita como esencial para mantener a los genes asociados a diferenciación en un estado “*poised*” o preparado, que permite tanto una activación como un silenciamiento rápido de éstos ante señales de diferenciación y/o estímulos externos, al mismo tiempo que mantiene unos niveles de expresión bajos y da robustez al proceso de diferenciación, previniendo la activación no programada de estos genes (Voigt et al., 2013). La cromatina bivalente favorece, además, un estado abierto y accesible en los promotores, que permite una mejor modulación de la expresión génica (Mas et al., 2018). Durante la diferenciación, algunos genes bivalentes comienzan a expresarse y pierden la marca represora H3K27me3, mientras que aquellos que se silencian pierden la marca de activación H3K4me3 y retienen H3K27me3 (Figura 2.1B) (Bernstein et al., 2006). La importancia de la cromatina bivalente en el establecimiento de la identidad pluripotente se hace patente en estudios con iPSCs, en los que se observa como la mayor parte de estos dominios bivalentes se reestablecen tras la inducción (Maherali et al., 2007; Mikkelsen et al., 2008).

Los dominios bivalentes correlacionan de forma significativa con la presencia de islas CpG, regiones del DNA ricas en dímeros CG (citosina-guanina) no metilados, de aproximadamente 1-2kb y que están presentes en aproximadamente el 70% de los promotores totales (Deaton and Bird, 2011). En términos generales, todas las islas CpG mapean en sitios asociados con la marca H3K4me3, lo que engloba también todos los promotores bivalentes (Mikkelsen et al., 2007). **Las islas CpG ejercen un papel esencial en el reclutamiento de las metiltransferasas que establecen las marcas en la cromatina bivalente (Figura 2.1C).** De este modo, los complejos del grupo Triterax, SET1A/B y MLL, conformados por proteínas que reconocen secuencias ricas en CGs no metiladas, son reclutados a estas regiones donde catalizan la marca H3K4me3 (Birke et al., 2002; Shilatifard, 2012). El complejo represor Polycomb 2 (PRC2) puede ser reclutado también gracias a la presencia de islas CpG, para catalizar, por otra parte, la marca represiva H3K27me3 (véase sección 2.2.2). Esta relación se observa claramente en los promotores diana de este complejo, de los cuales, el 97% son ricos en islas CpG, (Ku et al., 2008) y en ensayos en los que se introducen islas CpG de forma ectópica en otros promotores

en los que se demuestra que la presencia de éstas es suficiente para reclutar al complejo (Mendenhall et al., 2010). En consecuencia, a pesar de que la marca H3K27me3 habitualmente se extiende por otras zonas del genoma, como regiones intergénicas y genes inactivos (Marks et al., 2012; Pauler et al., 2009), en ESCs una pequeña proporción aparece asociada también a promotores, en su mayoría, bivalentes (Ku et al., 2008; Mikkelsen et al., 2007; Young et al., 2011). El análisis de las islas CpG que se asocian solo con H3K4me3 en comparación con aquellas que correlacionan con bivalencia ha revelado que las islas asociadas a PRC2 contienen tanto sitios de unión a factores de transcripción que aparecen inactivos en ESCs como sitios de unión asociados a represores transcripcionales, mientras que las islas CpG no asociadas a PRC2 se caracterizan por la presencia de sitios a los que se unen activadores transcripcionales altamente expresados en ESCs, como MYC, NYF y ETS1 (Ku et al., 2008).

Un alto porcentaje de genes bivalentes puede distinguirse por altos niveles de RNA polimerasa II fosforilada en la serina 5 del dominio C-terminal (Ser5-RNAPII) (Brookes et al., 2012) (Figura 2.1C). Esta forma de la polimerasa es la encargada de iniciar transcripción y permanece unida al sitio de inicio de transcripción (*transcription start site*, TSS) preparada para comenzar la elongación, hecho que tiene lugar tras la fosforilación de la serina 2 del dominio C-terminal (Ser2-RNAPII) (Harlen and Churchman, 2017). Los niveles de esta última polimerasa Ser2-RNAPII con capacidad de elongar son, sin embargo, insignificantes en promotores bivalentes. Por ende, estos genes bivalentes inician transcripción, pero no elongación. Teniendo en cuenta la incompatibilidad de la presencia de H3K27me3 con elongación transcripcional y la asociación de la Ser5-RNAPII con el reclutamiento de trimetilinas de H3K4 (Milne et al., 2005; Ng et al., 2003), la presencia de Ser5-RNAPII es acorde con la coexistencia de ambas marcas y con los bajos niveles de expresión atribuidos a los genes bivalentes. Así, la mutación de PRC2 tiene como consecuencia un aumento de la expresión de estos genes, asociada a una disminución de la Ser5-RNAPII y la marca H3K27me3 (Landeira et al., 2010).

2.2.2.- Los complejos represores Polycomb (PRCs)

La importancia de los complejos modificadores de cromatina en el control epigenético que gobierna el desarrollo embrionario se ilustra de forma clara en el

sistema represivo Polycomb. El primer gen del grupo Polycomb fue identificado en 1947 en *Drosophila melanogaster* por Pamela Lewis (Lewis and Mislove, 1947). Años más tarde, se determinó que este gen junto a otros del mismo grupo son esenciales para la represión y control de los genes homeóticos o genes *Hox* y, por tanto, para una correcta segmentación del eje anteroposterior del cuerpo de la mosca (Lewis, 1978; Struhl, 1981). Estudios consecutivos, elucidaron a su vez la existencia de ortólogos de estas proteínas en mamíferos con gran importancia en multitud de procesos celulares.

Las proteínas Polycomb conforman grandes complejos con capacidad de modificar histonas. Los complejos represores Polycomb (*polycomb repressor complexes*, PRCs) pueden subdividirse en dos: **complejo represor Polycomb 2 (PRC2)** y **complejo represor Polycomb 1 (PRC1)**, los cuales catalizan la metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me1/2/3) y la monoubiquitinización de la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub1), respectivamente. **La actividad represora de ambos complejos converge espacialmente en un número elevado de dianas** formando lo que se conoce como dominios Polycomb, que pueden extenderse decenas de kilobases y que están altamente enriquecidos en H3K27me3, H2AK119ub1 y proteínas del grupo Polycomb. En ESCs, **las dianas clásicas de los PRCs son los genes bivalentes** (Boyer et al., 2006; Ku et al., 2008) donde tienen un papel esencial en el control de la expresión de éstos durante el desarrollo embrionario, siendo esenciales para una correcta diferenciación celular (Landeira et al., 2010; Leeb and Wutz, 2007; Pereira et al., 2010; Petracovici and Bonasio, 2021; Shen et al., 2008)

2.2.2.1.- Composición y actividad de los PRCs en mESCs

El análisis detallado y sistemático de la bioquímica y la composición de los complejos Polycomb ha sido y sigue siendo fundamental para el progreso en la comprensión de la biología y el funcionamiento de estos complejos en mamíferos. De forma general, los PRCs se componen de un núcleo catalítico acompañado de otras proteínas auxiliares que dan identidad al complejo y lo condicionan funcionalmente.

El **núcleo del complejo PRC2** consiste en la asociación de cuatro proteínas: Ezh2 (*Enhancer of Zeste 2*) o su parálogo Ezh1 (*Enhancer of Zeste 1*), Eed (*Embryonic*

Ectoderm Development), Suz12 (*Suppressor of Zeste 12*) y RBBP4 o RBBP7 (*Retinoblastoma-binding protein 4/7*), donde **Ezh1/2 es la subunidad catalítica** (Figura 2.2A). Ezh1/2 cataliza cualquier forma de metilación de H3K27, siendo la forma trimetilada (H3K27me3) la asociada a los promotores de genes bivalentes (Ferrari et al., 2014). A pesar de que Ezh1 colocaliza y complementa parcialmente a Ezh2 en el mantenimiento de la represión de genes bivalentes (Lavarone et al., 2019; Shen et al., 2008), la gran mayoría de los estudios en ESCs centran su atención en el complejo PRC2 conformado por Ezh2, ya que tiene una mayor contribución en la metilación de la cromatina en células embrionarias y proliferativas, y su ausencia tiene efectos globales en los niveles de H3K27me3 (Margueron et al., 2008). Diversos estudios de criomicroscopía electrónica han revelado que la proteína Suz12 actúa como puente entre dos lóbulos diferenciados del complejo: el lóbulo catalítico y el lóbulo de reclutamiento y regulación (Chen et al., 2018b; Glancy et al., 2021; Kasinath et al., 2018). Dentro del lóbulo catalítico, Eed y el extremo C-terminal de Suz12 interaccionan con Ezh2, induciendo un cambio a una conformación activa de su dominio catalítico promoviendo la actividad metiltransferasa (Cao and Zhang, 2004). Por su parte, el lóbulo de reclutamiento y regulación se conforma por el extremo N-terminal de Suz12 que se une a Rbbp4/7 e interacciona con otras proteínas adicionales de manera mutuamente exclusiva (Chen et al., 2018b; Healy et al., 2019), dando lugar a **dos tipos de complejos PRC2** con diferentes características bioquímicas (Figura 2.2A). El complejo **PRC2.1** se compone por una de las proteínas Pcl1/Phf1, Pcl2/Mtf2 o Pcl3/Phf19 asociada a EPOP (*elongin BC and PRC2-associated protein*) o Pal1/2 (*PRC2-associated LCOR isoform 1/2*), mientras que **PRC2.2** contiene las proteínas Jarid2 (*Jumonji and (A+T)-rich interaction domain-containing protein 2*) y Aebp2 (*adipocyte enhancer-binding protein 2*) (Holoch and Margueron, 2017). En ESCs, EPOP se ha asociado al complejo PRC2.1 conformado por Mtf2, la proteína Pcl predominante en ESCs, e interacciona directamente con Elongina B (EloB, *Transcription Elongation Factor B*), un factor asociado a RNAPII (Beringer et al., 2016; Kloet et al., 2016). Las subunidades que conforman cada uno de los dos complejos afectan a la actividad de éstos. De este modo, Jarid2 y Aebp2 contribuyen a una mayor actividad, estimulando la unión y la metilación de H3K27 dentro del complejo PRC2.2 (Lee et al., 2018b; Sanulli et al., 2015), mientras que EPOP como

parte de PRC2.1 está implicado en el mantenimiento de bajos niveles de expresión de sus genes diana (Beringer et al., 2016).

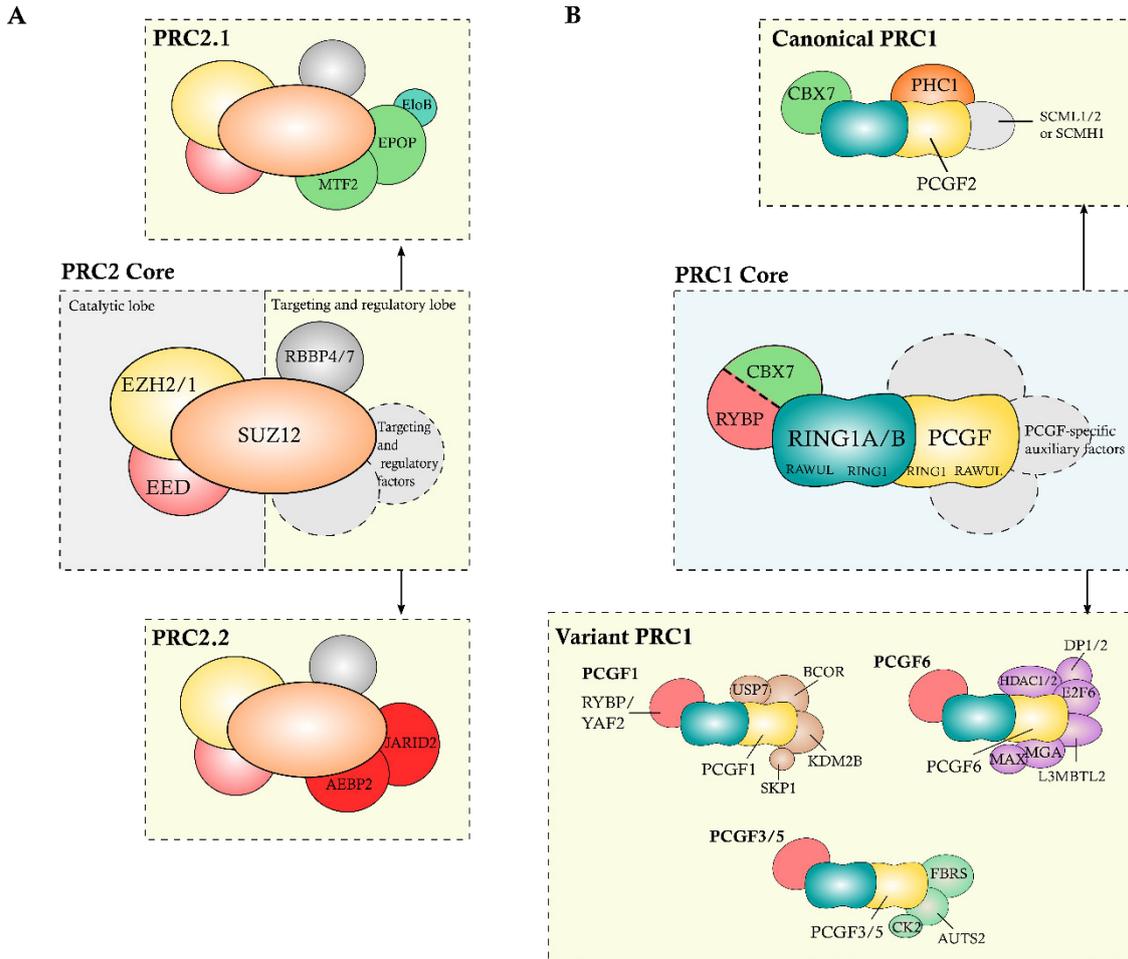


Figura 2.2. La diversidad de los complejos represores Polycomb en ESCs. *A) Tipos de complejos PRC2 en ESCs. El núcleo del complejo PRC2 (centro) se divide en dos lóbulos conectados por la proteína Suz12: el lóbulo catalítico que contiene la proteína Ezh2/1 y Eed, y un lóbulo de reclutamiento y regulación en el que Suz12 interacciona con Rbbp4 o Rbbp7 y otras subunidades auxiliares que dan lugar a los complejos PRC2.1 (arriba) y PRC2.2 (abajo). El complejo PRC2.1 contiene la proteína EPOB asociada EloB y Mtf2, mientras el complejo PRC2.2 se caracteriza por la presencia de Jarid2 y Aebp2. B) Tipos de complejos PRC1 en ESCs. El núcleo de PRC1 (centro) está conformado por la proteína Ring1a o Ring1b y una de las seis proteínas Pcgf (Pcgf1-6) que forman dímeros a través de la interacción de sus dominios RING. Los dominios RAWUL (RING finger and WD40- associated ubiquitin- like) de ambas proteínas interactúan con una serie de subunidades auxiliares que dan lugar a complejos bioquímicamente distintos: los complejos canónicos (cPRC1, arriba) que se ensamblan alrededor de Pcgf2 e incluyen las proteínas Cbx7 (chromobox protein 7) y Phc1 (Polyhomeotic Homolog 1), y los complejos variantes (vPRC1, abajo) que se pueden conformar principalmente alrededor de Pcgf1, Pcgf3, Pcgf5 o Pcgf6 en ESCs y contienen la proteína Rybp (YY1- binding protein) o Yaf2 (YY1-associated factor 2). La identidad de la proteína Pcgf dicta la incorporación de otras proteínas auxiliares, lo que da lugar a una serie de variantes distintas de los complejos PRC1. AUTS2, autism susceptibility protein 2; BCOR, BCL-6 co- repressor; CK2, casein kinase 2; DP1, dimerization partner 1; E2F6, E2F Transcription Factor 6; FBRs, fibrosin; HDAC, histone deacetylase; Kdm2b, lysine- specific demethylase 2B; L3MBTL2, lethal (3) malignant brain tumour- like protein 2; MAX, MYC- associated factor X; MGA, MAX gene-associated protein; SKP1, S- phase kinase- associated protein 1; USP7, ubiquitin carboxy- terminal hydrolase 7. Figura adaptada de (Blackledge and Klose, 2021).*

El **núcleo catalítico de PRC1** se compone por la subunidad catalítica Ring1b (*Ring Finger Protein 2*) o su parólogo Ring1a (*Ring Finger Protein 1*) asociada a una de las seis proteínas Pcgf (*Polycomb Group Ring Finger*) (Pcgf1-6) (Figura 2.2B), donde **Ring1a/b cataliza la marca H2AK119ub1**. La arquitectura de las proteínas Ring1 y Pcgf es muy similar: un dominio RING1 N-terminal y un dominio RAWUL C-terminal. Ambas proteínas forman dímeros entre sí interaccionando a través del dominio RING1 lo que facilita la interacción con una enzima E2 que permite la ubiquitinización de la histona H2A (Bentley et al., 2011). Por su parte, el dominio RAWUL sirve de enlace con otras proteínas auxiliares que regulan la actividad catalítica del complejo y lo condicionan a ser reclutado en sitios específicos del genoma (Wang et al., 2010). Las proteínas auxiliares que se asocian con el complejo vienen dictadas por la proteína Pcgf que conforma el núcleo junto a Ring1a/b y, por consiguiente, podemos encontrar **diversos tipos de complejos PRC1** (Figura 2.2B). En términos generales, los complejos PRC1 se pueden clasificar como **canónicos (cPRC1)** o **variantes (vPRC1)**. El complejo cPRC1 puede estar constituido por Pcgf2 o Pcgf4 e incluye una de las cinco proteínas Cbx (Cbx2, Cbx4, Cbx6, Cbx7 o Cbx8) y una proteína Phc (Phc1, Phc2 o Phc3). En ESCs, el cPRC1 se constituye por Pcgf2, ya que Pcgf4 no se expresa en estas células, asociado a la proteína Cbx7 (Morey et al., 2015). Por el contrario, los complejos vPRC1 se ensamblan alrededor de cualquiera de las seis proteínas Pcgf (Pcgf1-6) e incluyen la proteína Rybp o su parólogo Yaf2, junto a otras subunidades adicionales que dependen de la proteína Pcgf que constituye el complejo. La cuantificación del número de moléculas de cada proteína Pcgf junto a Cbx7 y Rybp ha permitido determinar que **el complejo más abundante en ESCs es el cPRC1** (constituido por Pcgf2 y Cbx7). Dentro de los complejos vPRC1 el que tiene una mayor presencia en ESCs es el Pcgf6-vPRC1 seguido de Pcgf1-vPRC1 y Pcgf3/Pcgf5-vPRC1 (Huseyin and Klose, 2021).

A pesar de que todos los tipos de complejos PRC1 poseen el mismo dominio RING1, la actividad catalítica de cada uno de ellos difiere considerablemente. Así, **la actividad ubiquitin-ligasa de los complejos vPRC1 es mucho mayor que la de los complejos canónicos** (Fursova et al., 2019; Gao et al., 2012), observación que se ha asociado a la presencia de la proteína Rybp que estimula significativamente la actividad E3 ligasa del complejo (Rose et al., 2016). Sin embargo, aunque el complejo **cPRC1** contribuye mínimamente a la represión ejercida por H2AK119ub1, **éste tiene**

un claro papel en el control de la organización espacial de los dominios Polycomb en el núcleo celular (véase sección 2.2.2.4), generando lo que se conoce como *Polycomb bodies* (cuerpos Polycomb) (Cavalli, 2015; Kundu et al., 2017; Schoenfelder et al., 2015).

2.2.2.2.- Reclutamiento de los complejos Polycomb a sus dianas

Los complejos Polycomb tienen una capacidad intrínseca para unirse e interactuar directamente con nucleosomas. Sin embargo, diversos estudios muestran que estas proteínas se encuentran enriquecidas de forma específica en promotores y otros elementos reguladores (Ku et al., 2008; Loubiere et al., 2020; Tanay et al., 2007), lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de reclutamiento más complejos.

Basándose en estudios en *D. melanogaster*, se ha propuesto que **los PRCs pueden ser reclutados mediante factores que se unen a secuencias específicas del DNA (Figura 2.3A)**. Sin embargo, los estudios que han identificado algún factor que medie este tipo de reclutamiento en mamíferos son todavía limitados. Un ejemplo de ello es el dímero Mga-Max asociado a Pcgf6-vPRC1 que reconoce secuencias *E-box* que guían el reclutamiento del complejo (Scelfo et al., 2019). Del mismo modo, el complejo Pcgf3-vPRC1 es capaz de unirse a sus dianas mediante interacción con los factores de transcripción Usf1/2 asociados a sitios *E-box* (Scelfo et al., 2019). **Un mecanismo alternativo que se ha sugerido para el reclutamiento de estas proteínas implica la acción de RNAs largos no codificantes (*long non-coding RNAs*, lncRNAs) asociados a la cromatina (Figura 2.3B)**. Este tipo de mecanismo se ejemplifica en la inactivación del cromosoma X en mamíferos, mediada por el lncRNA XIST involucrado en el reclutamiento de Polycomb (Almeida et al., 2017). Tras esta observación, otros lncRNAs han sido propuestos como reclutadores de Polycomb en autosomas (Kaneko et al., 2014a; Kaneko et al., 2010; Somarowthu et al., 2015), como es el caso del lncRNA HOTAIR que interactúa con Ezh2 (Kaneko et al., 2010). Otros estudios recientes sugieren que **el reclutamiento de los complejos Polycomb puede estar mediado por *R-loops***, estructuras DNA-RNA generadas por la hibridación de RNA naciente con la cadena de DNA (Figura 2.3B) (Alecki et al., 2020; Skourti-Stathaki et al., 2019). Sin embargo, a pesar de que parece evidente que, en casos específicos, estos mecanismos pueden contribuir al reclutamiento de

Polycomb, éstos no son suficientes para explicar cómo se recluta a todas sus dianas para dar lugar a dominios Polycomb.

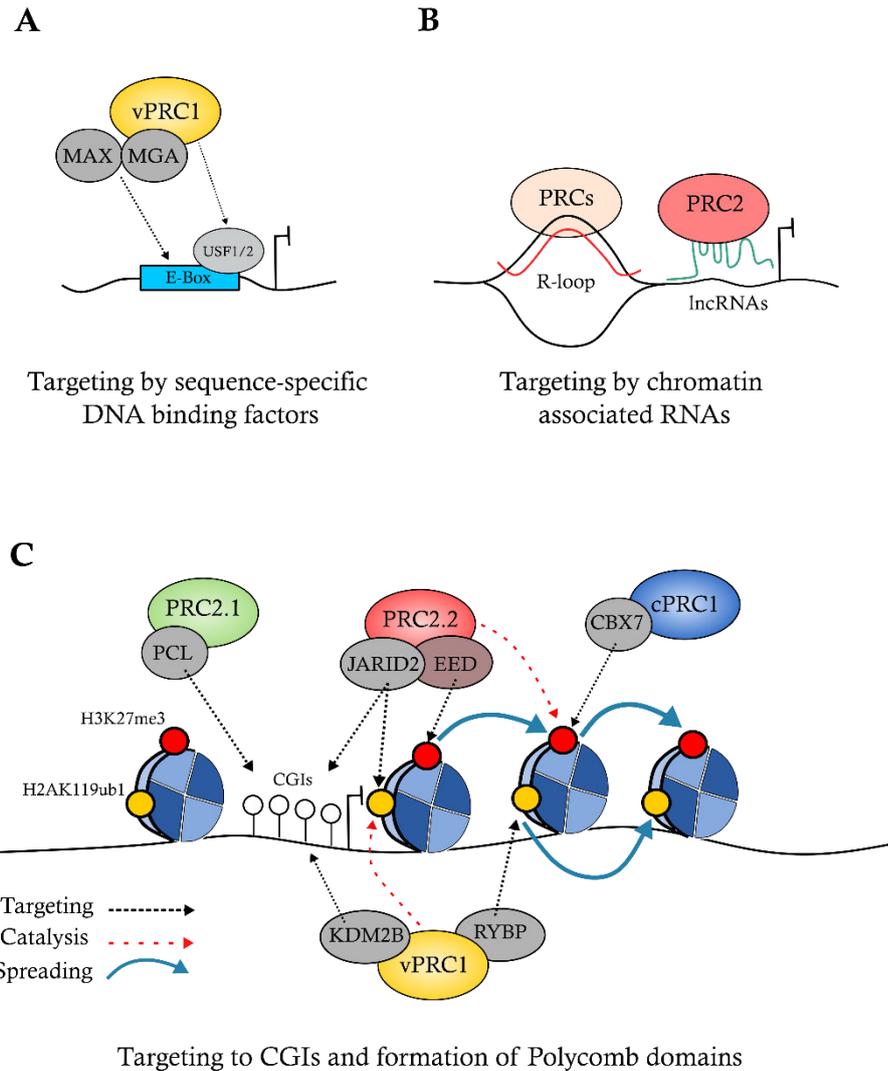


Figura 2.3. Reclutamiento de los PRCs a sus regiones diana. *A)* Ejemplos de mecanismos de reclutamiento dependientes de factores que se unen a secuencias específicas del DNA. *Pcgf6-vPRC1* puede ser reclutado a través del dímero *Max-Mga* que reconoce secuencias *E-Box* en el DNA y *Pcgf3-vPRC1* se recluta mediante la interacción con los factores de transcripción *Usf1/2* que se unen a regiones *E-Box* (Scelfo et al., 2019). *B)* Mecanismos de reclutamiento asociados a RNAs. El reclutamiento de los PRCs puede estar mediado por estructuras DNA-RNA (*R-loops*) que se generan por la hibridación de RNA naciente con la cadena de DNA (Alecki et al., 2020), así como por la interacción con RNAs largos no codificantes (Kaneko et al., 2014a; Kaneko et al., 2010). La línea roja representa el RNA en un *R-loop* y la línea verde un *lncRNA*. *C)* Formación de dominios Polycomb mediante reclutamiento a través de islas CpG y comunicación entre PRCs. Las islas CpG sirven como punto de anclaje y reclutamiento de diferentes complejos Polycomb como *PRC2.1* a través de *Pcl*, *PRC2.2* a través de *Jarid2* y *Pcgf1-vPRC1* a través de *Kdm2b*. La marca de *H2AK119ub1* catalizada por *vPRC1* es reconocida por *Jarid2*, lo que impulsa el reclutamiento de *PRC2.2* que cataliza la marca *H3K27me3*. Esta marca es reconocida a su vez por *Cbx7* (*cPRC1*) posibilitando el reclutamiento de este complejo. Además, tanto *PRC2* como *PRC1* contienen proteínas que reconocen las propias marcas catalizadas por el complejo (*Eed* y *Rybp* respectivamente) lo que promueve el autoreclutamiento de ambos complejos y la propagación de las marcas de histonas (flecha azul). La flecha negra punteada señala la acción de reclutamiento, la flecha roja punteada indica reacción catalítica y la flecha azul hace referencia a propagación de la marca catalizada. Los círculos segmentados en azul representan los nucleosomas y los círculos sobre ellos las marcas de histonas indicadas. Los lollipop blancos representan las citosinas no metiladas en islas CpG.

Los primeros estudios acerca de los PRCs ya revelaron la vinculación de estos complejos con islas CpG (Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007), sugiriendo que estas **regiones ricas en CGs no metiladas podían resultar esenciales para que los complejos Polycomb identifiquen sus regiones diana**. Actualmente, múltiples evidencias moleculares apoyan esta hipótesis (Figura 2.3C). Un ejemplo de ello es el reclutamiento a la cromatina de Pcgf1-vPRC1 a través de la proteína Kdm2b incluida en este complejo. Esta demetilasa contiene un dominio *zinc-finger* que se une específicamente a dinucleótidos CG no metilados, guiando así la unión de Pcgf1-vPRC1 a estas regiones (Blackledge et al., 2014; Farcas et al., 2012). Recientemente, se ha descrito que las proteínas Pcl, comprendidas dentro del complejo PRC2.1, también reconocen de forma directa islas CpG mediante un dominio *winged-helix* con preferencia por estas secuencias (Li et al., 2017; Perino et al., 2018). Del mismo modo, también se ha reportado la capacidad de Jarid2 para reclutar PRC2.2 asociándose a regiones de DNA ricas en CGs (Blackledge et al., 2015; Li et al., 2010).

Estos mecanismos de reclutamiento específicos de secuencia ilustran cómo PRC2 y PRC1 son reclutados individualmente a sus sitios diana. Sin embargo, tras ser reclutados a la cromatina, **las funciones de PRC2 y PRC1 están íntimamente relacionadas**, influyendo la actividad de cada complejo en la ocupación del otro, lo que impulsa el establecimiento de dominios Polycomb (Figura 2.3C). En este sentido, varios estudios centrados en entender cómo se comunican entre sí los diferentes PRCs, han revelado que el anclaje de PRC1 a la cromatina es suficiente para reclutar PRC2, promoviendo la acumulación de H3K27me3 y la formación de dominios Polycomb (Blackledge et al., 2014; Cooper et al., 2016b). Esta actividad es exclusiva de los complejos vPRC1 debido a su capacidad para ubiquitinar H2AK119 (Rose et al., 2016). El nexo entre H2AK119ub1 y PRC2 radica en la capacidad de Jarid2 para unirse directamente a esta marca, estimulando simultáneamente la capacidad catalítica de PRC2 (Cooper et al., 2016b; Kalb et al., 2014). La importancia de este vínculo vPRC1-PRC2.2 es patente en ensayos en los que se altera la actividad de vPRC1, desencadenando una reducción masiva de PRC2 unido a la cromatina y por tanto de la marca H3K27me3 (Blackledge et al., 2014; Fursova et al., 2019; Sugishita et al., 2021). Además, el reclutamiento de vPRC1 se retroalimenta positivamente gracias a la capacidad de unión directa de Rybp a la marca H2AK119ub1 (Arrigoni et al., 2006; Kalb et al., 2014).

A pesar de que el reclutamiento de PRC2 recae en mayor medida en la actividad de vPRC1, este complejo también es capaz de reclutarse a sí mismo mediante la unión a la propia marca que cataliza (H3K27me3) a través de Eed, lo que origina cambios alostéricos que estimulan la actividad metiltransferasa de Ezh2 (Lee et al., 2018a; Margueron et al., 2009). De este modo, la activación de PRC2 induce un mecanismo de retroalimentación que permite la propagación de la marca H3K27me3 por la cromatina (Oksuz et al., 2018), excepto cuando la subunidad catalítica es Ezh1, incapaz de propagar esta marca por sí sola (Lavarone et al., 2019). Sin embargo, la trimetilación de H3K27 no solo tiene un papel en el reforzamiento de la unión de PRC2, sino que también sirve como anclaje para el reclutamiento del complejo cPRC1 a través de la subunidad Cbx, lo que establece una comunicación directa entre PRC2 y cPRC1 (Boyer et al., 2006; Min et al., 2003).

2.2.2.3.- Control del establecimiento de dominios Polycomb

Teniendo tan solo en cuenta los diferentes mecanismos de reclutamiento por los que Polycomb localiza sus sitios diana, podríamos esperar que los PRCs fueran capaces de establecer dominios Polycomb en todos los sitios del genoma donde se cumplieran las condiciones anteriormente descritas, como por ejemplo la presencia de islas CpG, las cuales aparecen asociadas al 70% de los promotores en mamíferos (Deaton and Bird, 2011). Sin embargo, el establecimiento de estos dominios enriquecidos simultáneamente en PRC2, PRC1, H3K27me3 y H2AK119ub1 tan solo tiene lugar en un pequeño subconjunto de sitios en el genoma en ESCs (Kloet et al., 2016). Así, por ejemplo, el reclutamiento de Pcgfl-vPRC1 se detecta en la mayoría de las islas CpG del genoma y, sin embargo, aún teniendo en cuenta la capacidad de este complejo para iniciar el reclutamiento de otros PRCs, tan solo en el 20% de estas dianas se establece un dominio Polycomb (Farcas et al., 2012; Fursova et al., 2019), sugiriendo que otros mecanismos regulan este proceso.

Los niveles de transcripción de los genes diana de Polycomb son un pilar fundamental en el establecimiento de dominios Polycomb. Esto se ha demostrado, por ejemplo, mediante el tratamiento con inhibidores de la transcripción, lo que promueve estabilización de la unión de PRC2 y un incremento de la marca H3K27me3 en cientos de sitios CpG de genes activos (Riising et al., 2014). Esto es claramente compatible con el hecho de que los niveles de expresión de los genes

diana de estos complejos sean extremadamente bajos o indetectables. De acuerdo con esto, el reclutamiento y formación de dominios Polycomb a islas CpG sintéticas solo tiene lugar cuando estos sitios están lejos de elementos potenciadores de la transcripción o carecen de sitios asociados a activadores transcripcionales (Jermann et al., 2014).

La relación entre establecimiento de dominios Polycomb y transcripción va, sin embargo, más allá de estas observaciones. El complejo PRC2 es capaz de asociarse de forma directa con RNAs nacientes, con efectos opuestos que han sido objeto de debate. Por una parte, varios estudios han demostrado que el RNA naciente compite con la unión de PRC2 y lo desplaza de la cromatina, al mismo tiempo que inhibe su actividad metiltransferasa, mediante interacción directa RNA-proteína con el sitio catalítico de Ezh1/2 (Figura 2.4) (Beltran et al., 2016; Kaneko et al., 2014b; Wang et al., 2017b; Zhang et al., 2019). En contraste, como se ha comentado anteriormente, otros estudios sugieren que los RNAs nacientes son necesarios para el reclutamiento de PRC2 mediante la formación de *R-loops* (Alecki et al., 2020; Skourti-Stathaki et al., 2019) y, por tanto, tras inhibir la transcripción o mutar el sitio de interacción de PRC2 con el RNA, se ve afectado el reclutamiento y la localización de este complejo en el genoma (Long et al., 2020). Estos efectos contradictorios concilian en un “*RNA-bringing model*” o “**modelo de puente de RNA**”, en el que niveles bajos de transcripción promueven el reclutamiento de PRC2 y la deposición de H3K27me3, mientras que el aumento de la transcripción por encima de determinados niveles genera una situación en la que los transcriptos nacientes compiten con PRC2 por la unión a la cromatina. Este modelo proporciona un doble papel para la actividad de PRC2: el reclutamiento de PRC2 durante la inactivación del gen y la expulsión durante la reactivación del gen o en los loci no diana de PRC2 (Long et al., 2020).

El contexto de la cromatina también ejerce un papel fundamental en la regulación de la formación de dominios Polycomb. De este modo, así como las propias marcas establecidas por los complejos Polycomb sirven como punto de anclaje para promover la propagación y establecimiento de estos dominios, otras marcas de histonas restringen este proceso (Figura 2.4). Estudios han demostrado que la presencia de las marcas H3K4me3 y H3K36me2/3 disminuyen la actividad metiltransferasa de PRC2 (Finogenova et al., 2020; Klymenko and Müller, 2004;

Schmitges et al., 2011; Streubel et al., 2018; Yuan et al., 2011) mientras que, por el contrario, la eliminación de H3K4me3 promueve la formación de dominios Polycomb (Mas et al., 2018). Además de las modificaciones postraduccionales de histonas, otro ejemplo se centra en el remodelador de cromatina BRG1, el cual es capaz de expulsar activamente a vPRC1 de los promotores de genes activos limitando la deposición de la marca H2AK119ub1 en estos promotores (Weber et al., 2021).

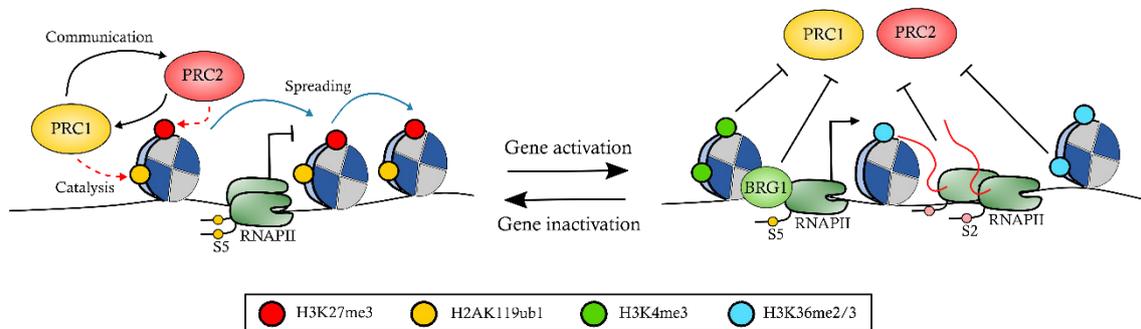


Figura 2.4. Mecanismos de control del establecimiento de dominios Polycomb. Los complejos Polycomb sensan constantemente posibles sitios diana, pero el acceso a ellos depende del contexto de la cromatina. En un gen activo (derecha) la actividad metiltransferasa de PRC2 se ve mermada por la presencia de RNA naciente (representado en líneas rojas) que inhibe su actividad catalítica y la presencia de las marcas H3K4me3 (verde) y H3K36me2/3 (azul). En este contexto, se ha sugerido también que remodeladores de cromatina como BRG1 son capaces de expulsar activamente a los complejos Polycomb. Cuando el gen se inactiva (izquierda) se reducen los niveles de RNA naciente lo que permite un mejor reclutamiento de PRC2 en base a un “modelo de puente de RNA” donde niveles más bajos RNA naciente actúan también como reclutadores a través de R-loops. En este contexto de inactividad transcripcional, el reclutamiento de los PRCs permite el establecimiento de las marcas H3K27me3 (rojo) y H2AK119ub1 (amarillo) lo que promueve la comunicación entre complejos y la propagación de las marcas para el establecimiento de un dominio Polycomb.

Todos estos mecanismos regulan la formación de dominios Polycomb en función del contexto del loci del genoma al que son reclutadas las proteínas Polycomb. De este modo, se ha sugerido que **los PRCs sensan constantemente un amplio rango de potenciales sitios diana**, siendo tan solo aquellos con bajos niveles de transcripción susceptibles de ser modificados y por tanto de iniciar la cascada de reclutamiento derivada de la íntima comunicación existente entre PRCs para un establecimiento eficiente de estos dominios (Klose et al., 2013; Long et al., 2020). Así, **este sistema podría servir para proteger a los genes inactivos frente a señales de activación inapropiadas y mantener la represión génica** (Blackledge and Klose, 2021).

2.2.2.4.- Polycomb como regulador de la estructura de la cromatina

Los complejos Polycomb regulan expresión génica a través de modificaciones de histonas y reclutamiento de otros complejos, al mismo tiempo que **alteran la estructura tridimensional de la cromatina mediante interacciones entre dominios Polycomb**, incluso entre diferentes cromosomas, formando lo que se ha denominado como *Polycomb bodies*. El complejo PRC1 es el responsable de mediar estas interacciones, organizando el genoma en redes tridimensionales, de las cuales la más fuerte se compone de los cuatro clusters de genes *Hox* y genes de factores de transcripción asociados a desarrollo en ESCs (Figura 2.5) (Eskeland et al., 2010; Schoenfelder et al., 2015). Durante diferenciación, estos dominios de interacción

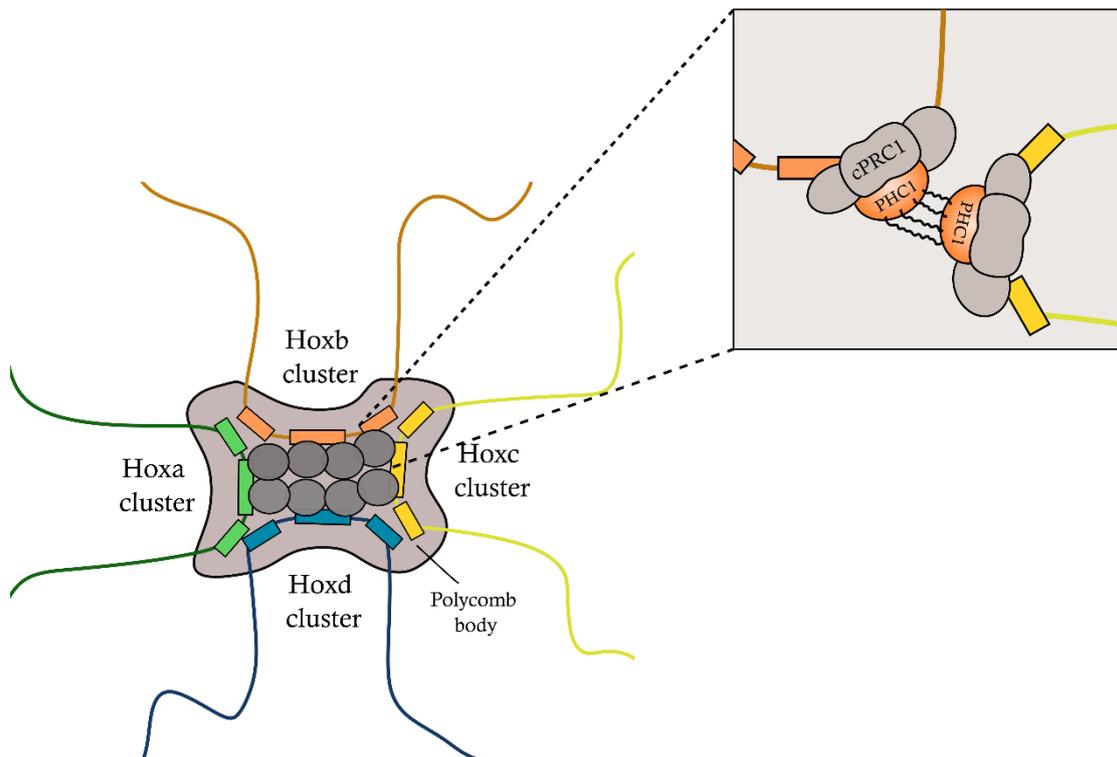


Figura 2.5. cPRC1 media interacciones tridimensionales de cromatina. Esquema de la red tridimensional compuesta por los cuatro clusters de genes *Hox* (*Hoxa* (verde), *Hoxb* (naranja), *Hoxc* (amarillo) y *Hoxd* (azul)) cuyas interacciones están mediadas por cPRC1, conformando lo que se ha denominado como *Polycomb bodies*. Los círculos grises representan los complejos Polycomb. Se representa una ampliación (derecha) de cómo se ha sugerido que cPRC1 media estas interacciones entre regiones de cromatina (Isono et al., 2013; Kim et al., 2002). Las proteínas *Phc* que conforman este complejo poseen dominios SAM que son capaces de polimerizar entre sí formando largos filamentos (líneas negras) que conectan tridimensionalmente diferentes regiones de cromatina.

cambian, al mismo tiempo que las dianas de PRC1 se modifican, dando lugar a una nueva arquitectura de la cromatina (Kundu et al., 2017). **La formación de interacciones entre dominios es independiente de H2AK119ub1 y está mediada de forma específica por cPRC1.** La capacidad de establecer estas interacciones recae en la actividad de las proteínas Phc que conforman este complejo (Eskeland et al., 2010; Kundu et al., 2017), cuyos dominios SAM son capaces de polimerizar entre sí formando largos filamentos (Figura 2.5) (Isono et al., 2013; Kim et al., 2002). Cómo estos filamentos mantienen las interacciones 3D de la cromatina aún no se conoce con exactitud, pero se hipotetiza que sirven como puentes dinámicos entre dominios Polycomb (Belaghzal et al., 2021; Blackledge and Klose, 2021; Huseyin and Klose, 2021).

2.2.2.5.- Represión transcripcional mediada por Polycomb

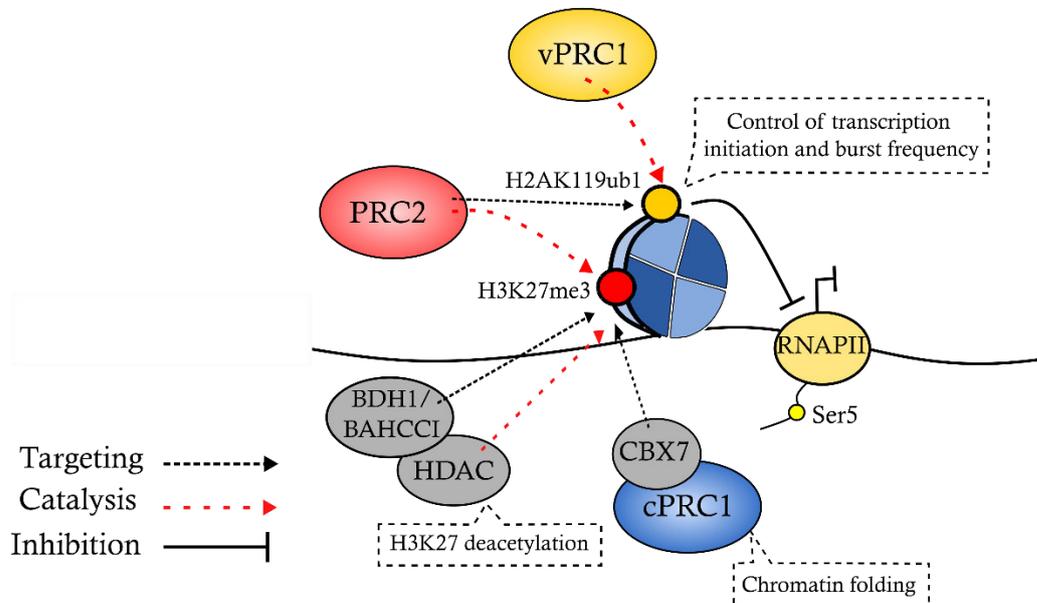
Los complejos represores Polycomb alteran el estado de la cromatina a través de su actividad catalítica, bien estableciendo marcas en las histonas o bien de forma independiente de su actividad catalítica, mediando interacciones entre regiones de cromatina que dificultan la actividad de remodeladores de cromatina y activadores transcripcionales (Kundu et al., 2017). Esta actividad tiene efectos patentes en la transcripción de los genes diana, sin embargo, la contribución de cada uno de los complejos y marcas en esta regulación sigue siendo objeto de estudio.

El complejo PRC2 es capaz de catalizar la mono-, di- y trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me1/2/3) (Lavarone et al., 2019). Mientras que la H3K27me1 principalmente se deposita en los cuerpos de genes activos, la di y trimetilación se asocia mayoritariamente a regiones reprimidas y promotores (Ferrari et al., 2014). Este escenario hace tambalear la clásica visión de PRC2 como represor transcripcional, haciendo necesario conceptualizar la capacidad represora de este complejo dentro del contexto de la cromatina que regula. Así, mientras que la marca H3K27me2 aparece ampliamente distribuida por regiones reprimidas de cromatina, la trimetilación se concentra principalmente en promotores reprimidos altamente enriquecidos en proteínas del complejo PRC2 (Lavarone et al., 2019). Esto está de acuerdo con el hecho de que la triple catálisis es más lenta y requiere de un mayor tiempo de unión del complejo (Yap et al., 2011). Por tanto, **la principal PTM catalizada por PRC2 asociada con represión génica a nivel de promotor es la**

trimetilación de la H3K27. Diversos modelos que tratan de explicar cómo los dominios Polycomb reprimen transcripción, centran su atención en el papel de esta marca. Ésta se posiciona como antagonista de la modificación activadora H3K27ac, por lo que la alteración de la H3K27me3 promueve una hiperacetilación de la cromatina, lo que condiciona la identidad de la célula (Lavarone et al., 2019; Pasini et al., 2010b). Además, sirve como punto de reclutamiento de otros reguladores de cromatina como BAHD1 y BAHCC1, que interactúan como deacetilasas de histonas (HDACs) (Fan et al., 2021; Fan et al., 2020), o el complejo canónico de PRC1 a través de Cbx7 en ESCs, que actúa compactando la cromatina y, por tanto, limitando el acceso de elementos reguladores de la transcripción (Figura 2.6) (Eskeland et al., 2010; Kundu et al., 2017; Schoenfelder et al., 2015). Sin embargo, **los efectos en la expresión de los genes diana tras alterar PRC2 y, por consiguiente, H3K27me3 y cPRC1 no son muy severos**, exhibiendo cambios de expresión significativos en un número relativamente bajo de genes, ~200/2400 genes dianas de PRC2 (Lavarone et al., 2019; Pasini et al., 2010a; Petracovici and Bonasio, 2021) y ~70/2300 genes diana de cPRC1 (Dimitrova et al., 2021; Fursova et al., 2019; Kundu et al., 2017). **Esto sugiere que la represión de los genes asociados a dominios Polycomb no recae tan solo en la actividad de PRC2 y su marca asociada, ni en la función de cPRC1.**

En línea con esto, estudios recientes centran su atención en el papel de vPRC1 como represor central a través de la catálisis de la marca H2AK119ub1 (Fursova et al., 2019; Sugishita et al., 2021). Esto es evidente al interrumpir en ESCs la actividad de PRC1 mutando las subunidades catalíticas del complejo (Ring1a/b), tras lo que se observa un claro aumento de la expresión de cientos de dianas de Polycomb (~3000 genes), efecto que resulta prácticamente dependiente de vPRC1 (Fursova et al., 2019). Resultados similares se obtienen cuando se muta de forma específica el sitio catalítico de PRC1, lo que sugiere que **PRC1 media represión a través de la marca H2AK119ub1** (Blackledge et al., 2014; Blackledge et al., 2020; Endoh et al., 2012; Tamburri et al., 2020). Un estudio muy reciente muestra además que, tras eliminar PRC1, los efectos en la expresión génica son claros tan solo 2 horas después, asociado a una caída drástica de H2AK119ub1. En contraste, dos horas después de deplecionar PRC2, no se detectan cambios significativos en la expresión génica (Dobrinić et al., 2021), lo que permite especular que el complejo capaz de responder más rápido ante alteraciones en la transcripción para iniciar la represión es vPRC1 a

través de H2AK119ub1 y que los mecanismos de reclutamiento de PRC2 derivados de esta actividad podrían servir para dar robustez al sistema y mantener la represión en escalas más largas de tiempo (Dobrinić et al., 2021; Miller et al., 2021).



Polycomb synergistic repression

Figura 2.6. Polycomb media represión a través de diferentes mecanismos. Esquema de algunos de los mecanismos por los que los PRCs reprimen sus promotores diana. PRC2 cataliza la marca H3K27me3 en los promotores a los que se une, la cual sirve de anclaje para el complejo cPRC1 que media represión a través de la compactación de cromatina. A su vez, la marca H3K27me3 también es reconocida por reguladores de cromatina (BDH1/BAHCCI) que interactúan con deacetilasas de histonas (HDACs), evitando la acetilación de la H3K27, asociada con activación transcripcional. La marca H2AK119ub1 catalizada por vPRC1 ejerce represión a través del reclutamiento de PRC2 y mediante el control de la maquinaria de transcripción, regulando el inicio de la transcripción y la frecuencia con la que se producen los eventos de transcripción. La flecha negra punteada señala la acción de reclutamiento, la flecha roja punteada indica una reacción catalítica y la flecha negra barrada inhibición.

Cómo la marca H2AK119ub1 interviene a nivel molecular para mediar represión transcripcional aún está por determinar, sin embargo, no parece tener relación con su papel reclutador de PRC2 (Dobrinić et al., 2021). Algunos estudios, sin embargo, apuntan hacia la posibilidad de que esta **ubiquitinización de la histona H2A impida directamente la función de la maquinaria de transcripción** (Lehmann et al., 2012). En esta línea, la marca H2AK119ub1 parece estar implicada en restringir la elongación de la RNAPII, favoreciendo en el promotor la presencia de la conformación de la polimerasa fosforilada en la serina 5 (Ser5-RNAPII) incapaz de iniciar elongación (Brookes et al., 2012; Stock et al., 2007). En consecuencia, la eliminación de PRC1 y por tanto de la H2AK119ub1, induce una reducción de esta

conformación de polimerasa, junto con un aumento de la polimerasa total y de la conformación fosforilada en la serina 2 (Ser2-RNAPII), con capacidad de elongar (Dobrinić et al., 2021; Stock et al., 2007). Asociado a esto, se ha apuntado recientemente que **PRC1 y H2AK119ub1 están implicados en controlar la frecuencia con la que se producen eventos de transcripción**, lo que sugiere un papel claro en el control del inicio de la transcripción (Figura 2.6). Sin embargo, a pesar de que la alteración de PRC1 aumenta la frecuencia de eventos, no aumenta el número de transcritos producidos en cada evento (Dobrinić et al., 2021), lo que concuerda con que los niveles de expresión no alcancen los de un gen activo en ausencia de PRC1. Esto sugiere que **las actividades represoras de los diferentes complejos Polycomb no están completamente ligadas** (Zepeda-Martinez et al., 2020), y que la convergencia de éstos en dominios promueve que esta actividad independiente conforme un sistema de represión robusto en el que la sinergia entre complejos podría ser esencial para asegurar unos niveles de expresión apropiados antes de que el gen transicione a un estado activo durante diferenciación.

3.- Epigenética y ciclo celular en mESCs

3.1.- El ciclo celular pluripotente

Las mESCs se caracterizan por una **capacidad de proliferación extraordinaria asociada con un ciclo celular corto en comparación con células diferenciadas**. *In vivo*, las células del blastocisto preimplantacional de ratón se dividen cada 5 horas (Snow, 1977), un poco más rápido que sus homólogos *in vitro*, en las que el ciclo celular dura alrededor de 12 horas, lo que contrasta con células somáticas como, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de ratón, que tardan en dividirse 24 horas (Figura 3.1) (Liu et al., 2019). Este acortamiento en el tiempo de división en células pluripotentes se asocia a la reducción de la duración de las fases de “gap”, G1 y G2, lo que hace que estas células permanezcan la mayor parte del tiempo replicando el DNA (fase de síntesis o S) y dividiéndose (fase de mitosis o M) (White and Dalton, 2005). **Durante las primeras etapas de diferenciación, sin embargo, la tasa proliferativa disminuye y el ciclo celular se reestructura**, alargándose la fase G1, que pasa de 3 horas de duración en mESCs a alrededor de 11 horas tras diferenciarse (Figura 3.1) (Liu et al., 2019; Stead et al., 2002). Sorprendentemente, esto sucede también a la inversa, cuando reprogramamos células diferenciadas hasta el estadio de célula madre, reduciéndose de nuevo la duración de la fase G1 (Guo et al., 2014). Esta estructura única en la organización del ciclo en células pluripotentes cuestiona si se trata simplemente de un reflejo de la necesidad de dividirse rápidamente en los primeros estadios del desarrollo para expandir la población celular o si realmente esta configuración juega un papel esencial en el mantenimiento del estado de pluripotencia.

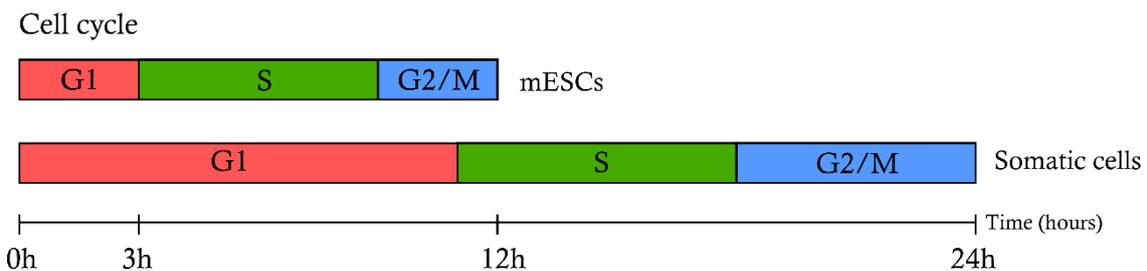


Figura 3.1. Fases y duración del ciclo celular en mESCs *in vitro*. Esquema que compara la duración del ciclo celular de mESCs (arriba) y células somáticas (abajo). El ciclo celular pluripotente en ratón dura aproximadamente 12 horas y muestra un acortamiento de las fases G1 (rojo) y G2 (azul). Tras la diferenciación,

la fase G1 se alarga pasando de 3 horas a 11 horas de duración, lo que supone una duración total de ciclo de aproximadamente 24 horas en células somáticas.

3.1.1.- Mecanismos de regulación del ciclo celular en mESCs

El ciclo celular eucariota se regula y coordina a través de la fosforilación y desfosforilación de diversos sustratos que controlan la transición a través de las diferentes fases que lo conforman, promoviendo eventos como la replicación del DNA, la segregación de los cromosomas o la citocinesis. Cada fase del ciclo tiene asociada una proteína kinasa que regula los distintos sustratos requeridos para transicionar a eventos específicos de ciclo (Sherr and Roberts, 2004). Estas proteínas son conocidas como kinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent protein kinases*, Cdk) y forman complejos con ciclinas que se acumulan y se degradan periódicamente, activando o inactivando las Cdk durante ventanas específicas de tiempo (Figura 3.2A) (White and Dalton, 2005). En células somáticas, la transición de G1 a S se regula a través del complejo Ciclina E-Cdk2, el cual fosforila e inactiva las proteínas del retinoblastoma (RB). Esta inactivación permite, a su vez, la activación del factor de transcripción E2F que controla la expresión de factores necesarios para la transición a fase S (Figura 3.2B) (Liu et al., 2019). Este paso, conocido como punto de restricción (*R point*), es crítico para la célula ya que es en el que se decide la continuidad a través del ciclo y la proliferación celular o, en caso contrario, la entrada en un estado quiescente o fase G0 (Pardee, 1974). Es por ello, que también se encuentra estrechamente regulado por inhibidores de Cdk, que actúan en respuesta a señales fisiológicas como daño en el DNA o deprivación de factores de crecimiento, con el fin de restringir la división celular (Besson et al., 2008). Más adelante en el ciclo, la ciclina A comienza a expresarse y forma complejos con Cdk1 y Cdk2 promoviendo la progresión a través de fase S manteniendo la fosforilación de RB (Figura 3.2B). Tras fase G2, la ciclina B trasloca al núcleo y se acompleja con Cdk1 para dirigir la entrada en mitosis (Gavet and Pines, 2010; Satyanarayana and Kaldis, 2009).

En mESCs, los mecanismos que controlan la progresión a través del ciclo celular varían notablemente respecto a lo observados en células somáticas, especialmente en lo que se refiere al control de la transición entre G1 y S. Estas células manifiestan unos niveles de expresión superiores de las ciclinas A, E y B, las

cuales presentan unos patrones de actividad diferentes a los observados en células somáticas. Las ciclinas A y E exhiben una perfil de expresión constante a lo largo del ciclo, mientras que la ciclina B mantiene la periodicidad durante fase M. Las ciclinas D, sin embargo, se expresan a niveles bajos en células pluripotentes (Figura 3.2C). Como consecuencia, los complejos Ciclina A/E-Cdk2/1 aparecen activos de forma continua durante el ciclo celular y, por tanto, la proteína RB permanece constitutivamente hiperfosforilada y los genes regulados por E2F constantemente activos (Liu et al., 2019). Además, las mESCs se caracterizan también por la **ausencia de actividad de los inhibidores de Cdks**, contribuyendo así a la actividad continua de las Cdks que mantienen inactiva la ruta RB (Savatier et al., 1994; Stead et al., 2002), lo que explica la **rápida transición de G1 a S** existente en células madre. Consistente con esto, el triple KO de las proteínas RB (RB^{p105}, RBL1^{p107} y RBL2^{p130}) no tiene consecuencias en la proliferación de estas células (Sage et al., 2000), confirmando que **el R point no es crítico en mESCs**.

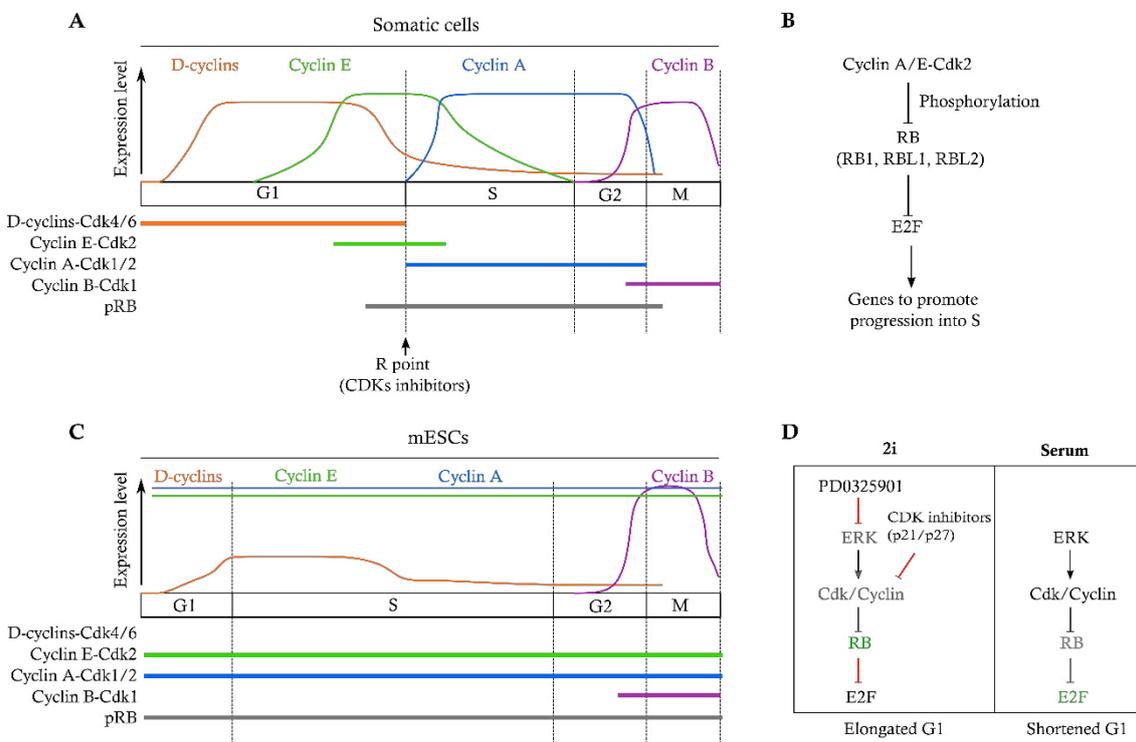


Figura 3.2. Regulación molecular del ciclo celular somático y pluripotente. *A)* Esquema que ilustra las oscilaciones en la expresión de ciclinas (arriba), en qué momento del ciclo se forman los diferentes complejos Cdk-ciclina (abajo) y se fosforila la proteína del retinoblastoma (pRB, gris) en células somáticas. La flecha indica cuándo tiene lugar el punto de restricción (R-point), regulado por inhibidores de Cdks. Figura adaptada de (Liu et al., 2019). *B)* Flujo que representa cómo sucede a nivel molecular la transición de G1 a S en células somáticas. Las ciclinas A/E unidas a Cdk2 son capaces de fosforilar la proteína del retinoblastoma (RB), la cual queda inhibida impidiendo que reprima E2F. La actividad de E2F promueve la expresión de genes que inducen la progresión a través de fase S. *C)* Esquema que ilustra las oscilaciones en la expresión de ciclinas (arriba), en qué

momento del ciclo se forman los diferentes complejos Cdk-ciclina (abajo) y se fosforila la proteína del retinoblastoma (pRB, gris) en mESCs. En estas células se aprecia una expresión constante de las ciclinas A y E por lo que RB permanece fosforilada constantemente y, por tanto, la progresión de G1 a S se produce en un corto periodo de tiempo. La ciclina B es la única ciclina que muestra un patrón oscilatorio en mESCs. Figura adaptada de (Liu et al., 2019). D) Esquemas de flujo que representan los mecanismos moleculares que diferencian la regulación de ciclo celular de mESCs cultivadas en medio 2i y en medio con suero. En suero (derecha) la ruta ERK promueve la activación de complejos de Cdk-ciclina que mantienen fosforilada RB lo que lleva a una activación constante de E2F, haciendo que la fase G1 en células cultivadas en esta condición sea más corta. En medio 2i, el inhibidor PD0325901 inhibe la ruta ERK por lo que E2F no está activa de forma continua y, por tanto, la progresión de G1 a S se ve enlentecida. Por ello, las células cultivadas en 2i exhiben una fase G1 más larga. Además, en esta condición se expresan inhibidores de Cdks que actúan de forma dependiente de ciclo reduciendo los niveles de fosforilación de RB. Figura adaptada de (Ter Huurne et al., 2017).

Sin embargo, estos mecanismos que gobiernan el control del ciclo celular en mESCs son manifiestos específicamente en células cultivadas en FBS/LIF. **El ciclo celular en células cultivadas en medio 2i/LIF muestra, por el contrario, ciertas diferencias** que hacen que la fase G1 sea más larga en células creciendo en presencia de los dos inhibidores en comparación con las crecidas en suero. El inhibidor CHIR99021 activa la ruta de señalización Wnt, la cual disminuye la tasa de proliferación, explicando en parte por qué estas células muestran una fase G1 más larga (De Jaime-Soguero et al., 2017). Además, en 2i/LIF, no solo se expresan inhibidores de Cdks como P16, P21 o P27 que actúan de forma dependiente de ciclo reduciendo los niveles de fosforilación de RB, sino que también el inhibidor PD0325901 inhibe la ruta de señalización ERK, que en su forma activa promueve la activación de Cdk/ciclinas (Figura 3.2D) (Ter Huurne et al., 2017). Estas diferencias en la estructura de ciclo en células creciendo en diferentes medios y que, al mismo tiempo, retienen la misma capacidad de diferenciación, evidencian la necesidad de entender el comportamiento de las mESCs creciendo *in vitro* en diferentes condiciones en comparación directa con las células pluripotentes del embrión *in vivo*.

Además de las diferencias en el ciclo derivadas de las condiciones de cultivo, la regulación del ciclo celular en células madre embrionarias humanas también es ligeramente diferente en comparación con sus homónimas murinas. Como las mESCs, las hESCs proliferan rápidamente, exhiben una fase G1 corta y expresan niveles altos de Cdk2 y Cdk1 (Becker et al., 2006; Dalton, 2015). Sin embargo, estas células expresan niveles mayores de ciclinas D, presentan actividad de inhibidores de Cdks y muestran fluctuaciones en la regulación de Cdk2 por lo que, en consecuencia, la proteína RB se muestra activa o inactiva de forma dependiente de ciclo (Neganova et al., 2009). Esto sugiere que, de ser esta estructura y regulación del ciclo celular

primordial para regular la salida de pluripotencia, los mecanismos que regulan esta salida en ambas especies pueden ser ligeramente diferentes, lo que evidencia de nuevo la necesidad de tener cautela a la hora de extrapolar resultados entre ambos modelos.

Esta regulación de ciclo celular diferente en células madre embrionarias de humano y ratón no es específico tan sólo de éstas, sino que también aparece en otras especies. Las células pluripotentes de mosca, rana, pez cebra o mono también muestran características similares, con una alta capacidad proliferativa acompañada de una fase G1 corta (Edgar and Lehner, 1996; Fluckiger et al., 2006; Heasman, 2006; Yarden and Geiger, 1996). **Esto sugiere la existencia de una conexión entre ciclo celular y pluripotencia o diferenciación.** Sin embargo, las implicaciones biológicas de esta estructura de ciclo celular pluripotente siguen aún siendo objeto de debate y poco se conoce aún sobre la relación con pluripotencia.

3.2.- Ciclo celular y salida de pluripotencia

En las últimas décadas, muchos autores han tratado de entender la relación entre la maquinaria de ciclo celular y pluripotencia en ESCs. Diversos artículos sugieren que **las proteínas de ciclo son capaces de reforzar el estado pluripotente.** Mutantes para Cdk2, Cdk1 y ciclinas E y B pierden la pluripotencia y manifiestan diferenciación espontánea, tal como sucede tras el uso de inhibidores de Cdks. Por el contrario, un aumento de la expresión de estas ciclinas promueve la autorrenovación (Filipczyk et al., 2007; Neganova et al., 2009; Wang et al., 2017c; Zhang et al., 2011). Sin embargo, la interpretación de estos experimentos puede resultar confusa al producir arresto celular (Dalton, 2015). A nivel molecular, se ha reportado una relación directa entre los complejos Cdk-ciclina específicos de G1 (D y E) y los factores que conforman el *core* de pluripotencia en ESCs. Estas kinasas fosforilan directamente los factores Oct4, Sox2 y Nanog estabilizándolos. Como consecuencia, la depleción de estas kinasas resulta en hipofosforilación de estos factores lo que induce su degradación por el proteosoma, atenuando el estado de pluripotencia. En cambio, esta supresión no tiene efectos en la proliferación celular (Liu et al., 2017). En el sentido inverso, se ha postulado que Oct4 estimula la proliferación celular inhibiendo la expresión del inhibidor de Cdks p21 en mESCs (Lee et al., 2010) y, en

hESCs, Nanog se une de forma directa a los locus de los genes de ciclo celular Cdk6 y Cdc25, aumentando su expresión y promoviendo también proliferación (Zhang et al., 2009).

Más allá de estos estudios en los que se asocia mantenimiento del estado de pluripotencia con maquinaria de ciclo celular, otros estudios han revelado que **la capacidad de las ESCs para salir de este estado es dependiente de fase de ciclo celular**. La primera vez que se describió una posible relación entre ciclo celular y salida de pluripotencia fue en 1987 en ensayos con células EC donde se observó que, en presencia de ácido retinoico, las células en fase G1 eran más propensas a diferenciarse (Mummary et al., 1987). Tras ello, numerosos estudios han tratado de extrapolar estos resultados a ESCs. Los primeros ensayos tratando de observar el mismo fenómeno en estas células se llevaron a cabo interfiriendo directamente con la maquinaria de ciclo celular mediante inhibidores de Cdk2 o el uso de RNAs de interferencia en hESCs (Filipczyk et al., 2007; Neganova et al., 2009). Sin embargo, a pesar de que estos estudios muestran resultados similares a los obtenidos en ECCs, no se puede descartar que la inducción de la diferenciación específica en G1 no sea consecuencia del arresto de ciclo. Posteriormente, Sela y colaboradores mostraron que hESCs separadas mediante elutriación también tenían **mayor tendencia a diferenciarse en fase G1** (Sela et al., 2012). No obstante, la separación por fases de ciclo con esta técnica es limitada (Boward et al., 2016), lo que plantea la necesidad de encontrar otra técnica que haga más fiables estos resultados.

Por ello, los últimos estudios emplean el **sistema *Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicator* (FUCCI) para separar células en fracciones de ciclo** mediante FACS, basándose en su posición dentro del ciclo celular a través del uso de proteínas fluorescentes cuya expresión es dependiente de fase (Figura 3.3) (Sakaue-Sawano et al., 2008). El sistema FUCCI emplea el balance de expresión/degradación de las proteínas Cdt1 y Geminina que se expresan en G1 y S/G2 respectivamente. En fase G1 se expresa una proteína fluorescente fusionada a Cdt1 que posteriormente será ubiquitinada y degradada por el proteosoma durante S y G2. Por el contrario, en las fases S y G2, la proteína Geminina fusionada a otra proteína fluorescente comienza a expresarse y se degrada una vez las células transicionan a fase G1 en un nuevo ciclo, lo que permite distinguir células en los diferentes estadios del ciclo y separarlas por citometría. Con esta técnica, se ha observado, tanto en mESCs como en hESCs,

que las células en fase G1 tienen menor tendencia a formar colonias pluripotentes tras inducir diferenciación (Calder et al., 2013; Coronado et al., 2013) en contraste con las células en S y G2. Además, Pauklin y colaboradores han sugerido que en fase G1 las hESCs son más propensas a expresar marcadores de linaje a tiempos cortos ante señales de diferenciación mediante PCR cuantitativa (Pauklin and Vallier, 2013). De forma complementaria, se ha observado que durante S y G2 las células son más propensas a restringir la disolución del estado pluripotente, siendo la fase G1 más permisiva para iniciar diferenciación (Gonzales et al., 2015). Estas observaciones indican que **G1 representa una ventana de oportunidad donde las ESCs responden más eficientemente a señales de diferenciación y, por tanto, son más competentes para diferenciarse**. Sin embargo, aunque todo apunta a que existe una relación entre ciclo celular y salida de pluripotencia en G1, conocer los mecanismos que definen esta relación siguen siendo una prioridad para entender cómo las ESCs toman la decisión de autorrenovarse o diferenciarse tras la salida de mitosis.

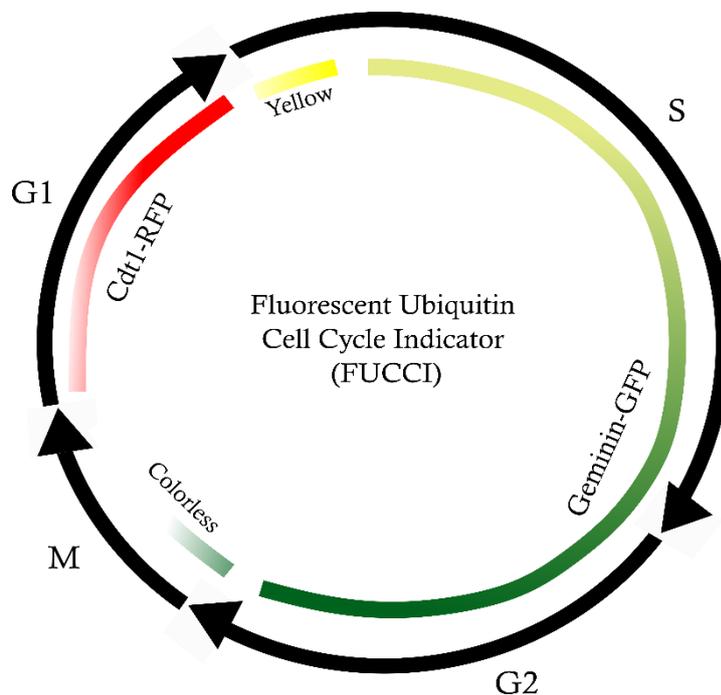


Figura 3.3. El sistema FUCCI para separar células por ciclo celular. El sistema *Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicator (FUCCI)* se basa en la fusión de proteínas que se expresan y se degradan de forma dependiente de fase de ciclo (*Cdt1* en G1 y *Geminina* en S/G2) con proteínas fluorescentes. Esto nos permite visualizar, en base a la presencia de una proteína fluorescente, la fase del ciclo en la que se encuentran las células y separarlas mediante citometría de flujo. En este ejemplo, las células transicionando a través de fase G1 expresarían *Cdt1* fusionado a una proteína roja fluorescente (RFP), mientras que durante S y G2 mostrarían un color verde asociado a la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada con *Geminina*. En la transición entre fase G1 y S se observan células dobles positivas (amarillo), ya que comienza a visualizarse *Geminina-GFP*

mientras aún no se ha degradado completamente Cdt1-RFP. Durante mitosis, ambas proteínas se degradan por lo que no se observa color.

3.2.1.- Mecanismos que regulan la salida de pluripotencia en G1

Comprender cómo, a nivel molecular, se regula el inicio de diferenciación o salida de pluripotencia de forma específica en fase G1 se presenta como un proceso complejo debido a que los mecanismos que lo gobiernan parecen funcionar a distintos niveles de regulación. Así, mientras que algunos autores han sugerido que el control de este proceso viene mediado de manera directa por la maquinaria de ciclo celular, otros proponen que esta regulación sucede a nivel epigenético.

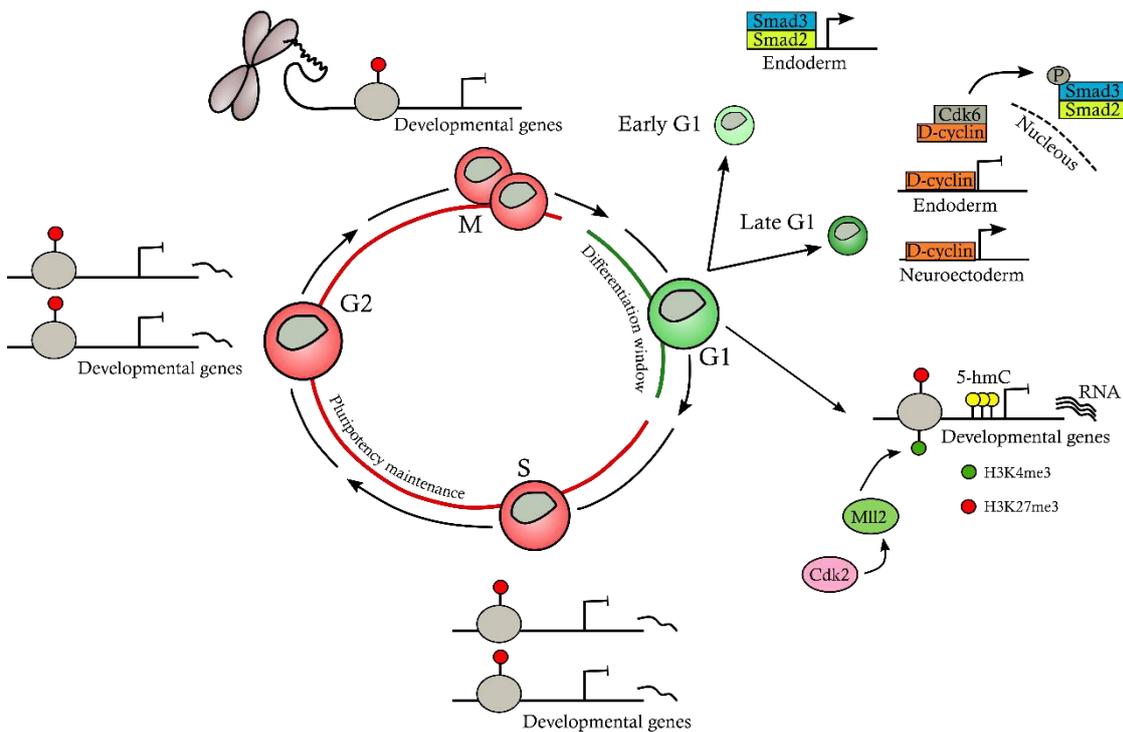


Figura 3.4. Mecanismos que regulan la salida de pluripotencia en G1. Esquema que muestra algunos de los mecanismos moleculares que se han propuesto para explicar cómo se regula la salida pluripotencia y diferenciación durante fase G1 en hESCs. Uno de los modelos propuestos se basa en la acción de la ciclina D1 que divide la fase G1 en dos etapas: G1 temprana, donde la ciclina D1 aún no se expresa en hESCs y Smad2/3 promueve diferenciación a endodermo, y G1 tardía, donde la ciclina D1 comienza a expresarse e inhibe lo genes del linaje a endodermo y favorece la diferenciación a neuroectodermo, al mismo tiempo que bloquea la traslocación al núcleo de Smad2/3. Otros mecanismos propuestos se basan en modificaciones epigenéticas y apuntan a la marca H3K4me3 (verde) principalmente enriquecida en G1, depositada a través de la acción de Mll2, que se activa por Cdk2 (Singh et al., 2015). Sin embargo, hay que tener en cuenta que otros estudios muestran resultados contradictorios (Grandy et al., 2016). Los datos actuales apuntan, por otro lado, que los niveles de la marca H3K27me3 parece ser constantes durante el ciclo celular (Grandy et al., 2016; Singh et al., 2015). En G1 también se ha sugerido un aumento de la marca 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) en el DNA de los promotores (Singh et al., 2013), aunque en este caso también se han reportado datos contradictorios que sugieren que esta marca es estable en las diferentes fases del ciclo en mESCs (Bachman et al., 2014).

En cuanto a **regulación mediada por maquinaria de ciclo celular**, Pauklin y colaboradores han propuesto que la salida de pluripotencia en G1 en hESCs se rige de forma directa a través de las ciclinas D1-3. Estos autores distinguen dos partes en fase G1, G1 temprana y G1 tardía, y muestran que las células tienden a diferenciarse a endodermo durante fase G1 temprana, donde las ciclinas D aún no se expresan y los factores Smad2 y Smad3 pueden traslocar al núcleo y activar genes específicos de endodermo, mientras que la tendencia a diferenciarse a neuroectodermo es mayor en fase G1 tardía, cuando las ciclinas D comienzan a expresarse formando complejos D-cyclin-Cdk6 que participan en la fosforilación de Smad2/3 que bloquea la entrada de éstos al núcleo (Figura 3.4) (Pauklin and Vallier, 2013). La activación de genes de neuroectodermo en esta fase tardía parece mediada directamente por la ciclina D1 que es capaz de reclutar coactivadores a genes de este linaje, mientras que, al mismo tiempo, participa en la represión de los genes específicos de endodermo (Pauklin et al., 2016).

Esta regulación mediada por ciclinas podría coincidir con **cambios en la bivalencia asociada a los genes de desarrollo embrionario** en hESCs (Figura 3.3). Singh y colaboradores sugieren mediante ChIP-qPCR dirigida a los promotores *Gata6* y *Sox17* en células separadas mediante el sistema FUCCI que la marca activadora H3K4me3 se acumula principalmente en fase G1, al mismo tiempo que la histona metiltransferasa que cataliza esta marca, Mll2, que se activa específicamente en esta fase mediante fosforilación por Cdk2 (Singh et al., 2015). Esta acumulación de H3K4me3 y Mll2 en G1 podría ser consistente con que, en análisis de gen candidato, lo **genes del desarrollo se transcriban a niveles basales más altos durante fase G1 en condiciones de autorrenovación** (Singh, 2015; Singh et al., 2013). Sin embargo, este estudio hecho en genes candidatos no es suficiente para afirmar que H3K4me3 y Mll2 están reguladas a lo largo del ciclo celular. Otro trabajo en hESCs muestra, por el contrario, resultados contradictorios indicando que el enriquecimiento de la marca H3K4me3 no cambia entre G1 y G2 mediante ChIP-seq, mientras que observan un incremento durante mitosis (Grandy et al., 2016). Por otra parte, el análisis de H3K27me3 no muestra cambios aparentes en la deposición de esta marca a lo largo del ciclo celular en hESCs, tanto en genes candidatos (Singh et al., 2015) como en análisis de genoma completo (Grandy et al., 2016), donde se señala que los niveles de H3K27me3 se mantienen estables entre G2 y G1 e incluso

durante mitosis en genes bivalentes. Junto a esto, se ha analizado también la metilación del DNA a lo largo del ciclo celular con la finalidad de entender si existe relación entre salida de pluripotencia y esta marca epigenética. En concreto, los estudios que muestran datos en relación a esta marca, analizan la 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), asociada con inicio de activación génica (Szulwach et al., 2011). Sin embargo, a pesar de que Singh y colaboradores señalan que a nivel global esta marca cambia a lo largo del ciclo en hESCs, otro estudio propone que esta marca es constante durante el ciclo celular en mESCs (Bachman et al., 2014). Es evidente, por tanto, que se requieren más estudios que asienten bases más robustas en relación a cómo se distribuyen y se propagan todas estas marcas epigenéticas a través del ciclo celular para poder comprender si tienen relación con salida de pluripotencia a lo largo del ciclo celular.

Estos mecanismos y asociaciones entre ciclo y pluripotencia indican que esta forma de regulación de ciclo celular específico de células pluripotentes puede asociarse directamente a capacidad de autorrenovación y salida de pluripotencia. Sin embargo, cómo la maquinaria de ciclo responde a las señales de diferenciación y cómo se traslocan estas señales a nivel de regulación epigenética siguen sin entenderse actualmente. Además, **la mayor parte de los mecanismos reportados han sido estudiados en hESCs, lo que manifiesta la necesidad de realizar estudios centrados en otras células pluripotentes, como mESCs**, donde las ciclinas D apenas se expresan y no existe regulación de ciclo de las ciclinas E y A. Esto permitirá entender más ampliamente por qué y cómo estas células inician diferenciación específicamente en fase G1 y qué relación hay entre regulación de ciclo celular y salida de pluripotencia.

3.3.- Regulación Polycomb a través del ciclo celular

El sistema de regulación epigenética ejercido por las proteínas Polycomb en ESCs se posiciona, no solo como necesario para el mantenimiento de la represión de los genes de desarrollo y el control de inicio de diferenciación, sino también como un punto clave para el mantenimiento de la identidad celular a través del ciclo celular y tras mitosis. Esto plantea claramente la cuestión de cómo los dominios Polycomb se mantienen a través del ciclo celular tras la fase replicativa o S, si existe relación entre

la maquinaria de ciclo celular y la actividad de Polycomb y cómo las marcas catalizadas por estos complejos se transmiten a la progenie durante mitosis.

3.3.1.- Mantenimiento y propagación de dominios Polycomb tras replicación

Durante fase S, la célula replica el material genético, lo que implica la actuación de maquinaria de replicación, la cual desplaza los nucleosomas parentales del DNA e incorpora nuevas histonas no modificadas al mismo tiempo que reincorpora las histonas parentales en la hebra hija (Stewart-Morgan et al., 2020). Este proceso desafía el mantenimiento de los dominios Polycomb y las marcas de histonas asociadas.

A pesar de que los mecanismos de comunicación inherentes a los complejos Polycomb (*véase sección 2.2.2.2*) podrían ser suficientes para copiar y mantener estos dominios, esto requeriría que los nucleosomas parentales se situaran exactamente en la misma posición en las hebras hijas (Blackledge and Klose, 2021). **Estudios recientes muestran que la metilación de la histona 3 se incorpora rápidamente en las histonas nuevas tras la replicación** (Escobar et al., 2019; Reverón-Gómez et al., 2018), lo que sugiere una potencial explicación sobre cómo se mantienen estos dominios. Sin embargo, la velocidad con la que se incorpora la marca depende de si se trata de una mono-, di- o tri- metilación, siendo las dos primeras más rápidas en incorporarse a las nuevas histonas ya que son independientes de secuencia, mientras que establecer una marca de trimetilación parece ser un proceso un poco más lento y que requiere una unión más estable de PRC2 dependiente de secuencia (Alabert et al., 2020; Jadhav et al., 2020). Es por ello, que se ha sugerido que esta marca se diluye tras replicación (Alabert et al., 2015; Jadhav et al., 2020). Sin embargo, esto contrasta con el hecho de que **los complejos Polycomb viajan con la maquinaria de replicación** (Alabert et al., 2020) y con estudios que sugieren que la reincorporación de la H3K27me3 a la cromatina tras replicación se produce rápidamente y de forma simultánea a la incorporación de las nuevas histonas (Hansen et al., 2008; Petruk et al., 2017). Todos estos datos, cuestionan si los mecanismos de retroalimentación de Polycomb contribuyen realmente al mantenimiento de los dominios Polycomb tras replicación. En cualquier caso, sigue siendo de gran importancia entender en más detalle la cinética del restablecimiento de estos dominios durante replicación y cómo la marca H2AK119ub1 se mantiene a través del ciclo celular tras fase S.

3.3.2.- Conexión entre regulación Polycomb y ciclo celular

La actividad de las proteínas Polycomb se ha asociado en numerosos estudios con la maquinaria de ciclo celular. Esta asociación se ha hecho en ambos sentidos: Polycomb regula directa o indirectamente maquinaria de ciclo y la maquinaria de ciclo regula la actividad de Polycomb. Esta regulación recíproca a diferentes niveles la convierte en una regulación compleja que ha sido objeto de estudio, principalmente, por las implicaciones que tiene en proliferación celular y progresión del cáncer.

Un ejemplo claro de **regulación de ciclo mediada por Polycomb**, es el locus supresor de tumores Ink4a/Arf/Ink4b que codifica para el estabilizador de p53, Arf, y para los inhibidores de Cdks p16^{Ink4a} y p15^{Ink4b} (Kim and Sharpless, 2006). La expresión de los productos de este locus resulta por tanto esencial para controlar la proliferación celular y ha sido descrito como un locus regulado por Polycomb. En células diferenciadas se ha mostrado como mutaciones en proteínas Polycomb como *Cbx7* o *Pcgf4* promueven un aumento de la expresión de este locus y condicionan drásticamente la progresión a través de fase S (Gil et al., 2004; Jacobs et al., 1999). En células madre hematopoiéticas (*hematopoietic stem cells*, HSCs) y neurales (*neural stem cells*, NSCs) la mutación de *Pcgf4* deriva en fallos de autorrenovación y dificulta el mantenimiento de estas células en cultivo, asociados a un aumento de la expresión de este locus (Bruggeman et al., 2005; Park et al., 2003). Además, en embriones de ratón, la mutación de *Ring1b* provoca fallos en gastrulación que parecen asociados con el locus Ink4a/Arf/Ink4b, ya que la inactivación genética de éste recupera parcialmente el fenotipo de estos embriones (Voncken et al., 2003). Junto a esto, se ha descrito que la regulación de los genes homeóticos o *Hox* por Polycomb también es esencial para una correcta progresión a través de ciclo, ya se ha sugerido que estos genes *Hox* están implicados en el control de la proliferación celular. Como ejemplo, en HSCs humanas, la mutación de *Pcgf2* provoca un aumento de la expresión de *Hoxb4* que induce arresto en fase G0 (Kajiume et al., 2004).

Por otra parte, en el sentido contrario, otros estudios describen cómo **la maquinaria de ciclo regula de forma directa la actividad de Polycomb**. De este modo, la capacidad catalítica y el reclutamiento de PRC2 parece estar regulado por

Cdks (Figura 3.5). En concreto, Cdk1 es capaz de fosforilar Ezh2 en la treonina 345 (Thr345) en células diferenciadas humanas, lo que promueve el reclutamiento del complejo mediante interacción con lncRNAs (Chen et al., 2010; Kaneko et al., 2010) durante fase G2. Además, Cdk1 asociado específicamente a ciclina B en mitosis fosforila Ezh2 en la Thr487 lo que provoca que se desestructure el complejo (Wei et al., 2011; Wu and Zhang, 2011). Por otra parte, la Aurora B kinasa que se activa al inicio de mitosis parece tener también un papel en el reclutamiento de PRC2, ya que ésta fosforila la H3Ser28, justo el residuo adyacente a la K27 metilada por Ezh2, lo que se ha sugerido que provoca una disminución del reclutamiento de PRC2 basado en el reconocimiento de su propia marca (Gehani et al., 2010).

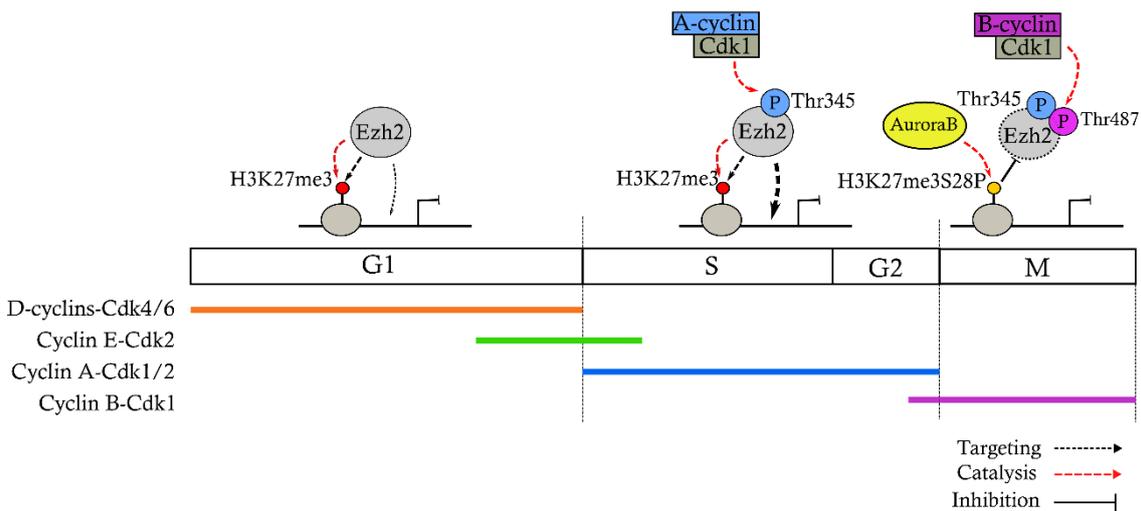


Figura 3.5. La maquinaria de ciclo regular regula directamente la actividad de Polycomb en células somáticas. Esquema del ciclo celular en células somáticas humanas en el que se representan las diferentes fases del ciclo, los complejos Cdk-ciclina que están presentes en cada etapa (abajo) y cómo PRC2 está regulado por la maquinaria de ciclo en cada fase (arriba). En G1, Ezh2 cataliza la marca H3K27me3, pero el reclutamiento a los promotores diana es menor que durante las fases S y G2, cuando el complejo Ciclina A-Cdk1 fosforila Ezh2 en la treonina 345 (Thr345) promoviendo el reclutamiento del complejo. Tras la entrada en mitosis, el complejo Ciclina B-Cdk1 fosforila Ezh2 en la treonina 487 (Thr487) desestructurando el complejo, al mismo tiempo que la Aurora B kinasa fosforila la Ser28 de la H3 lo que conlleva a un impedimento estérico que disminuye el reclutamiento de PRC2. La flecha negra punteada señala la acción de reclutamiento, la flecha roja punteada indica una reacción catalítica y la flecha negra barrada inhibición.

Todas estas asociaciones entre Polycomb y maquinaria de ciclo dan una idea más o menos clara de que la **regulación epigenética mediada por los PRCs sobre los genes de desarrollo embrionario puede ser dependiente del contexto de ciclo celular en el que se encuentre la célula, lo cual sugiere la posibilidad de que estos complejos estén regulando salida de pluripotencia dependiente de fase ciclo.** En cualquier caso, pocos estudios existen actualmente que asocien de forma específica

maquinaria de ciclo con Polycomb en ESCs y, teniendo en cuenta que el ciclo celular en estas células tiene un comportamiento diferente al observado en células somáticas, la extrapolación de resultados de células somáticas a pluripotentes no resulta sencillo ni adecuado. Por tanto, se requieren estudios específicos en ESCs que impliquen todos los tipos de complejos Polycomb para poder entender realmente cómo éstos están regulados a través del ciclo celular.

Objetivos

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es analizar como los complejos Polycomb regulan sus genes diana en las diferentes fases del ciclo celular en células madre embrionarias de ratón (mESCs). Específicamente, los objetivos propuestos son:

1.- Diseccionar las bases moleculares de la regulación génica ejercida por PRC2 de manera específica de fase de ciclo celular en mESCs.

- 1.1. Establecer la cinética del reclutamiento de los complejos PRC2 a sus genes diana durante las fases G1, S y G2.
- 1.2. Examinar la relación entre el reclutamiento de PRC2 y expresión de RNA en genes dianas durante las fases G1, S y G2.
- 1.3. Estudiar como la falta de función de PRC2 afecta la regulación de los genes diana de manera específica de fase de ciclo celular.

2.- Diseccionar las bases moleculares de la regulación génica ejercida por PRC1 de manera específica de fase de ciclo celular en mESCs.

- 2.1. Establecer la cinética del reclutamiento de los complejos PRC1 a sus promotores diana durante las fases G1, S y G2.
- 2.2. Examinar la relación entre el reclutamiento de PRC1, expresión de RNA e interacciones tridimensionales en genes diana durante las fases G1, S y G2.
- 2.3. Estudiar como la falta de función de PRC1 afecta la regulación de los genes diana de manera específica de fase de ciclo celular.

Resultados

Capítulo I

Estudio de las bases moleculares de la regulación
génica ejercida por PRC2 de manera específica de
fase de ciclo celular en mESCs

1.- El reclutamiento de Ezh2 a los promotores bivalentes incrementa durante las fases S y G2.

Con la finalidad de separar células en las diferentes fases del ciclo para analizar el comportamiento del complejo PRC2 y sus consecuencias a nivel funcional, establecimos una línea celular *wild-type* que expresa de forma estable el sistema *Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicator* (FUCCI). Esto permite obtener, mediante citometría de flujo, poblaciones altamente enriquecidas en células en fase G1 ($83 \pm 2\%$), fase S ($55 \pm 1\%$) y fase G2 ($81 \pm 1\%$) (Figura RI-1A y Tabla RI-1-Anexo I) en base a la expresión de las proteínas fluorescentes Cherry y Citrina en G1 y S-G2, respectivamente (Figura RI-1B).

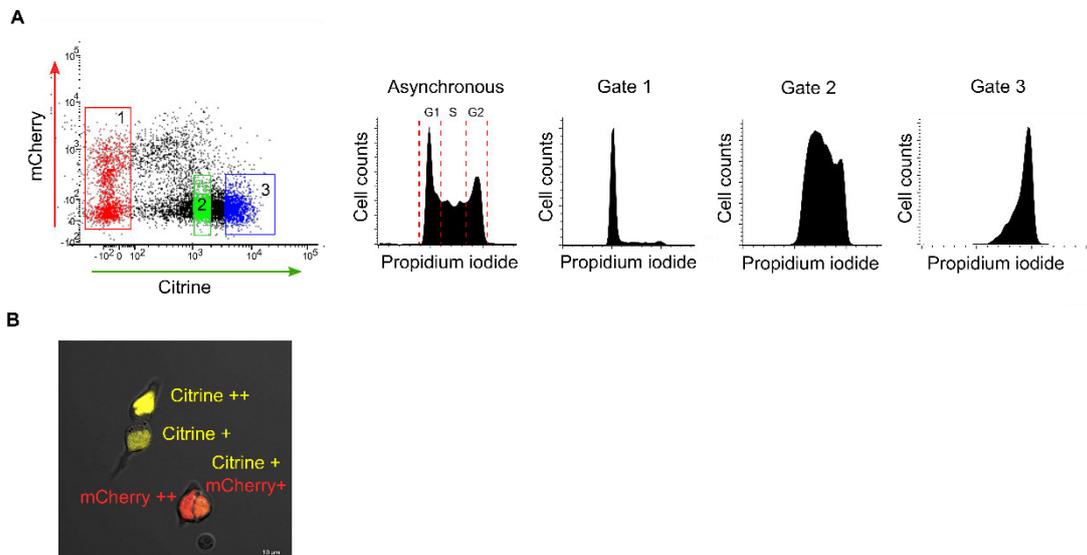


Figura RI-1. El sistema FUCCI para separar células por fase del ciclo celular. A) Gráfico de citometría de células FUCCI-mES donde se indican las poblaciones seleccionadas para obtener fracciones de ciclo celular enriquecidas en G1 (población 1), S (población 2) y G2 (población 3) (izquierda). Las células separadas se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron los perfiles de ciclo de cada fracción por citometría de flujo (derecha). B) Imagen de microscopía de fluorescencia que muestra las FUCCI-mESCs que expresan las combinaciones e intensidades esperadas de Citrine:Geminin y mCherry-hCdt1. La célula mCherry ++ corresponde a fase G1, la mCherry +/Citrine + muestra la transición de G1 a S mientras que las Citrine + y Citrine ++ representan las fases S y G2 respectivamente.

En primer lugar, analizamos la contribución de la subunidad catalítica del complejo PRC2 en la regulación de los genes bivalentes a lo largo del ciclo celular. El análisis *genome-wide* de la unión de Ezh2, mediante inmunoprecipitación de

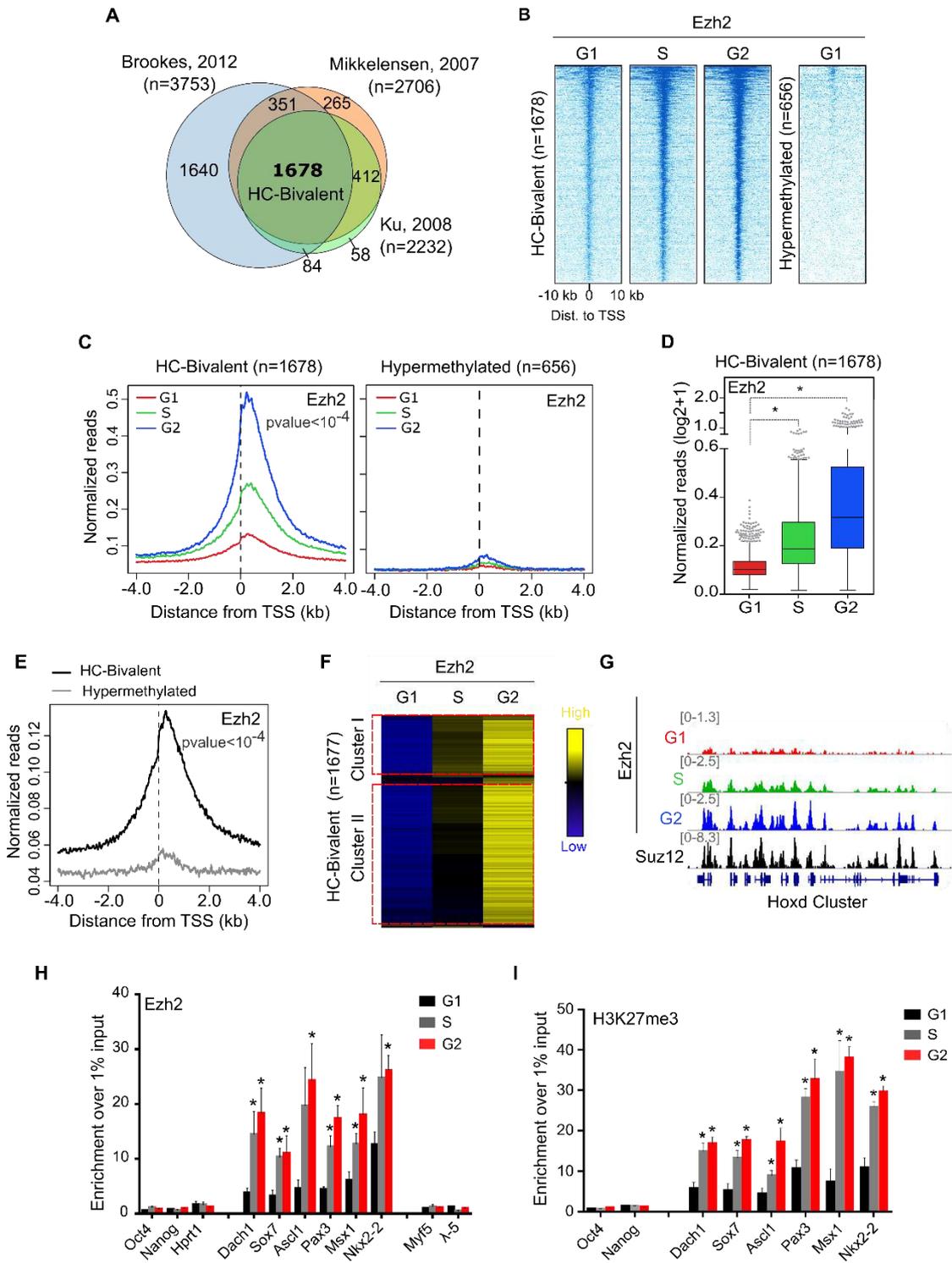


Figura RI-2. El reclutamiento de la subunidad catalítica Ezh2 del core de PRC2 a los genes bivalentes aumenta durante las fases S y G2 del ciclo celular. *A)* Diagrama de Venn de los genes identificados como bivalentes publicados previamente en (Brookes et al., 2012; Ku et al., 2008; Mikkelsen et al., 2007). *B)* Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para Ezh2 alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en las diferentes fases del ciclo celular. El heatmap de los promotores hipermetilados se muestra como control negativo. *C)* Gráfico de unión media de Ezh2 alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). El gráfico de unión media de Ezh2 en promotores hipermetilados se muestra como control negativo. *D)* Cuantificación de la señal de unión de Ezh2 en las regiones promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases del ciclo celular indicadas.

E) Perfil de unión medio de Ezh2 alrededor del TSS en promotores HC bivalentes (negro) e hipermetilados (gris) en fase G1. **F)** Análisis de clustering de la unión de Ezh2 a la región promotora (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases indicadas del ciclo celular. Se presenta la unión relativa a la media. **G)** Vista del visualizador de genoma IGV de los picos de enriquecimiento de Ezh2 en las diferentes fases del ciclo para el grupo de genes Hoxd. La unión a Suz12 se muestra como control utilizando datos publicados (Pasini et al., 2010a). **(H, I)** Histograma que muestra el enriquecimiento de Ezh2 (H) y H3K27me3 (I) en regiones promotoras seleccionadas como dianas de PRC2 (Dach1, Sox7, Ascl1, Pax3, Msx1, Nkx2-2) en G1 (negro), S (gris) y G2 (rojo) analizadas por ChIP-qPCR. Los promotores de genes activos (Oct4, Nanog, Hprt1) e hipermetilados (Myf5, λ-5) se emplearon como controles negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media ± SEM de tres réplicas.

D, H, I. * marca diferencias estadísticamente significativas.

cromatina seguida de secuenciación (ChIP-seq), reveló una prevalencia del reclutamiento de Ezh2 a la cromatina en las fases S y G2 en comparación con la fase G1 (picos de unión de Ezh2: 6316 en G1; 9630 en S; y 15.967 en G2) (Tabla RI-2-Anexo I). Empleando datos publicados, se estableció una lista de genes bivalentes dianas de Polycomb de alta confianza o genes HC bivalentes [*High confidence (HC) bivalent*, n = 1678] para analizar la unión de PRC2 (Figura RI-2A). Como controles, se seleccionaron genes transcripcionalmente activos (n = 1557) e hipermetilados (n = 656) no diana de PRC2 (véase métodos). El análisis mediante *heatmap* de la unión de Ezh2 alrededor del TSS de los genes HC bivalentes muestra que el reclutamiento de esta proteína aumenta cuando las células salen de G1 y transitan por las fases S y G2 (Figura RI-2B). Además, la comparación de la media de unión de Ezh2 entre fases revela que, aunque Ezh2 se acumula alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) en todas las fases del ciclo celular de forma específica en los promotores bivalentes, el número de moléculas de Ezh2 aumenta gradualmente a medida que las células salen de la fase G1 y avanzan por el ciclo celular en interfase (Figuras RI-2C, D). A pesar de que el reclutamiento de Ezh2 en fase G1 puede parecer débil o casi inexistente en comparación con G2 (Figura RI-2C), la presencia de Ezh2 en esta fase es evidente cuando se compara con promotores hipermetilados a los que se sabe que no se une PRC2 (Figura RI-2E). Junto a esto, el análisis de la unión de Ezh2 en promotores individuales muestra una acumulación muy consistente y gradual de Ezh2 durante las fases S y G2 en la mayoría de los promotores de los genes HC bivalentes (1576 de 1677; 93,9%) (véanse *clusters I y II* en la Figura RI-2F), lo que incluye el arquetípico grupo de genes Hoxd (Figura RI-2G). Estas observaciones se han confirmado mediante PCR cuantitativa (qPCR) a través del análisis de un subconjunto de promotores diana de PRC2 previamente caracterizados (Landeira et al., 2010) (Figura RI-2H). Correlativamente, el aumento del reclutamiento de Ezh2

al salir de la fase G1 también da lugar a una acumulación de H3K27me3 en los promotores bivalentes durante las fases S y G2 (Figura RI-2I). Por tanto, se puede concluir que la unión de Ezh2 a los promotores diana está especialmente potenciada a la salida de la fase G1 en mESCs.

2.- Jarid2 y EPOP muestran patrones de reclutamiento inversos a lo largo del ciclo celular.

A continuación, nos planteamos si la acumulación de Ezh2 en promotores bivalentes durante las fases S y G2 refleja un aumento de la unión de PRC2.1, PRC2.2, o ambos. Como sucede con Ezh2, el análisis mediante ChIP-seq de la unión de Jarid2 (complejo PRC2.2) en células FUCCI-mESCs separadas por ciclo celular muestra que el reclutamiento de Jarid2 en la región promotora de los genes HC bivalentes aumenta en las fases S y G2 en comparación con la fase G1 (Figura RI-3A, B, C). Sin embargo, el aumento del reclutamiento de Jarid2 a los genes diana en las fases S y G2, a pesar de que es evidente, es cuantitativamente menos acusado que los cambios encontrados en la unión de Ezh2 a lo largo del ciclo celular (Figura RI-2C). No obstante, el análisis de *clustering* muestra una tendencia muy consistente a la acumulación de Jarid2 en G2 en genes HC bivalentes individuales (1404 de 1677; 83,7%) (ver *clusters I y II* en la Figura RI-3D). Si comprobamos a qué promotores se asocia Jarid2, vemos que se une a la mayoría de los promotores HC bivalentes enriquecidos en Ezh2 en G2 (1188 de 1262; 94%) (Figura RI-3E), y que, además, la unión de Jarid2 y Ezh2 alrededor del TSS de los promotores de genes HC bivalentes en G2 muestra distribuciones concordantes (Figura RI-3F). Junto a esto, el análisis de correlación demuestra que la acumulación de Jarid2 en los genes diana en las fases S y G2 se correlaciona con un mayor reclutamiento de Ezh2 en las mismas regiones promotoras (Figura RI-3G). En regiones individuales (por ejemplo, el gen *Adra2c*) también se observa de forma clara un reclutamiento coordinado de Jarid2 y Ezh2 al salir de la fase G1 (Figura RI-3H). Sin embargo, a pesar de que el aumento de la unión de Jarid2 a los promotores HC bivalentes es claro en G2 en comparación con la fase G1 (Figura RI-3D), los cambios en el reclutamiento de Jarid2 en la fase S son menos homogéneos. La mayoría de los genes HC bivalentes (*cluster I*, 899 genes; 64%) muestran un aumento de la unión de Jarid2 en la fase S en comparación con la

fase G1; sin embargo, el resto de los genes (*cluster II*, 505 genes; 36%) muestran una reducción de la unión de Jarid2 en esta fase del ciclo celular (Figura RI-3D). Este patrón contrasta con el aumento homogéneo de la unión de Ezh2 a los promotores HC bivalentes en la fase S (Figura RI-2F) y sugiere que el reclutamiento de Ezh2 a los genes diana en la fase S podría ser independiente de Jarid2 para este subconjunto de genes bivalentes (*cluster II*).

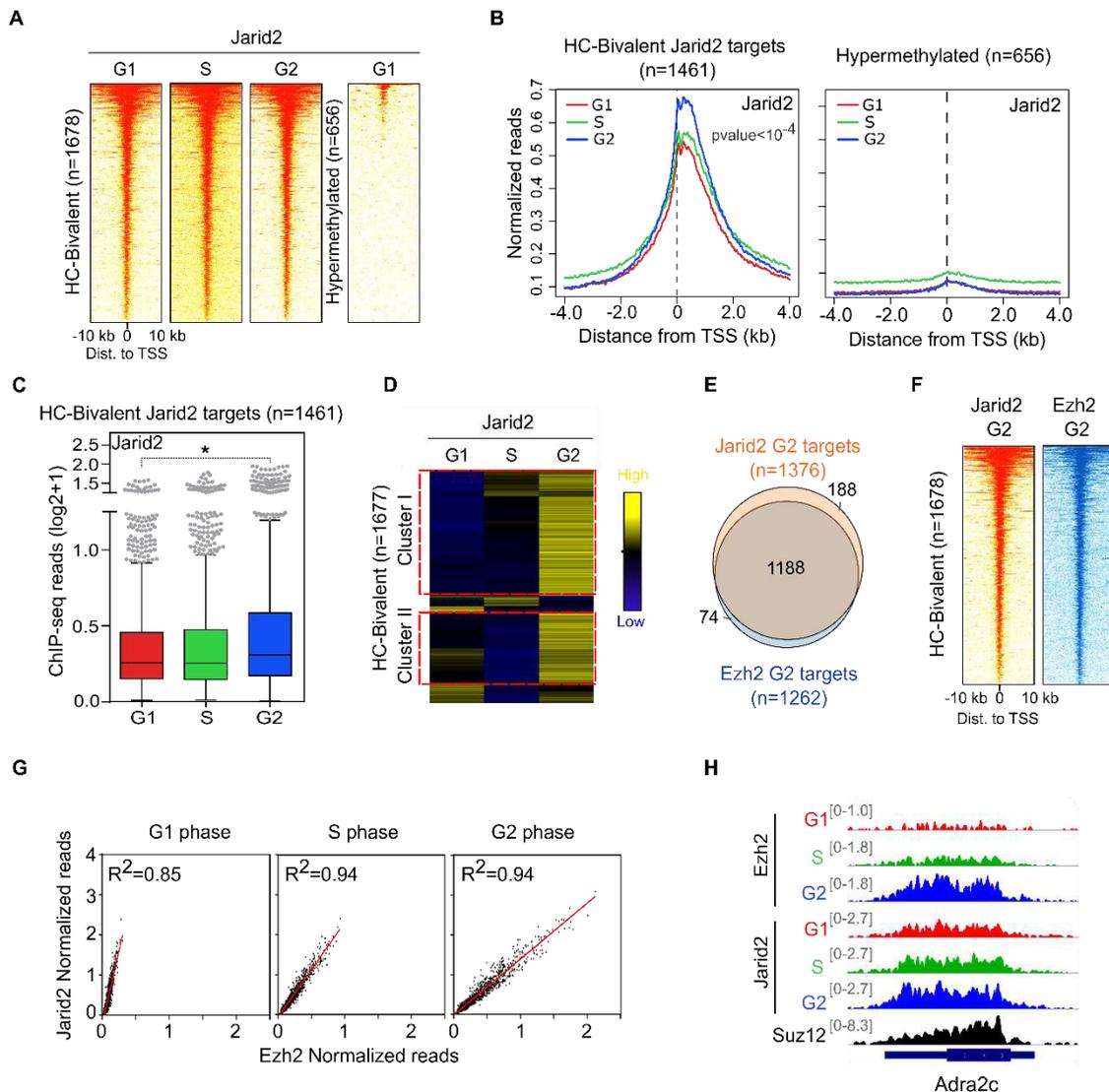


Figura RI- 3. La unión de Jarid2 a los promotores diana aumenta durante las fases S y G2 del ciclo celular. *A)* Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para Jarid2 alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en las diferentes fases del ciclo celular. El heatmap de los promotores hipermetilados se muestra como control negativo. *B)* Gráfico de unión media de Jarid2 alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). El gráfico de unión media de Jarid2 en promotores hipermetilados se muestra como control negativo. *C)* Cuantificación de la señal de unión de Jarid2 en la región promotora (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases del ciclo celular indicadas. *D)* Análisis de clustering de la unión de Jarid2 a la región promotora (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases indicadas del ciclo celular. Se presenta la unión relativa

a la media. **E)** Diagrama de Venn en el que se muestra el solapamiento de los genes diana de Jarid2 y Ezh2 específicos de fase G2. **F)** Heatmaps que comparan la unión de Jarid2 y Ezh2 alrededor del TSS de los promotores de HC bivalentes en fase G2. **G)** Análisis de regresión lineal que muestra la correlación entre las señales de unión de Jarid2 y Ezh2 en promotores HC bivalentes (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) en las fases del ciclo celular indicadas. **H)** Vista del visualizador de genoma IGV de los picos de enriquecimiento de Ezh2 y Jarid2 a lo largo del ciclo celular en el gen bivalente *Adra2c*. La unión de Suz12 se analizó utilizando datos publicados (Pasini et al., 2010a).

A continuación, se llevó a cabo el análisis por ChIP-seq de la unión de la subunidad EPOP, que forma parte del complejo PRC2.1. Asombrosamente, el patrón de unión observado para EPOP contrasta significativamente con el hallado para Ezh2 y Jarid2, detectándose una reducción de unión de esta proteína alrededor del TSS de los genes HC bivalentes durante fase G2 (Figura RI-4A, B, C). El análisis de *clustering* muestra además que el incremento de unión de EPOP en fase G1 en comparación con G2 se puede observar en la mayoría de los promotores de genes bivalentes (1426 de 1677; 85%) (véase el *cluster I* en la figura RI-4D). Este aumento del reclutamiento de EPOP en fase G1 también se visualiza analizando un conjunto representativo de promotores diana de PRC2 mediante ChIP-qPCR (Figura RI-4E). Tras ello, analizamos si el aumento de la unión de EPOP en fase G1 se asociaba con un mayor reclutamiento de EloB en esta fase del ciclo celular. Según lo esperado, el análisis por ChIP-seq muestra que EloB es principalmente reclutada a los genes HC bivalentes en fase G1 en comparación con las fases S y G2 (Figura RI-4F, G, H), lo que se observa también visualizando los genes de forma individual por *clustering* (Figura RI-4I). Los niveles globales de proteína de Ezh2, Jarid2 y EPOP a lo largo del ciclo celular permanecen estables, lo que indica que el reclutamiento diferencial a los genes diana está regulado por cambios en las interacciones proteicas más que por cambios en la abundancia de la proteína (Figura RI-4J, K, L). En conjunto, estos resultados demuestran que el reclutamiento de Jarid2 y Ezh2 aumenta durante las fases S y G2, mientras que EPOP y EloB se unen preferentemente a la cromatina en la fase G1. Esto indica que el complejo PRC2.1 se recluta de forma preferente a los promotores diana durante fase G1, mientras que el reclutamiento del complejo PRC2.2 se ve favorecido principalmente durante las fases S y G2.

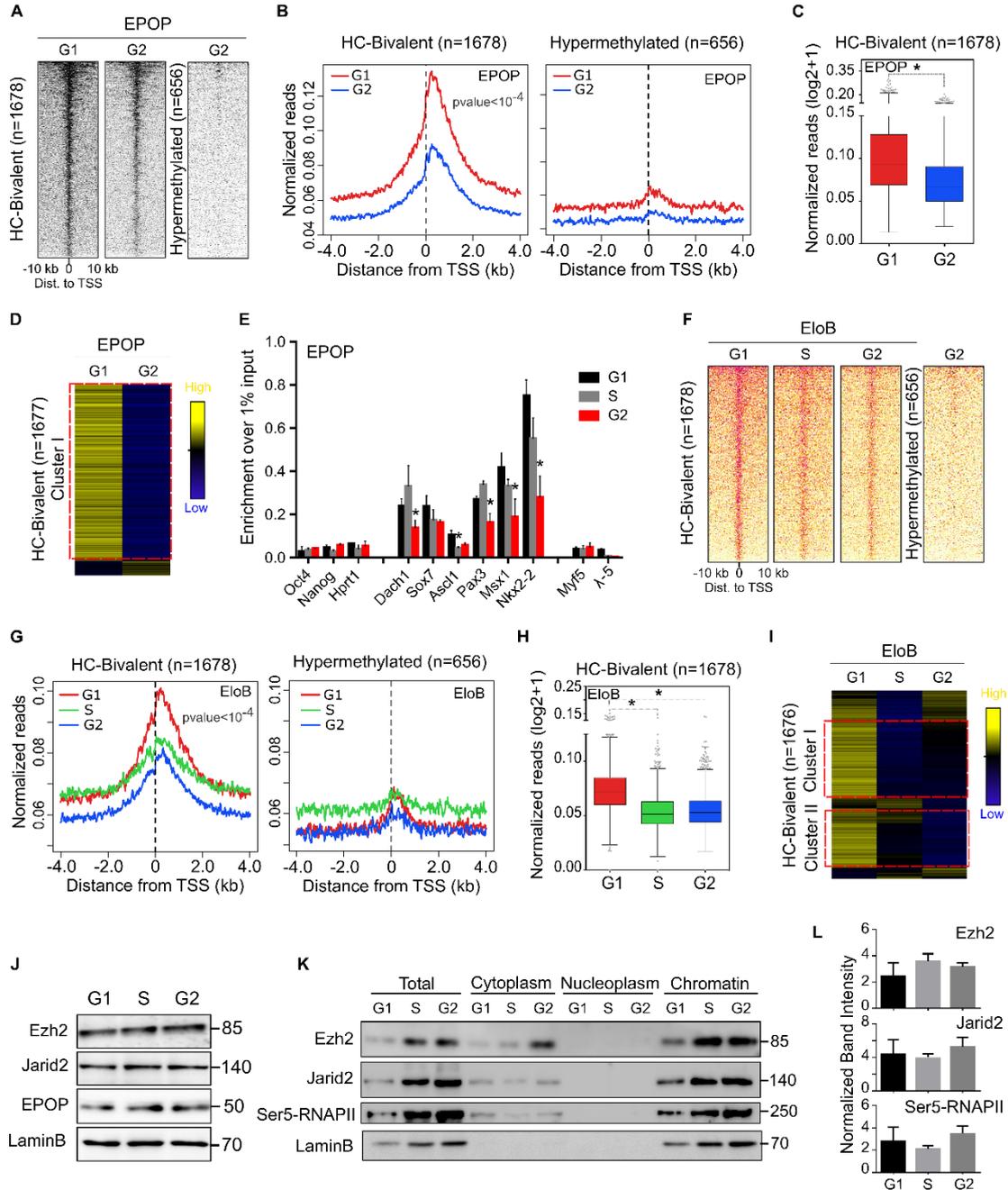


Figura RI- 4. La unión de EPOB y EloB a promotores bivalentes es mayor durante fase G1. A) Heatmaps que muestran la unión de EPOB alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en G1 y G2. El heatmap de los promotores hipermetilados se muestra como control negativo. **B)** Gráfico de unión media de EPOB alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). El gráfico de unión media de EPOB en promotores hipermetilados se muestra como control negativo. **C)** Cuantificación de la señal de unión de EPOB en las regiones promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases del ciclo celular indicadas. **D)** Análisis de clustering de la unión de EPOB a la región promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases indicadas del ciclo celular. Se presenta la unión relativa a la media. **E)** Histograma que muestra el enriquecimiento de EPOB en las regiones promotoras seleccionadas como dianas de PRC2 (*Dach1*, *Sox7*, *Ascl1*, *Pax3*, *Msx1*, *Nkx2-2*) en G1 (negro), S (gris) y G2 (rojo) analizadas por ChIP-qPCR. Los promotores de genes activos (*Oct4*, *Nanog*, *Hprt1*) e hipermetilados (*Myf5*, λ -5) se emplearon como controles negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media \pm SEM de tres réplicas. **F)** Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para EloB alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en las diferentes fases

del ciclo celular. El heatmap de los promotores hipermetilados se muestra como control negativo. **G)** Gráfico de unión media de EloB alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). El gráfico de unión media de EloB en promotores hipermetilados se muestra como control negativo. **H)** Cuantificación de la señal de unión de EloB en las regiones promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases del ciclo celular indicadas. **I)** Análisis de clustering de la unión de EloB a la región promotora (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases indicadas del ciclo celular. Se presenta la unión relativa a la media. **J)** Análisis por western blot de lisados totales de proteína comparando los niveles de las proteínas Ezh2, Jarid2 y EPOP en G1, S y G2. La lamina B se utilizó como control de carga. **K)** Análisis por western blot de los niveles de las proteínas Ezh2, Jarid2 y Ser5-RNAPII en diferentes fracciones celulares (fracciones total, citoplasma, nucleoplasma y cromatina) a lo largo del ciclo celular. La lamina B se utilizó como control de carga en la fracción de cromatina. **L)** Histograma que muestra la cuantificación normalizada de la intensidad de las bandas (utilizando Lamin B como control) del análisis por fraccionamiento celular presentado en (K). Se muestra la media \pm SEM de tres experimentos.

C, E, H. * marca diferencias estadísticamente significativas.

3.- La transcripción se reduce y la Ser5-RNAPII se acumula en las dianas de PRC2 durante fase S y G2

Tras obtener estos resultados, nos preguntamos si las diferencias en el reclutamiento de las subunidades de PRC2 a lo largo del ciclo celular tienen consecuencias funcionales en la regulación transcripcional de los genes diana de este complejo. Para analizar la transcripción en los promotores bivalentes, marcamos el RNA con 4-tiouridina (4sU), separamos las células por fase de ciclo celular y posteriormente, llevamos a cabo la secuenciación de este RNA previamente marcado (4sU-seq). Esto permite analizar de forma más precisa la transcripción en los genes bivalentes, cuyos niveles de expresión son típicamente bajos, mediante el análisis del RNA recién sintetizado (Rutkowski and Dölken, 2017; Windhager et al., 2012) (Figura RI-5A) y, al mismo tiempo, minimiza la contaminación de moléculas de RNA producidas en otras fases anteriores del ciclo celular. El análisis de RNA naciente muestra una mayor producción de RNA durante la fase G1 en comparación con S-G2 en los genes HC bivalentes, pero no en los promotores de los genes activos (Figura RI-5B, C). De los 1655 genes HC bivalentes, 974 genes presentan diferencias en la producción de RNA entre G1 y G2. De ellos, la mayoría (715, 73,4%) se transcriben a niveles más bajo en G2 en comparación con G1 (Figura RI-5D) revelando una tendencia consistente de los genes bivalentes a ser reprimidos más estrictamente durante S y G2 que en G1. De acuerdo con esto, el análisis de genes individuales (como por ejemplo el gen *Nes*) confirma que los promotores bivalentes están principalmente reprimidos en S y G2 (Figura RI-5E). Es importante destacar que el número de moléculas de RNA sintetizadas en los promotores bivalentes durante fase G1 es todavía muy bajo en comparación con los niveles de RNA

producidos en los promotores activos (comparar la escala del eje y en los gráficos de la media de expresión en genes HC bivalentes y activos, [Figura RI-5B, C](#)), lo que indica que la atenuación transitoria de la represión ejercida por PRC2 en G1 resulta tan solo en un aumento del goteo de transcripción y no da lugar a una activación de los genes bivalentes.

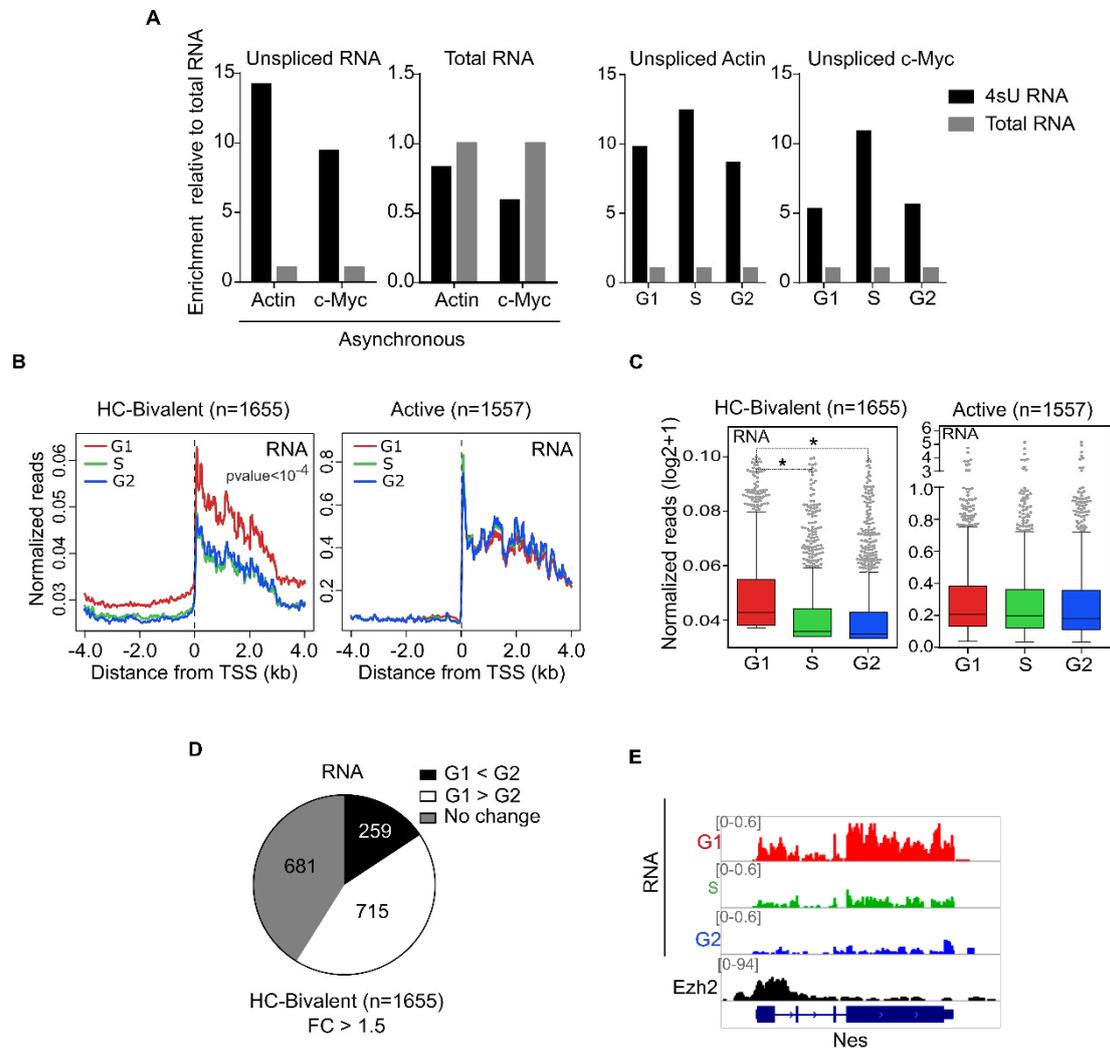


Figura RI- 5. La actividad transcripcional de los genes diana de PRC2 se atenúa durante S y G2.

A) Histograma que compara el enriquecimiento en RNA naciente (unspliced) (Actina y c-Myc) en las fracciones de 4sU RNA y RNA total en células asincrónicas (panel izquierdo) y separadas por ciclo celular (panel derecho) mediante RT-qPCR. **B)** Promedio de la producción de RNA en los promotores HC bivalentes (panel izquierdo) y activos (panel derecho) en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul) alrededor del TSS. **C)** Boxplot comparando las lecturas de 4sU-seq asignadas a la región promotora proximal (TSS - +3Kb) de los genes HC bivalentes y activos en las fases del ciclo celular indicadas. **D)** Diagrama que representa el número de genes HC bivalentes que muestran cambios de expresión entre G1 y G2 (FC > 1.5). **E)** Vista del visualizador de genoma IGV de la síntesis de RNA en las fases del ciclo celular indicadas en el gen bivalente Nes. La unión de Ezh2 se muestra como control utilizando datos publicados (Marks et al., 2012).

C. * marca diferencias estadísticamente significativas.

Para comprobar si el reclutamiento de Jarid2-Ezh2 (PRC2.2) en conjunto con una represión más robusta de los genes bivalentes durante S-G2 se asociaba a cambios en la actividad de la RNA Polimerasa II (RNAPII), analizamos la unión de RNAPII fosforilada en Ser5 (Ser5-RNAPII), comúnmente asociada a pausa transcripcional en genes bivalentes en mESCs (Brookes et al., 2012). Los resultados de este análisis ponen de manifiesto un aumento de la acumulación de la Ser5-RNAPII alrededor del TSS de los genes HC bivalentes en las fases S y G2 en comparación con G1 (Figura RI-6A, B, C). El aumento de la unión de Ser5-RNAPII es evidente para la mayoría de los promotores bivalentes (1324 de 1677, 78,9%), (véase el *cluster I* en la Figura RI-6D), así como en las regiones individuales bivalentes seleccionadas (*cluster* de genes *Hoxd*) (Figura RI-6E). El análisis por ChIP-qPCR de un subconjunto de genes diana de PRC2 confirma además la acumulación gradual de Ser5-RNAPII durante S y G2 en comparación con G1 (Figura RI-6F). Además, la mayoría de los genes HC bivalentes (592 de 715, 82.7%) que muestran una reducción en la síntesis de RNA en G2 exhiben una mayor acumulación de Ser5-RNAPII en su región promotora durante esta fase (Figura RI-6G), sugiriendo que la reducción en la producción de RNA está vinculada a la pausa de la RNAPII en los promotores de los genes bivalentes durante S y G2. Aquí es importante también destacar que el aumento del reclutamiento de Ezh2 y Jarid2 correlaciona con una mayor acumulación de Ser5-RNAPII en los promotores diana en todas las fases del ciclo celular, haciéndose más evidente durante S y G2 (Figura RI-6H). En conjunto (Figura RI-6I), estas observaciones indican que el aumento del reclutamiento de Jarid2-Ezh2 (PRC2.2) a los genes diana está asociado a la reducción de la unión de EPOP y EloB (PRC2.1), a la retención de la transcripción por parte de RNAPII y a la reducción de la producción de RNA durante S y G2.

4.- La regulación dependiente de ciclo de PRC2 es especialmente evidente en los promotores de los factores de transcripción asociados a desarrollo embrionario

Seguidamente, planteamos que, dado que la regulación de los genes bivalentes dependiente del ciclo celular implicaba cambios en el reclutamiento de Jarid2, Ezh2, EPOP, EloB y Ser5-RNAPII, los genes bivalentes que son dianas comunes de estas proteínas en una población asincrónica de mESCs podrían mostrar una regulación más notable a lo largo del ciclo celular. Con esta idea, cruzamos las dianas de las

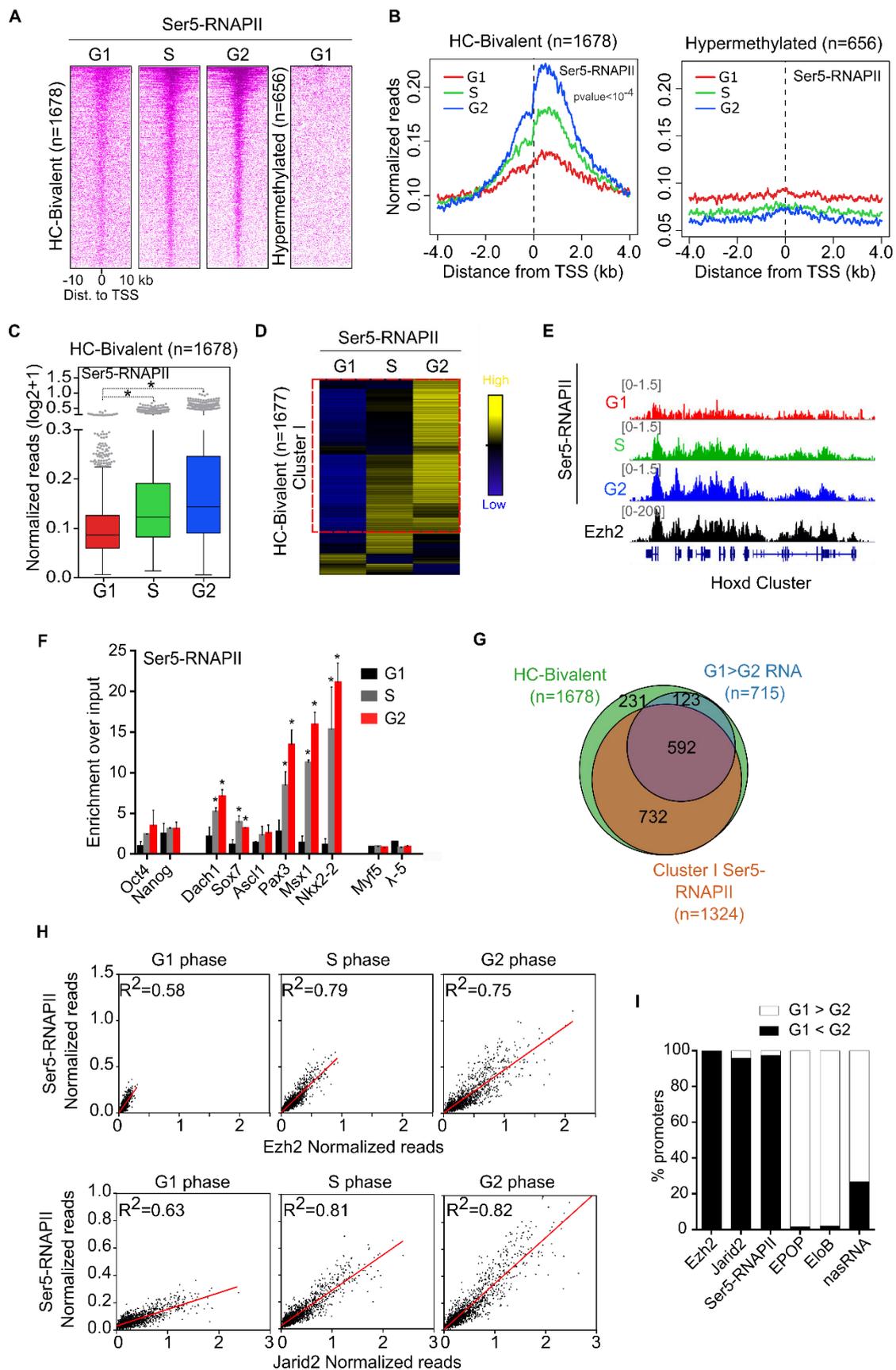


Figura RI- 6. La Ser5-RNAPIII se acumula en los promotores diana de PRC2 durante S y G2. A) Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para Ser5-RNAPIII alrededor del TSS de los

promotores HC bivalentes en las diferentes fases del ciclo celular. El heatmap de los promotores hipermetilados se muestra como control negativo. B) Gráfico de unión media de Ser5-RNAPII alrededor del TSS de los promotores HC bivalentes en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). El gráfico de unión media de Ser5-RNAPII en promotores hipermetilados se muestra como control negativo. C) Cuantificación de la señal de unión de Ser5-RNAPII en las regiones promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases del ciclo celular indicadas. D) Análisis de clustering de la unión de Ser5-RNAPII a la región promotora (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes HC bivalentes en las fases indicadas del ciclo celular. Se presenta la unión relativa a la media. E) Vista del visualizador de genoma IGV de los picos de enriquecimiento de Ser5-RNAPII en las diferentes fases del ciclo para el grupo de genes Hoxd. La unión de Ezh2 se muestra como control utilizando datos publicados (Marks et al., 2012). F) Análisis por ChIP-qPCR de la unión de Ser5-RNAPII en las regiones promotoras diana de PRC2 (Dach1, Sox7, Ascl1, Pax3, Msx1, Nkx2-2) en G1 (negro), S (gris) y G2 (rojo). Los promotores de genes activos (Oct4, Nanog, Hprt1) e hipermetilados (Myf5, λ-5) se emplearon como controles negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media ± SEM de tres réplicas. G) Diagrama de Venn que muestra el solapamiento entre los genes HC bivalentes reprimidos en G2 en comparación con G1 (FC>1.5) y los genes que muestran acumulación de Ser5-RNAPII en su región promotora en fase G2 (cluster I en la Figura RI-6D). H) Análisis de regresión lineal que muestra la correlación entre las señales de unión de Ser5-RNAPII-Ezh2 y de Ser5-RNAPII-Jarid2 en los promotores HC bivalentes (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) en las fases del ciclo celular indicadas. I) Histograma que muestra el porcentaje de genes que muestran un aumento (G1>G2) o una disminución (G1<G2) de la unión de Ezh2 (FC>2), Jarid2 (FC>1.3), Ser5-RNAPII (FC>2), EPOP (FC>1.5), EloB (FC>1.5) y la síntesis de RNA (FC>1.5) a lo largo del ciclo celular. Los genes que no mostraron diferencias entre las fases analizadas se excluyeron para calcular el porcentaje.

*C, F. * marca diferencias estadísticamente significativas.*

diferentes proteínas y obtuvimos un grupo de 390 genes bivalentes regulados por todos estos factores (genes diana comunes) (Figura RI-7A), el cual está significativamente enriquecido para factores de transcripción y proteínas que se unen directamente al DNA (162 de 390 genes, p-valor: 76 E-94), en contraposición con los 991 genes restantes (genes dianas no comunes) que aparecen más enriquecidos para la unión de proteínas y transportadores transmembrana (Figura RI-7AB). Además, los genes diana comunes incluyen factores clave implicados en la diferenciación a mesodermo, ectodermo y endodermo (Figura RI-7C), lo que sugiere que la regulación dependiente del ciclo celular del reclutamiento de Polycomb modula la diferenciación hacia las tres capas germinales y no es una regulación específica de linaje.

El análisis comparativo de la unión de PRC2 en ambos conjuntos de genes también revela que las subunidades de PRC2 (Ezh2, Jarid2 y EPOP) y a Ser5-RNAPII están significativamente más unidas a las dianas comunes que los genes restantes y que, además, el reclutamiento diferencial de estas subunidades y la producción de RNA naciente a lo largo del ciclo celular es más evidente (Figura RI-8A, B). De forma consistente, los resultados empleando datos publicados de ChIP-seq de proteínas y marcas del complejo PRC2 y del complejo Tritorax en poblaciones asincrónicas de mESCs muestra que el reclutamiento de Ezh2, Jarid2, EPOP y EloB

así como de Eed, Suz12, Mtf2 y H3K27me3 es más elevado en los promotores de las dianas comunes que en los promotores de los genes restantes (Figura RI-9A). En cambio, las dianas comunes no están más enriquecidas para la proteína Tritorax Mll2 y su marca asociada H3K4me3 (Figura RI-9A, Tabla RI-3-Anexo I). En conjunto, estos resultados indican que las regiones promotoras de los factores de transcripción más importantes que regulan la diferenciación celular reclutan niveles más elevados de las subunidades de PRC2 y, además, lo hacen de forma significativamente más dependiente de ciclo celular.

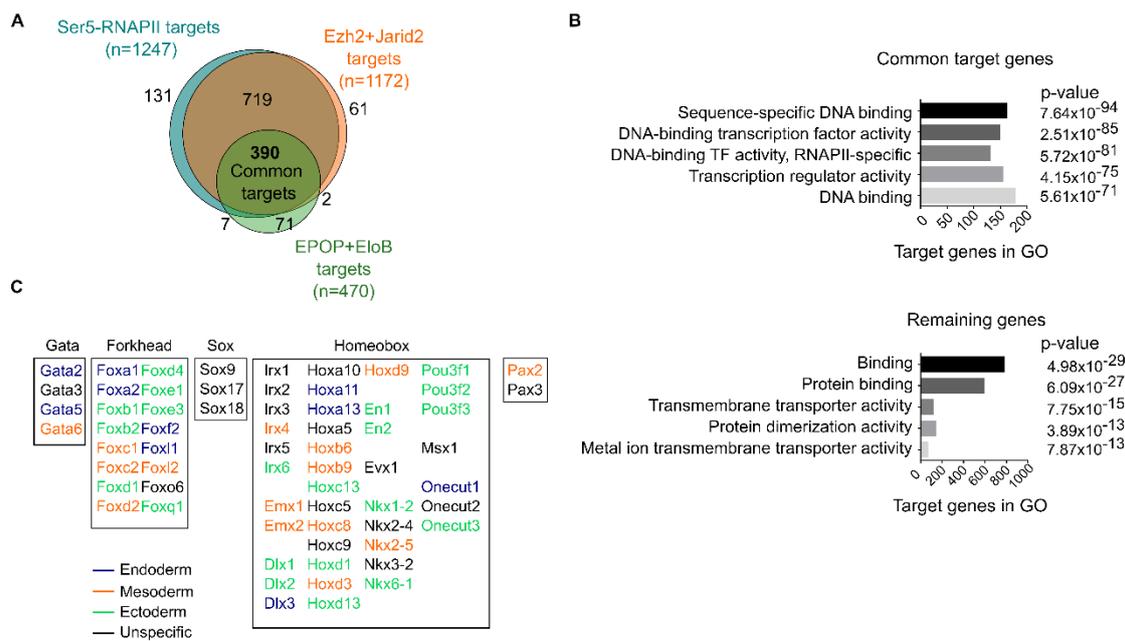


Figura RI-7. Las dianas de PRC2 reguladas en el ciclo celular están enriquecidas en factores de transcripción del desarrollo. *A)* Diagrama de Venn que muestra el solapamiento entre los genes HC bivalentes diana de Ser5-RNAPII, Ezh2, Jarid2, EPOP y EloB en poblaciones asincrónicas a partir de datos generados en esta tesis (Jarid2) y datos previamente publicados (Beringer et al., 2016; Brookes et al., 2012). *B)* Análisis de ontología de los genes diana comunes (n=390) y restantes (n=991). Las barras representan el número de genes que se corresponden con las categorías GO indicadas. El p-valor se muestra junto a cada categoría. *C)* Lista de factores de transcripción funcionalmente caracterizados descritos en el subconjunto de 390 dianas comunes identificadas en la Figura RI-7A. Se indica el linaje al que se asocia cada gen: endodermo (azul), mesodermo (naranja) y ectodermo (verde).

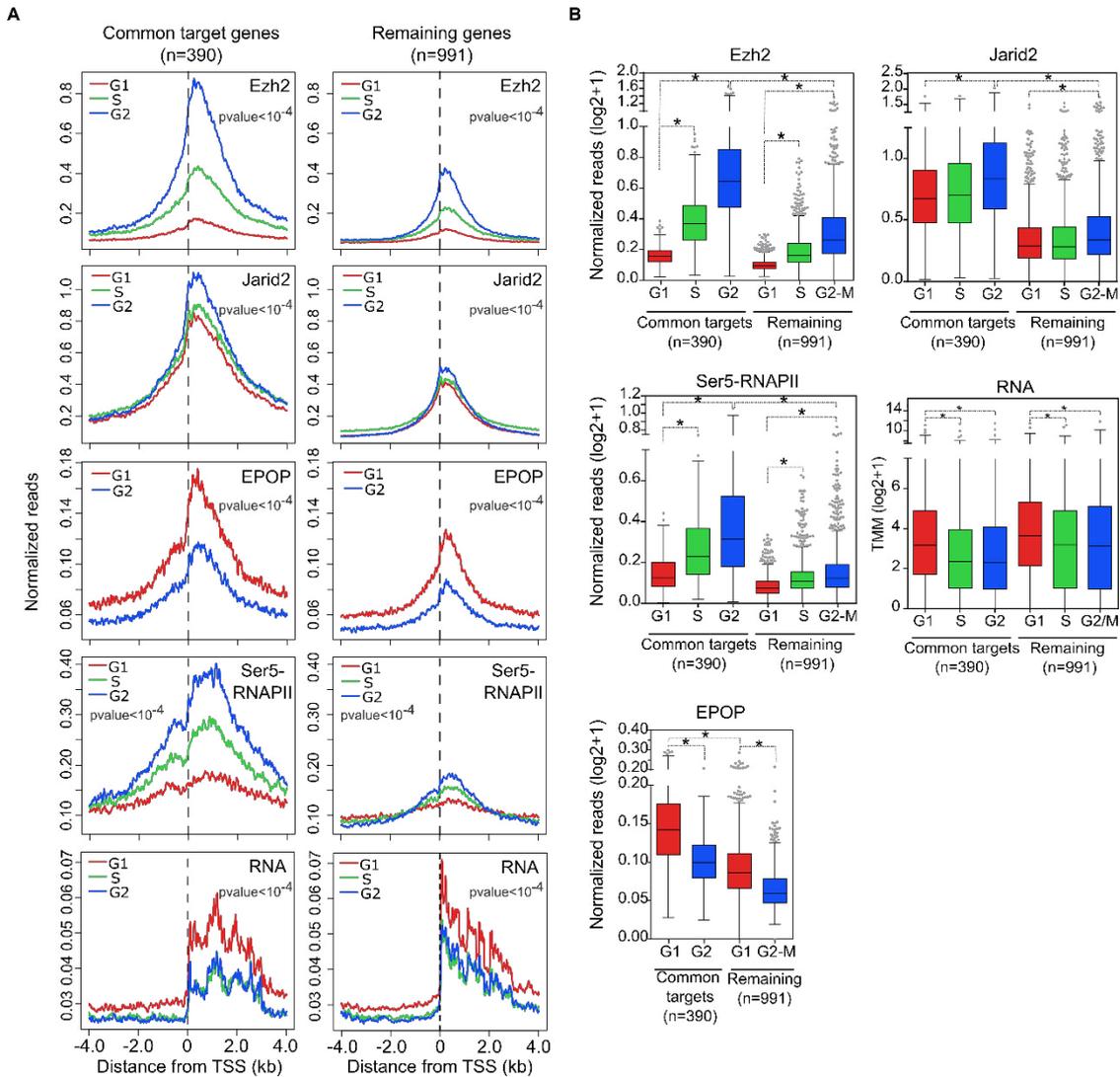


Figura RI-8. La regulación de PRC2 dependiente de ciclo celular es más significativa en los promotores asociados a factores de transcripción del desarrollo. A) Gráfico de unión media de *Ezh2*, *Jarid2*, *EPOP*, *Ser5-RNAPII* y síntesis de RNA alrededor del TSS de los genes HC bivalentes en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul), comparando las dianas comunes y los genes HC bivalentes restantes (como se define en la Figura RI-7A). **B)** Cuantificación de la unión de *Ezh2*, *Jarid2*, *Ser5-RNAPII* y *EPOP* en las regiones promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) o de la expresión de RNA (normalizada por TMM) de las dianas HC bivalentes comunes y las restantes en las fases del ciclo celular indicadas.

B. * marca diferencias estadísticamente significativas.

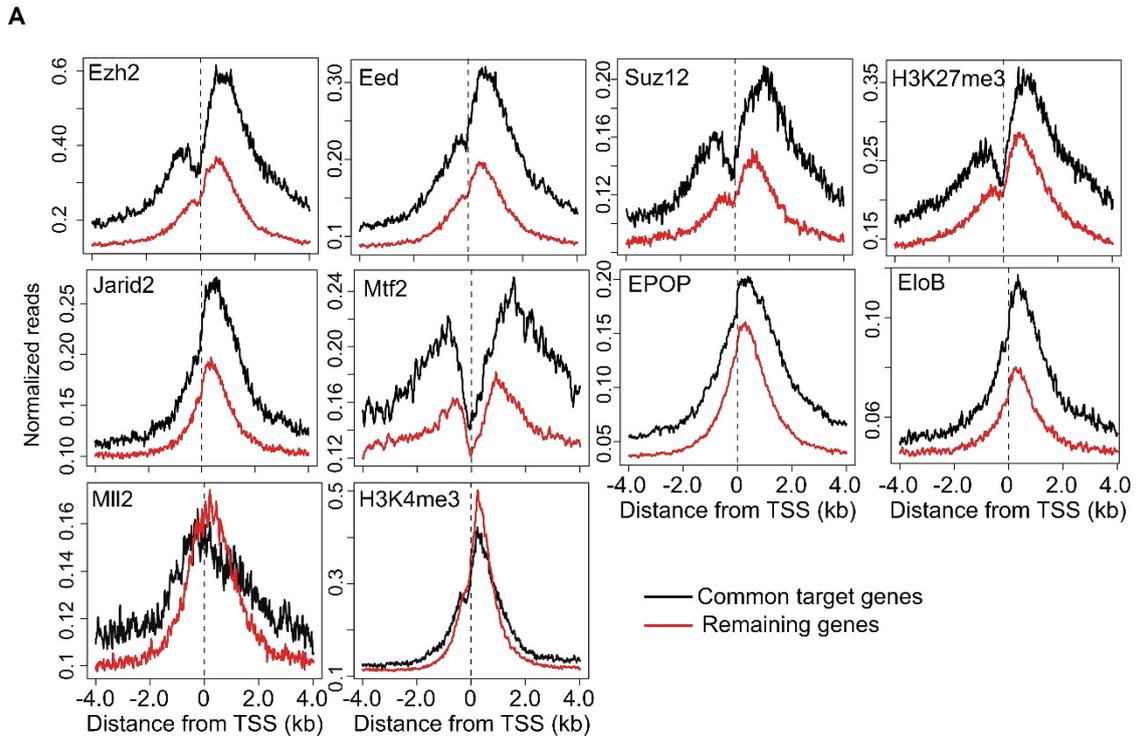


Figura RI-9. Las subunidades de PRC2 están especialmente enriquecidas en las dianas comunes.

A) Gráficos que comparan los perfiles medios de unión de *Ezh2*, *Eed*, *Suz12*, *H3K27me3*, *Jarid2*, *Mtf2*, *EPOP*, *EloB*, *Mll2* y *H3K4me3* en poblaciones asincrónicas en los genes *HC* bivalentes comunes (líneas negras) y los restantes (líneas rojas). Los datos empleados pueden consultarse en la [Tabla RI-3-Anexo I](#).

5.- La regulación dependiente de ciclo de PRC2 se ve afectada en mESCs mutantes para *Jarid2*.

Con el fin de caracterizar funcionalmente los resultados obtenidos, comprobamos cómo la falta del reclutador de PRC2 *Jarid2* afecta a la regulación del reclutamiento de PRC2 dependiente del ciclo celular. Para ello, derivamos una línea FUCCI-*Jarid2* *-/-* introduciendo el sistema FUCCI en mESCs derivadas de una línea parental *Jarid2* *fl/fl* cuyo mutante es inducible por tamoxifeno (Shen et al., 2009) ([Figura RI-10A](#)). En otras publicaciones previas se ha apuntado que las mESCs deficientes en *Jarid2* muestran una reducción en la unión de las subunidades que forman parte del *core* de PRC2 y la Ser5-RNAPII a los promotores bivalentes (Landeira et al., 2010; Shen et al., 2009), pero, sin embargo, muestran niveles inalterados de unión de EPOP en los genes diana (Beringer et al., 2016). De acuerdo con esto, la eliminación de *Jarid2* dificulta la deposición de la marca *H3K27me3* en los promotores diana ([Figura RI-10B](#)), siendo particularmente notable durante S y G2 donde la unión de *Ezh2* y *H3K27me3* es más evidente en las células *wild-type*

(Figura RI-2). Esta disminución de la H3K27me3 como consecuencia de la depleción de Jarid2, repercute también en la expresión de las dianas comunes de PRC2 y en la unión de la Ser5-RNAPII, resultando en un aumento de la actividad transcripcional de estos promotores asociada a una disminución de la acumulación de la Ser5-RNAPII durante S y G2 (Figura RI-10C, D). El análisis por ChIP-qPCR confirma además que la acumulación de Ser5-RNAPII en los genes bivalentes en G2 está visiblemente reducida en las células Jarid2 $-/-$ en comparación con las mESCs parentales (Figura RI-10E). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el aumento del reclutamiento de Jarid2 y Ezh2 a los genes bivalentes durante S y G2 resulta en la retención de la RNAPII y la reducción de la producción de RNA.

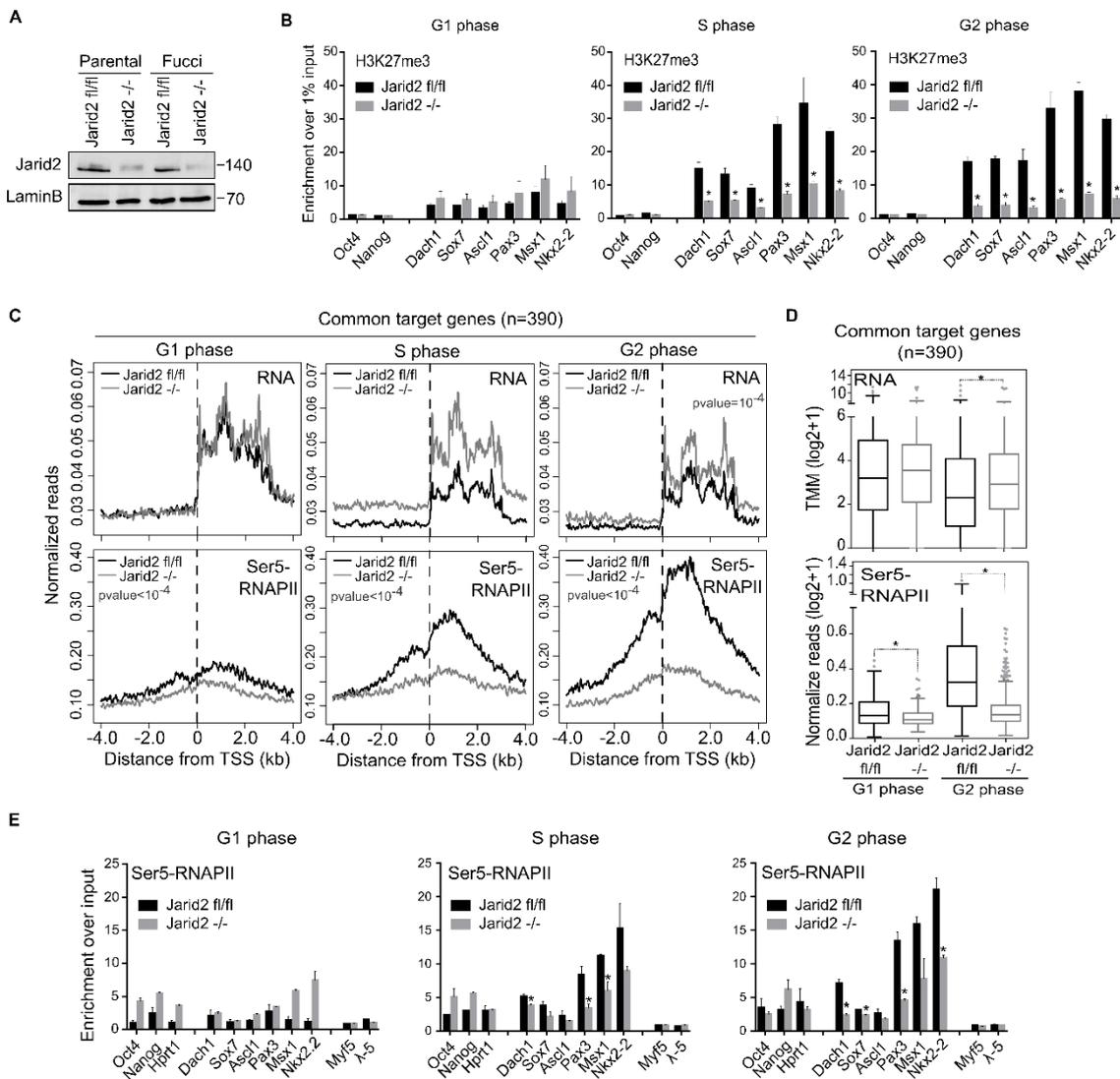


Figura RI-10. Las mESCs mutantes para Jarid2 muestran una alteración en la regulación dependiente de ciclo celular en los genes bivalentes. A) Análisis por western blot de la proteína Jarid2 a partir de lisados totales de proteína en Fucci-Jarid2 fl/fl y Fucci-Jarid2 -/- mESCs. La lamina B se empleó como control de carga. **B)** Análisis por ChIP-qPCR comparando el enriquecimiento de H3K27me3 en

regiones promotoras diana de PRC2 (*Dach1*, *Sox7*, *Ascl1*, *Pax3*, *Msx1*, *Nkx2-2*) en células *Jarid2 fl/fl* (barras negras) y *Jarid2 -/-* (barras grises) en las fases G1, S y G2. Los promotores de genes activos (*Oct4*, *Nanog*) se utilizaron como controles negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media \pm SEM de tres réplicas. **C)** Gráficos de expresión media de RNA (paneles superiores) y unión media de Ser5-RNAPII (paneles inferiores) alrededor del TSS de genes HC bivalentes comunes ($n=390$) en G1 (paneles izquierdos), S (paneles centrales) y G2 (paneles derechos) en mESCs *Jarid2 fl/fl* (líneas negras) y *Jarid2 -/-* (líneas grises). **D)** Cuantificación de la síntesis de RNA (panel superior) y de la unión de Ser5-RNAPII (panel inferior) en células *Jarid2 fl/fl* y *Jarid2 -/-* en G1 y G2 en genes diana comunes. **E)** Análisis por ChIP-qPCR comparando la unión de Ser5-RNAPII en regiones promotoras diana de PRC2 (*Dach1*, *Sox7*, *Ascl1*, *Pax3*, *Msx1*, *Nkx2-2*) en mESCs *Jarid2 fl/fl* (barras negras) y *Jarid2 -/-* (barras grises) en las fases del ciclo indicadas. Los promotores de genes activos (*Oct4*, *Nanog*, *Hprt1*) e hipermetilados (*Myf5*, λ -5) se utilizaron como controles negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media \pm SEM de tres réplicas.

B, D, E. * marca diferencias estadísticamente significativas.

Capítulo II

Estudio de las bases moleculares de la regulación génica ejercida por PRC2 de manera específica de fase de ciclo celular en mESCs

1.- Ring1b se recluta de forma similar a sus promotores diana durante G1, S y G2.

Los primeros resultados de esta tesis en los que analizamos el papel de Polycomb en la regulación de genes del desarrollo durante el ciclo celular muestran que el reclutamiento diferencial de los complejos PRC2 a lo largo del ciclo celular a los genes bivalentes resulta clave para establecer un estado de la cromatina en fase S y G2 que dificulte la expresión génica específicamente en estas fases. Esto podría explicar en parte por qué las ESCs parecen ser más proclives a diferenciarse durante G1 (Coronado et al., 2013; Pauklin and Vallier, 2013; Sela et al., 2012). Sin embargo, para comprender completamente cómo Polycomb ejerce esta regulación dependiente de ciclo celular, resulta imprescindible analizar también cómo se reclutan a sus genes diana las proteínas que conforman el complejo PRC1, así como elucidar si tiene lugar una cooperación activa entre ambos complejos durante el ciclo con consecuencias funcionales a nivel de expresión y conformación de cromatina.

Por ello, analizamos en primer lugar la contribución de la subunidad catalítica del complejo PRC1, Ring1b, en la regulación de sus genes diana a lo largo del ciclo celular mediante ChIP-seq. Las dianas de Ring1b se determinaron como el sumatorio de las dianas de esta proteína en las tres fases del ciclo (n=4801) (Figura RII-1A, Tabla RII-1-Anexo II). El análisis mediante *heatmap* de la unión de Ring1b alrededor del TSS de sus genes diana sugiere que el reclutamiento de esta proteína es similar en G1, S y G2 (Figura RII-1B), como se muestra en el análisis de correlación entre fases del ciclo donde se aprecian niveles semejantes entre G1 y G2, con tan solo un ligero aumento en fase S (1.3 veces más) en relación con las otras fases (Figura RII-1C). A continuación, nos preguntamos si esta unión aparentemente estable de Ring1b a lo largo del ciclo celular se mantiene también en sus dianas bivalentes. Los genes diana bivalentes de Ring1b se obtuvieron cruzando las dianas totales con el grupo de genes HC bivalentes obtenido en la figura RI-1A (Figura RII-1D). El análisis de la unión media de Ring1b en G1, S y G2 alrededor del TSS en las dianas totales (n=4801),

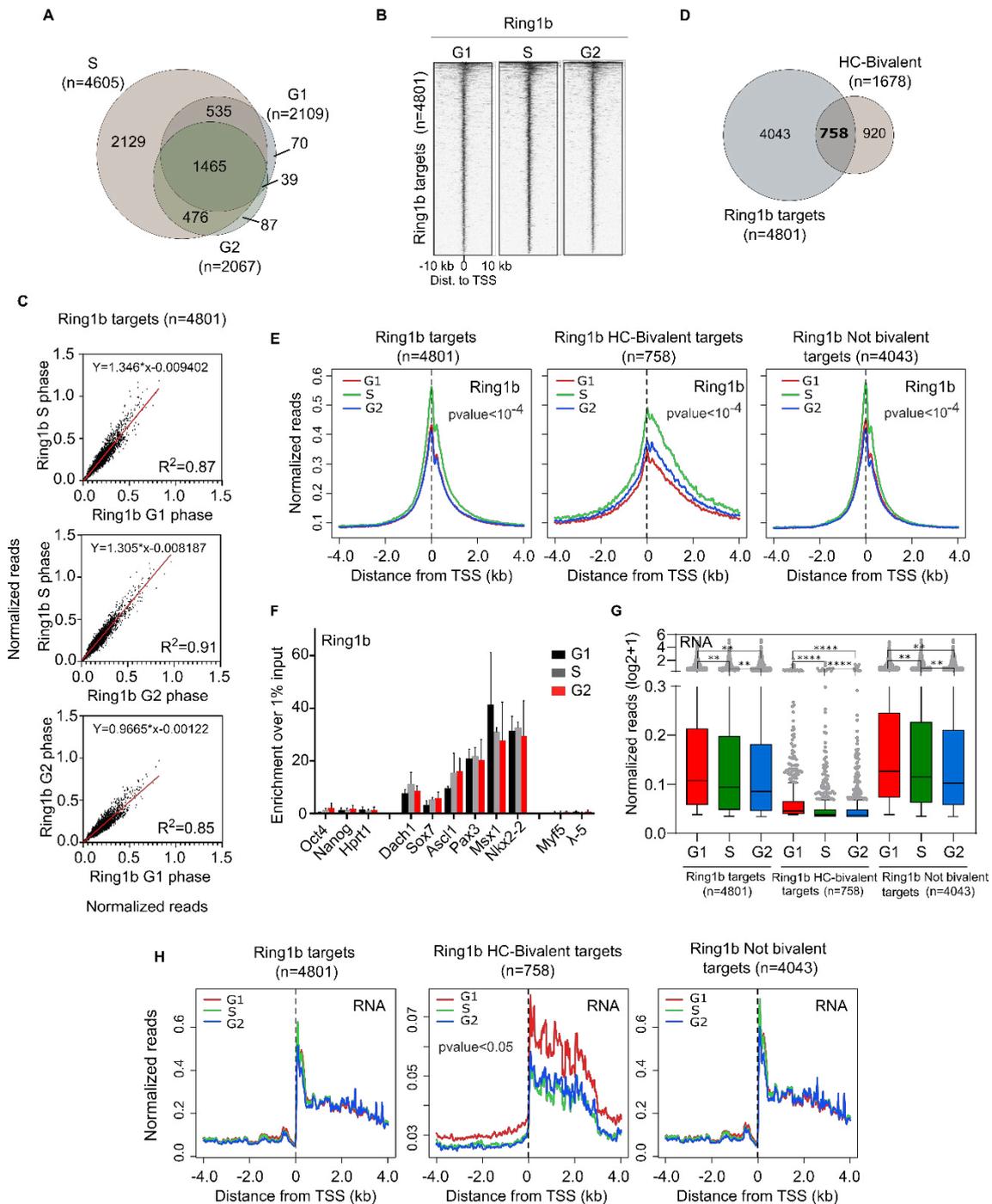


Figura RII-1. El reclutamiento de la subunidad catalítica Ring1b del core de PRC1 a sus genes diana muestra un patrón constante a lo largo del ciclo. *A)* Diagrama de Venn de los promotores identificados como dianas en cada una de las fases del ciclo celular (G1, S, G2) para Ring1b. El sumatorio de las tres fases da como resultado 4801 dianas totales. *B)* Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para Ring1b alrededor del TSS de los promotores diana de Ring1b en las diferentes fases del ciclo celular. *C)* Análisis de regresión lineal que muestra la correlación entre fases de ciclo de las señales de unión (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de Ring1b en los promotores diana. *D)* Diagrama de Venn de los promotores diana de Ring1b y el grupo de genes HC bivalentes obtenido en la figura RI-2A. *E)* Gráfico de unión media de Ring1b alrededor del TSS de los promotores diana totales (izquierda), los promotores diana bivalentes (centro) y los promotores diana no bivalentes (derecha) de Ring1b en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). *F)* Histograma que muestra el enriquecimiento de Ring1b en regiones promotoras seleccionadas como dianas de PRC1 (Dach1, Sox7, Ascl1, Pax3, Msx1, Nkx2-2) en G1 (negro), S (gris) y G2 (rojo) analizadas por ChIP-qPCR. Los promotores de genes activos (Oct4, Nanog, Hprt1) e hipermetilados (Myf5, λ -5) se utilizaron como controles

negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media \pm SEM de cuatro réplicas. **G)** Boxplot comparando las lecturas de 4sU-seq asignadas a la región promotora proximal (TSS - +3Kb) de los promotores diana totales (n=4801), los promotores diana bivalentes (n=758) y los promotores diana no bivalentes (n=4043) de Ring1b y en las fases del ciclo celular indicadas. **H)** Promedio de la producción de RNA en los promotores diana totales (izquierda), los promotores diana bivalentes (centro) y los promotores diana no bivalentes (derecha) de Ring1b alrededor del TSS en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul).

G * marca diferencias estadísticamente significativas.

las dianas bivalentes (n=758) y las dianas no bivalentes (n=4043) revela que Ring1b es reclutado de forma similar a lo largo del ciclo celular en los tres conjuntos, incluidos los genes bivalentes (Figura RII-1E). El mismo resultado se obtiene analizando un conjunto representativo de promotores bivalentes diana de PRC1 mediante ChIP-qPCR (Figura RII-1F). Sin embargo, a pesar de que el enriquecimiento de Ring1b es similar en ambos grupos de dianas, los niveles de expresión de los promotores diana bivalentes son considerablemente más bajos que los no bivalentes y muestran una regulación dependiente de ciclo celular que no exhiben estos últimos (Figura RII-1G, H). Por tanto, este resultado sugiere que 1) es tan solo el complejo PRC2 el que media esta represión transcripcional a través del ciclo celular o 2) que la acción de Ring1b a lo largo del ciclo celular en los promotores bivalentes es dependiente de las proteínas que conforman el complejo en cada fase del ciclo. Por tanto, para comprender completamente como PRC1 ejerce su función, se hace necesario analizar la contribución de los diferentes subcomplejos de PRC1.

2.- El reclutamiento de Rybp a los promotores diana de Ring1b durante S y G2 está asociado a un incremento de H2AK119ub1 y una mayor represión transcripcional.

A continuación, nos centramos en estudiar el papel del complejo variante de PRC1 (vPRC1) en la regulación génica a lo largo del ciclo celular. Para ello, realizamos un análisis por ChIP-seq de la proteína Rybp, común a todos los complejos vPRC1. Las dianas de Rybp (n=10925) se establecieron del mismo modo que para Ring1b, tomando el sumatorio de las dianas de las tres fases del ciclo (Figura RII-2A, Tabla RII-1-Anexo II). Sorprendentemente, en contraste con Ring1b, el análisis mediante *heatmap* a lo largo del ciclo de estas dianas totales muestra que el reclutamiento de Rybp aumenta conforme las células transicionan a través del ciclo celular, con diferencias evidentes entre G1 y G2 (Figura RII-2B). Para comprobar si

este patrón se presenta del mismo modo en los promotores diana de vPRC1, seleccionamos del grupo de dianas totales de Rybp aquellas que son simultáneamente dianas de Ring1b (n=4277) (Figura RII-2C). El análisis del enriquecimiento medio de Rybp alrededor del TSS a lo largo del ciclo celular en estas dianas también revela un patrón de reclutamiento dependiente de ciclo celular, aumentando considerablemente la unión en G2 respecto a G1, en contraste con Ring1b que vuelve a mostrar un enriquecimiento similar a lo largo del ciclo en estos promotores (Figura RII-2D). En concordancia, este aumento de vPRC1-Rybp a lo largo del ciclo está asociado con un incremento en la deposición de la marca H2AK119ub1 alrededor del TSS de los promotores diana de Ring1b+Rybp en S y G2 (Figura RII-2E). Es importante resaltar que, a pesar de que la unión de Rybp y la deposición de H2AK119ub1 en las dianas de vPRC1 en G1 puedan resultar casi inexistentes en comparación con G2, son evidentes cuando se comparan con genes hipermetilados (Figura RII-2F) a los que no se une PRC1. Además, el reclutamiento progresivo a través del ciclo celular observado para Rybp y H2AK119ub1 también se visualiza en genes individuales (como, por ejemplo, *Pcdh8*) (Figura RII-2G).

Seguidamente, nos preguntamos si esta regulación dependiente de ciclo tiene consecuencias a nivel de síntesis de RNA en las dianas bivalentes de vPRC1. Para responder a esta pregunta, aislamos las dianas bivalentes y no bivalentes de Ring1b+Rybp cruzando el total con el conjunto de genes HC bivalentes (Figura RII-2H). El análisis comparativo de las lecturas de 4sU-seq en la región promotora proximal (TSS+3kb) en las diferentes fases del ciclo en ambos conjuntos exhibe una mayor represión génica, particularmente en los promotores bivalentes durante las fases S y G2 (Figura RII-2I). Globalmente, estos resultados indican que vPRC1-Rybp se une preferentemente y reprime los genes del desarrollo en S y G2 a través de la marca represiva H2AK119ub1, lo cual puede tener relación directa con el incremento del reclutamiento de PRC2.2 observado en análisis anteriores (Figuras RI-2,3) a través de Jarid2 que recluta al complejo mediante el reconocimiento de H2AK119ub1 (Cooper et al., 2016a).

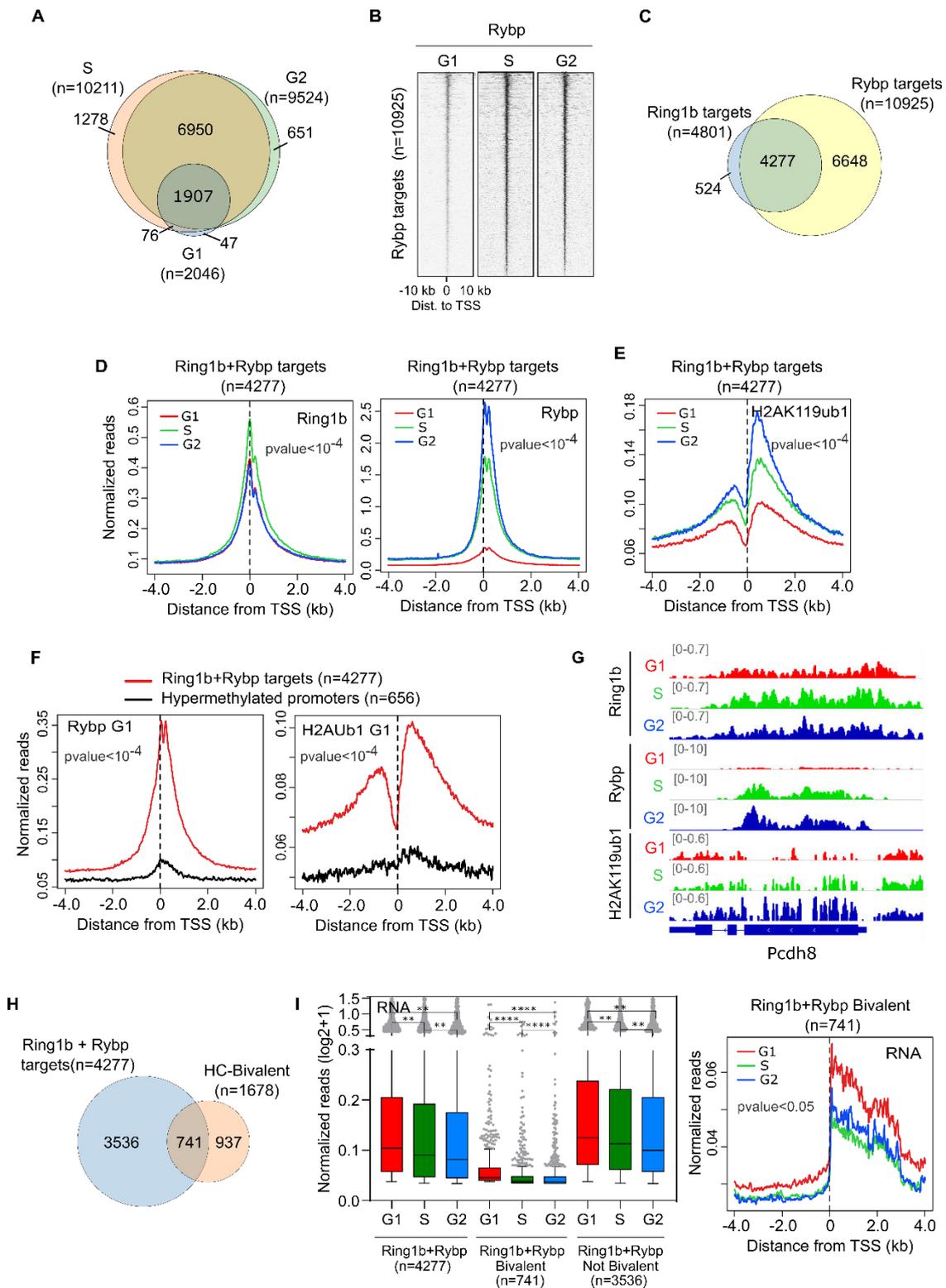


Figura RII-2. Rybp se recluta principalmente durante fase G2 asociado con un incremento de la marca H2AK119ub1. *A)* Diagrama de Venn de los promotores identificados como dianas en cada una de las fases del ciclo celular (G1, S, G2) para Rybp. El sumatorio de las tres fases da como resultado 10925 dianas totales. *B)* Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para Rybp alrededor del TSS de los promotores diana de Rybp en las diferentes fases del ciclo celular. *C)* Diagrama de Venn de los promotores diana de Ring1b obtenidos en la figura RII-1A y los promotores diana totales de Rybp. *D)* Gráfico de unión media de Ring1b (izquierda) y Rybp (derecha) alrededor del TSS de las dianas de Ring1b+Rybp (n=4277) obtenidas

en figura RII-2C en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). **E)** Gráfico de deposición media de la marca HA2K119ub1 alrededor del TSS de las dianas de Ring1b+Rybp (n=4277) en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). **F)** Perfil de unión medio de Rybp (izquierda) y H2AK119ub1 (derecha) alrededor del TSS en promotores diana de Ring1b+Rybp (rojo) e hipermetilados (negro) en fase G1. **G)** Vista del visualizador de genoma IGV de los picos de enriquecimiento de Ring1b, Rybp y H2AK119ub1 en las diferentes fases del ciclo para el gen Pcdh8. **H)** Diagrama de Venn de los promotores diana de Ring1b+Rybp y el grupo de genes HC bivalentes obtenido en la figura RI-2A. **I)** Boxplot comparando las lecturas de 4sU-seq asignadas a la región promotora proximal (TSS - +3Kb) de los promotores diana de Ring1b+Rybp (n=4801), los promotores diana de Ring1b+Rybp bivalentes (n=741) y los promotores diana de Ring1b+Rybp no bivalentes (n=3536) en las fases del ciclo celular indicadas (izquierda). Promedio de la producción de RNA en los promotores diana de Ring1b+Rybp bivalentes (derecha).

I * marca diferencias estadísticamente significativas.

3.- La acumulación de Cbx7 en los promotores diana correlaciona con un aumento de las interacciones de los promotores diana en S y G2.

Posteriormente, llevamos a cabo el análisis del complejo canónico de PRC1, (cPRC1) mediante la realización de ChIP-seq de la proteína Cbx7 presente en este complejo. Las dianas totales de Cbx7 extraídas del sumatorio de las tres las fases (n=2395) (Figura RII-3A, Tabla RII-1-Anexo II) exhiben en el análisis de *heatmap* un enriquecimiento mayor de esta proteína durante fase G2 (Figura RII-3B). Con el fin de comprobar cómo tiene lugar este reclutamiento específicamente en las dianas de cPRC1, separamos los promotores diana asociados tanto a Ring1b como Cbx7 (n=1100) de aquellos tan solo asociados a Ring1b (n=3701) (Figura RII-3C). El gráfico medio de unión en G1, S y G2 de Ring1b y Cbx7 alrededor del TSS de las 3701 dianas asociadas tan solo a Ring1b muestra que, efectivamente, Cbx7 no se recluta en estas dianas y que Ring1b lo hace con un enriquecimiento similar a lo largo del ciclo como se observó anteriormente (Figura RII-D). Por el contrario, las dianas Ring1b+Cbx7 sí que aparecen unidas por Cbx7, exhibiendo además un mayor reclutamiento de esta proteína en fase G2 en relación con G1 y S (Figura RII-3D, E). Estas diferencias de reclutamiento de Cbx7 asociadas a ciclo celular también pueden observarse con claridad mediante ChIP-qPCR en un grupo de genes bivalentes individuales diana de PRC1 (Figura RII-3F). Estos datos sugieren que cPRC1 también sigue un reclutamiento dependiente de ciclo celular, principalmente acentuado durante fase G2, lo cual puede explicarse por el aumento de la marca H2K27me3 depositada por PRC2 en esta fase (Figura RI-2I) que es reconocida por Cbx7 y promueve el reclutamiento del complejo.

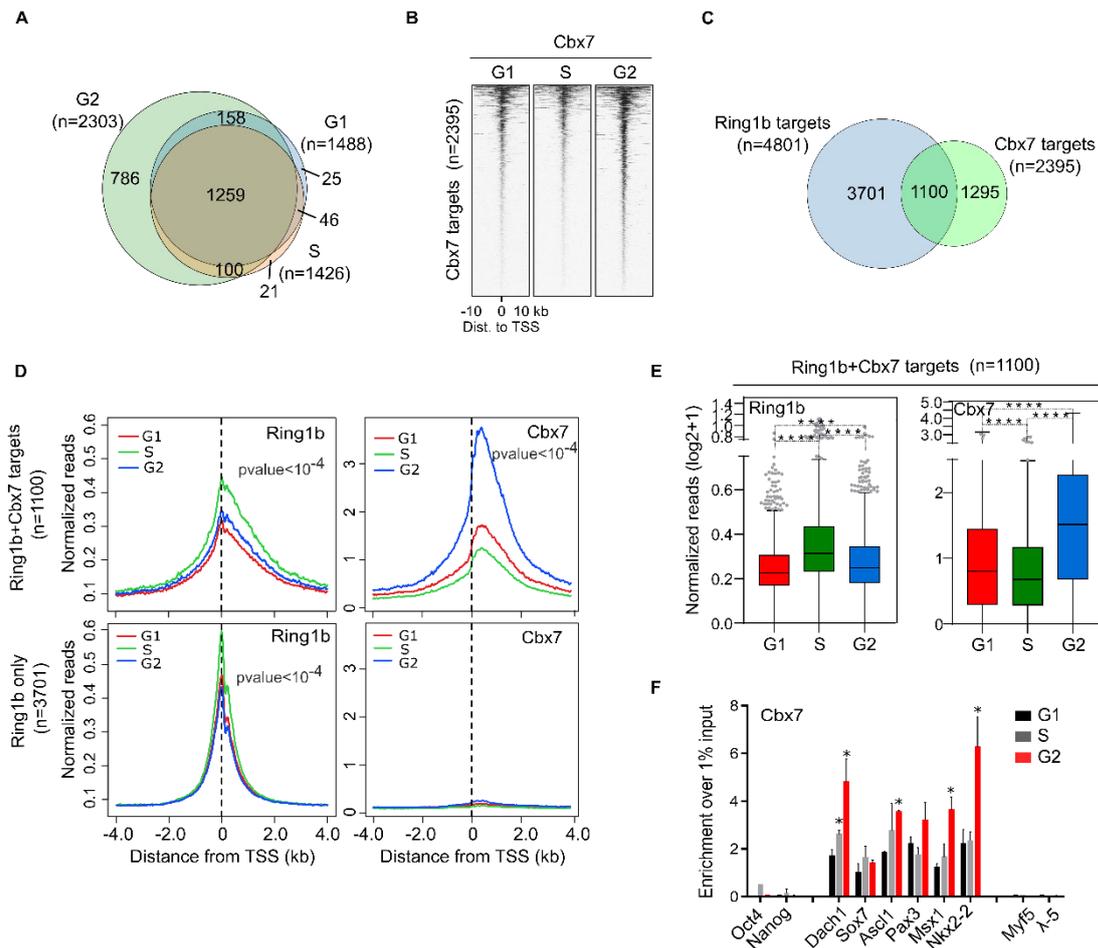


Figura RII-3. Cbx7 se acumula en los promotores diana durante fase G2. *A)* Diagrama de Venn de los promotores identificados como dianas en cada una de las fases del ciclo celular (G1, S, G2) para Cbx7. El sumatorio de las tres fases da como resultado 2395 dianas totales. *B)* Heatmap representando las lecturas normalizadas de ChIP-seq para Cbx7 alrededor del TSS de los promotores diana de Cbx7 en las diferentes fases del ciclo celular. *C)* Diagrama de Venn de los promotores diana de Ring1b obtenidos en la figura RII-1A y los promotores diana totales de Cbx7. *D)* Gráfico de unión media de Ring1b (izquierda) y Cbx7 (derecha) alrededor del TSS de las dianas de Ring1b+Cbx7 ($n=1100$, arriba) y las dianas exclusivas de Ring1b ($n=3701$, abajo) en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). *E)* Cuantificación de la señal de unión de Ring1b (izquierda) y Cbx7 (derecha) en las regiones promotoras (-0.5 kb a +1.5 kb respecto al TSS) de los genes diana de Ring1b+Cbx7 en las fases del ciclo celular indicadas. *F)* Histograma que muestra el enriquecimiento de Cbx7 en regiones promotoras seleccionadas como dianas de PRC1 (Dach1, Sox7, Ascl1, Pax3, Msx1, Nkx2-2) en G1 (negro), S (gris) y G2 (rojo) analizadas por ChIP-qPCR. Los promotores de genes activos (Oct4, Nanog, Hprt1) e hipermetilados (Myf5, λ -5) se utilizaron como controles negativos. Cada fase aparece normalizada respecto a su propio input. Se muestra la media \pm SEM de cuatro réplicas.

E, F * marca diferencias estadísticamente significativas.

El complejo cPRC1 se ha asociado con regulación de la estructura tridimensional de la cromatina, mediando interacciones entre regiones a las que se une (Eskeland et al., 2010; Kundu et al., 2017). Es por ello, que decidimos analizar si este reclutamiento diferencial a lo largo del ciclo celular de cPRC1 también afecta a las interacciones entre regiones de cromatina durante la transición de ciclo. Para

abordar esta pregunta establecimos una colaboración con el laboratorio del Dr. Robert J. Klose en la Universidad de Oxford para realizar un análisis mediante Capture-C, una técnica basada en la captura de la conformación de cromosomas o 3C (*chromosome conformation capture*). Este tipo de análisis nos permite analizar las interacciones que tienen lugar entre un grupo previamente seleccionado de promotores (206 promotores en total, de los cuales 109 son dianas de Polycomb) y otras regiones del genoma mediante el uso de sondas de oligonucleótidos de RNA para capturar regiones del genoma de interés, lo que nos permite realizar un análisis *many-versus-all*. El análisis mediante Capture-C de las interacciones que tienen lugar en promotores unidos simultáneamente por Ring1b y Cbx7 y positivos para ATAC-seq (regiones accesibles asociadas con promotores y potenciadores) (promotores = 34/ interacciones=151) en G1 y G2, manifiesta un incremento de la intensidad de interacción durante fase G2 en comparación con G1 (Figura RII-4A, B). Además, las interacciones detectadas en promotores no Polycomb (promotores = 41/interacciones = 261) no muestran diferencias entre G1 y G2, lo que sugiere que esta regulación de las interacciones tridimensionales de cromatina a través del ciclo celular sucede específicamente en las dianas de Polycomb (Figura RII-4C). Esto puede observarse también en un ejemplo de promotor individual (*Nkx2-2*), donde vemos cómo los picos de interacción en G2 son más intensos que en G1 (Figura RII-4D). Para confirmar estos resultados, decidimos realizar un análisis de gen candidato mediante 4C-seq, que nos permite analizar también interacciones de cromatina, pero en genes candidatos mediante PCR inversa usando oligonucleótidos específicos. Este análisis se realizó en colaboración con el grupo de Álvaro Rada-Iglesias en el CMMC de Colonia (Alemania), durante mi estancia de doctorado. El análisis de la interacción que tiene lugar entre el promotor del gen *Six2* y el promotor del gen *Six3* sugiere nuevamente que las interacciones promotor-promotor suceden de manera más intensa durante fase G2 (Figura RII-4E). En conjunto, estos resultados demuestran que cPRC1 se recluta preferentemente durante fase G2, probablemente gracias a una mayor deposición de la marca H3K27me3, y que el enriquecimiento de este complejo en G2 se asocia con interacciones más robustas entre regiones de cromatina reguladas por Polycomb.

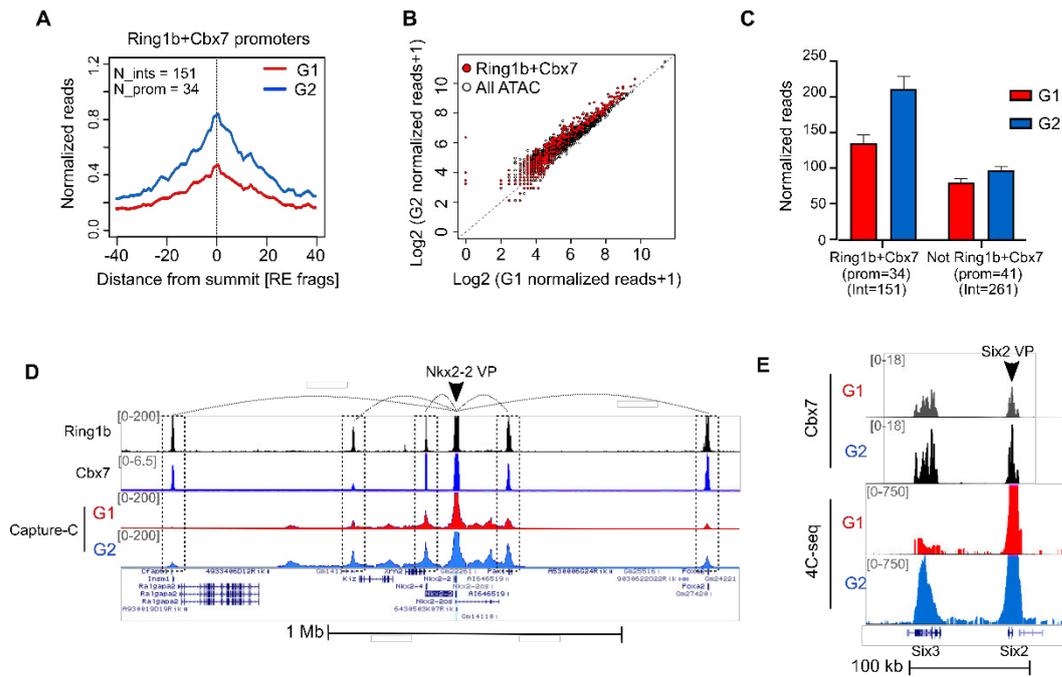


Figura RII-4.- Las interacciones tridimensionales de los promotores diana de Ring1b y Cbx7 aumentan en fase G2. **A)** Gráfico de enriquecimiento medio de Capture-C donde se muestran las interacciones ($n=151$) que tienen lugar en promotores diana de Ring1b+Cbx7 ($n=34$) accesibles (ATAC+) alrededor del centro del pico de interacción, en G1 (rojo) y G2 (azul). **B)** Gráfico de puntos donde se comparan las lecturas normalizadas de Capture C entre G1 y G2. Los círculos blancos representan sitios accesibles (ATAC+), pero no unidos por Ring1b+Cbx7. Los círculos coloreados de rojo representan las lecturas en los sitios accesibles (ATAC+) y unidos por Ring1b+Cbx7. **C)** Media+SEM de la intensidad de interacción en G1 (rojo) y G2 (azul) de las interacciones que tienen lugar con los promotores Ring1b+Cbx7 y los promotores no asociados a Ring1b+Cbx7. **D)** Imagen del visualizador de genoma donde se observan los picos de interacción detectados por Capture-C entre el promotor del gen Nkx2-2 (viewpoint, VP) y otros promotores y regiones adyacentes en fase G1 (rojo) y G2 (azul). Los rectángulos delimitan los picos de interacción donde se une Ring1b y Cbx7, que se muestran como control. **E)** Imagen del visualizador de genoma en el que se observan los resultados obtenidos mediante 4C-seq del promotor Six2 (viewpoint, VP) en fase G1 (rojo) y G2 (azul). Se muestra el pico de interacción de Six2 (derecha) con Six3 (izquierda). Cbx7 se muestra como control en las fases indicadas.

Con el fin de entender si esta distribución de ciclo de las proteínas del complejo PRC1 se deben o no a cambios en la cantidad de proteína disponible en cada fase, analizamos los niveles globales de proteína de Ring1b, Rybp, Cbx7 y H2AK119ub1 en extractos totales y en subfracciones celulares a lo largo del ciclo celular. Los resultados de este análisis muestran que la cantidad de proteína global y unida a cromatina es estable durante el ciclo celular (Figura RII-5A, B, C) lo que sugiere que el reclutamiento diferencial de estas proteínas a la cromatina puede deberse a cambios en la distribución de la proteína asociada a la cromatina durante la transición de ciclo (Figura RII-5D).

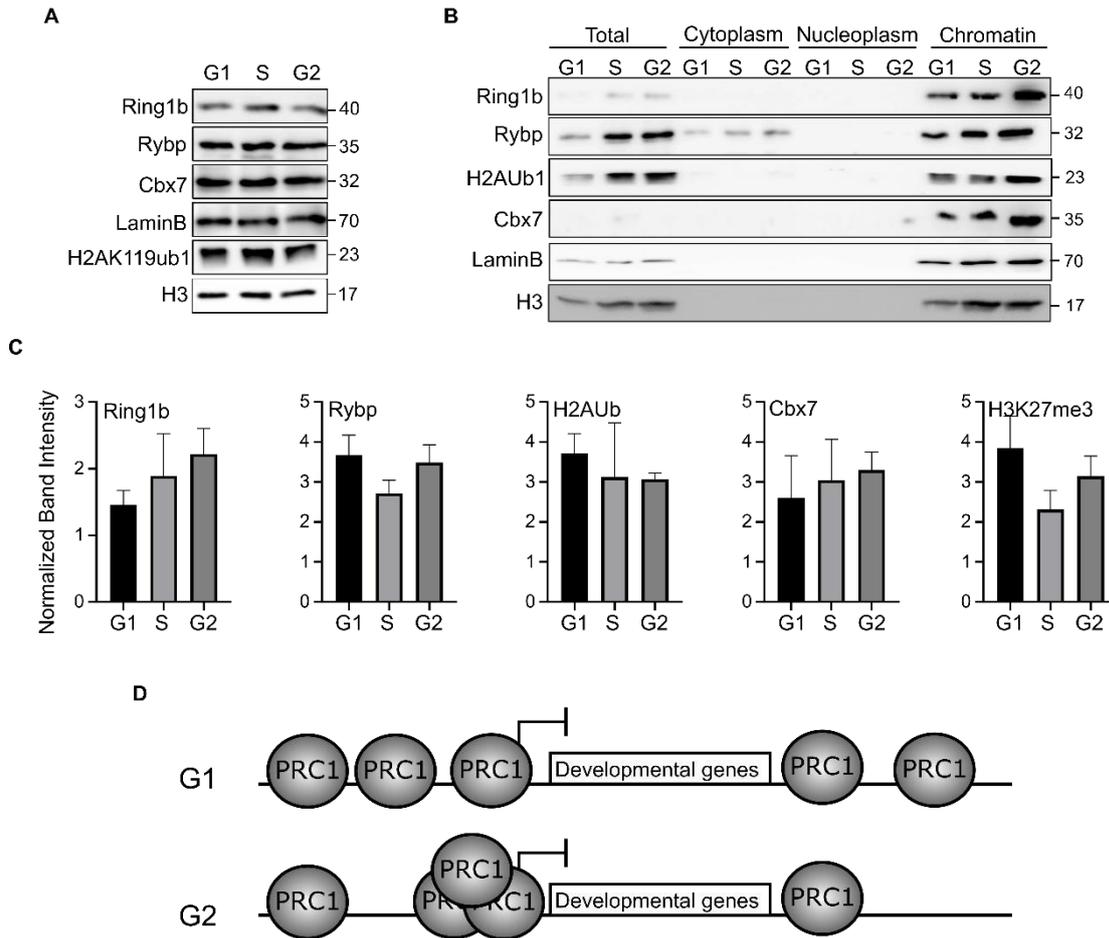


Figura RII-5. La acumulación progresiva de PRC1 a lo largo del ciclo se debe a cambios de distribución de las proteínas unidas a la cromatina. A) Análisis por western blot de lisados totales de proteína comparando los niveles de las proteínas Ring1b, Rybp, Cbx7 y la marca H2AK119ub1 en G1, S y G2. La lamina B se utilizó como control de carga. **B)** Análisis por western blot de los niveles de las proteínas Ring1b, Rybp, Cbx7 y la marca H2AK119ub1 en diferentes fracciones celulares (fracciones total, citoplasma, nucleoplasma y cromatina) a lo largo del del ciclo celular. La lamina B y la histona 3 (H3) se utilizaron como control de carga en la fracción de cromatina. **C)** Histogramas que muestran la cuantificación normalizada de la intensidad de las bandas (utilizando la media de intensidad de Lamina B y H3 como control) del análisis por fraccionamiento celular presentado en (B). Se muestra la media \pm SEM de tres experimentos.

4.- Las dianas comunes de PRC2/cPRC1/vPRC1 están enriquecidas en factores de transcripción asociados a desarrollo embrionario y están reguladas a través del ciclo celular de manera más evidente.

A continuación, sabiendo que el reclutamiento diferencial a lo largo del ciclo celular de los subcomplejos de PRC1 tiene lugar en las dianas de cada complejo por separado, nos preguntamos qué sucede en las dianas comunes para ambos complejos y para PRC2, con el fin de entender si existe relación entre el reclutamiento de estos complejos a lo largo del ciclo celular. Para obtener estas dianas comunes, cruzamos

los promotores diana de Ring1b, Rybp, Cbx7 y Ezh2 (Figura RII-6A). Esto nos permite visualizar dos grupos muy claros: un conjunto de promotores que son dianas simultáneamente de vPRC1/PRC2/cPRC1 (n=1036) y otro grupo que son dianas específicas de vPRC1 (Ring1b+Rybp, n=3013). Interesantemente, el análisis ontológico de ambos grupos de dianas revela procesos biológicos y funciones moleculares claramente diferenciadas. Así, mientras las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 aparecen enriquecidas en procesos asociados con desarrollo embrionario y en factores de transcripción, las dianas específicas de vPRC1 se asocian a procesos metabólicos y receptores de membrana (Figura RII-6A).

La representación de la unión media alrededor del TSS a lo largo del ciclo celular de las proteínas que componen el complejo PRC1 junto con la síntesis de RNA, revela que, globalmente, en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 el reclutamiento de los complejos PRC1 es más significativo, lo que repercute en una mayor deposición de la marca H2AK119ub1 y tiene como consecuencia una mayor represión génica (Figura RII-6B). Por el contrario, las dianas específicas de vPRC1 exhiben niveles más bajos de Rybp y apenas se detecta la marca H2AK119ub1, por lo que los niveles de expresión medios alcanzan valores similares a los de un gen activo (compárese con el grupo de genes activos en Figura RI-5B). Sin embargo, es destacable que, para ambos grupos de genes los niveles de Ring1b son similares. Adicionalmente, las dianas comunes muestran claramente una regulación del reclutamiento dependiente de ciclo celular, lo que se refleja también en la síntesis de RNA de estas dianas (Figura RII-6C) en comparación con las específicas de vPRC1 (Figura RII-6B). En conjunto, estos resultados muestran que los complejos represores Polycomb colaboran para reprimir genes asociados a desarrollo embrionario y que esta represión se encuentra regulada en la progresión de ciclo celular. El complejo vPRC1 por separado es capaz de unirse a otras dianas no asociadas con genes de desarrollo, como ya se ha demostrado en otras publicaciones (Morey et al., 2013; Scelfo et al., 2019; Zepeda-Martinez et al., 2020), pero en este contexto aislado de los demás complejos Polycomb no parece que vPRC1 ejerza una represión génica suficientemente robusta en estos genes para que tenga consecuencias en los niveles de expresión a lo largo del ciclo celular.

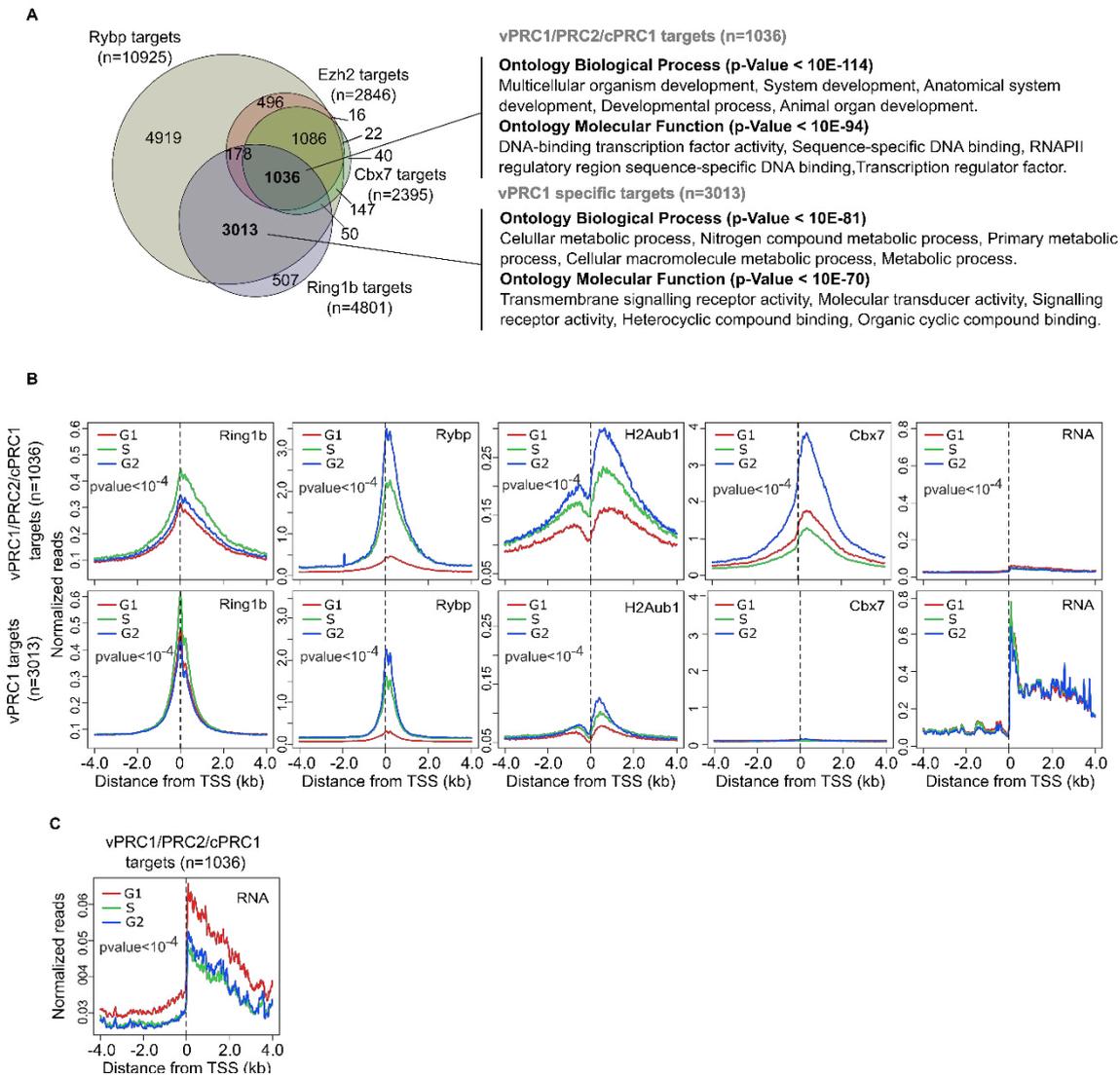


Figura RII-6. Los promotores diana comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 están enriquecidos en factores de transcripción de desarrollo, reclutan más PRC1 y se encuentran regulados por ciclo.
A) Diagrama de Venn de los promotores diana de Ring1b, Rybp, Cbx7 y Ezh2 (izquierda) y análisis de ontología (derecha) de los dos grupos de dianas aislados: dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 (n=1036) y dianas específicas de vPRC1 (n=3013). El p-valor se muestra junto a cada categoría. **B)** Gráficos de unión media de Ring1b, Rybp, Cbx7, H2AK119ub1 y síntesis de RNA alrededor del TSS en los promotores diana comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 (arriba) y los promotores específicos de vPRC1 (abajo) en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul). **C)** Promedio de la producción de RNA naciente en los promotores diana comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 en G1 (rojo), S (verde) y G2 (azul).

5.- La eliminación de Ring1b provoca una pérdida de las interacciones tridimensionales de cromatina e induce un aumento de la expresión en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 en G2.

Con el objetivo de entender qué implicaciones tiene a nivel funcional la acumulación de los complejos Polycomb en los promotores diana conforme las células avanzan a través del ciclo celular, empleamos la línea celular Ring1a-/-;

Ring1bfl/fl; Rosa26::CreERT2 (Endoh et al., 2008) para realizar un análisis de Capture-C y 4sU-seq en células mutantes para Ring1b separadas en fracciones de ciclo. La eliminación de Ring1b en esta línea se induce mediante tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (TMX) durante 72 horas, lo que conduce a un descenso generalizado de la marca H2AK119ub1 catalizada por Ring1b (Figura RII-7A, B, C).

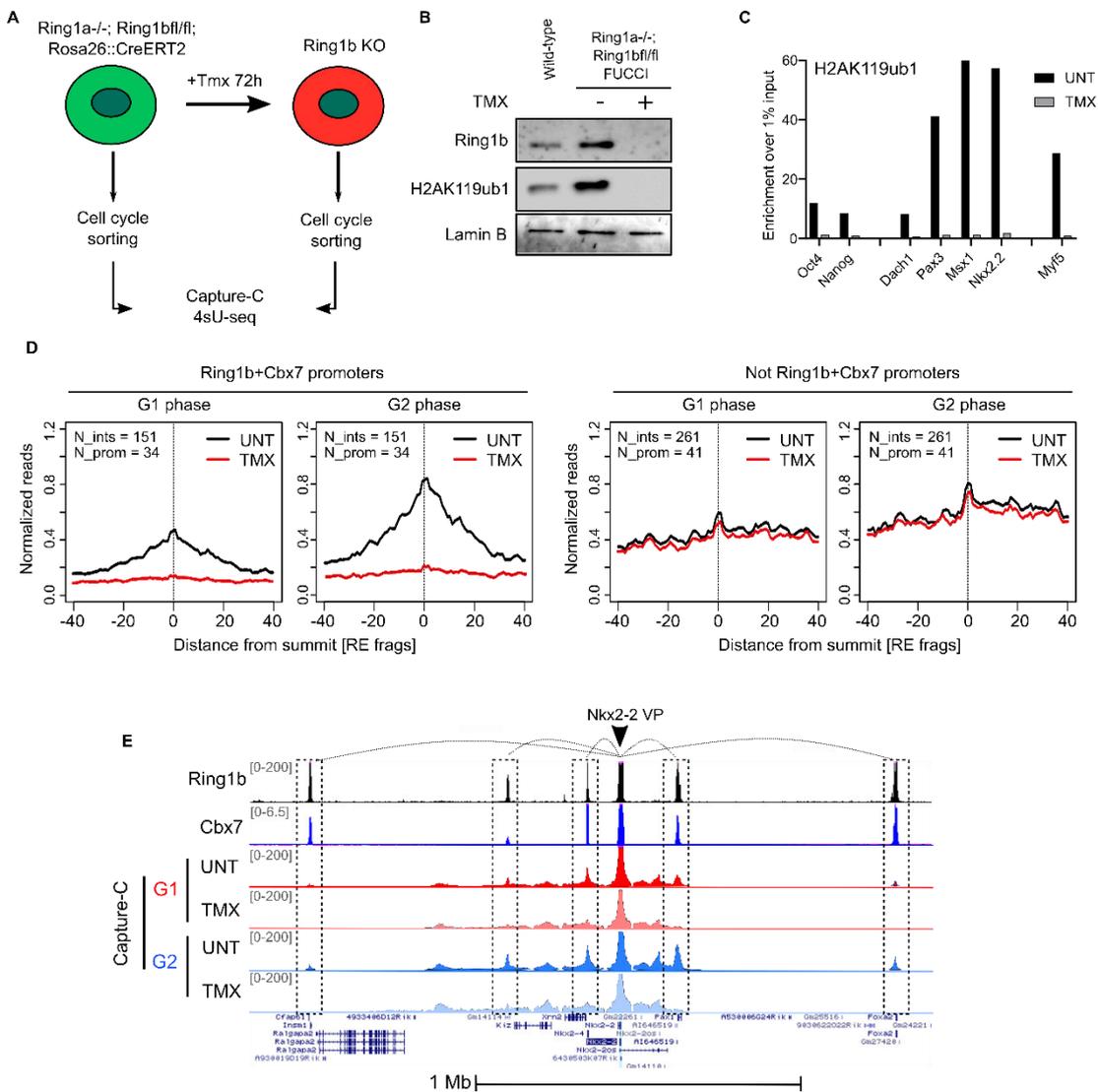


Figura RII-7. La eliminación de Ring1b provoca la pérdida de las interacciones tridimensionales de cromatina en G1 y G2. *A)* Esquema representando el procedimiento experimental para la generación de la mutación de Ring1b en la línea Ring1a^{-/-}; Ring1bfl/fl; Rosa26::CreERT2 y el análisis de fracciones de ciclo mediante Capture-C y 4sU-seq. *B)* Análisis por western blot de lisados totales de proteína de Ring1b y H2AK119ub1 en células madre embrionarias silvestres (izquierda), células Ring1a^{-/-}; Ring1bfl/fl sin tratar con 4-hidroxitamoxifeno (-) (centro) y células Ring1a^{-/-}; Ring1bfl/fl tratadas con 4-hidroxitamoxifeno (+) (derecha). La lamina B se utilizó como control de carga. *C)* Histograma que muestra el enriquecimiento analizado por ChIP-qPCR de la marca H2AK119ub1 en regiones promotoras seleccionadas como dianas de PRC1 (Dach1, Pax3, Msx1, Nkx2-2) y otras regiones candidatas de genes activos (Oct4, Nanog) e hipermetilados (Myf5) en la línea Ring1a^{-/-}; Ring1bfl/fl no tratada (negro, UNT) y tratada con 4-hidroxitamoxifeno (gris, TMX). Se muestra el resultado de una réplica. *D)* Gráficos de lecturas medias

normalizadas de Capture-C de las interacciones ($n=151/n=261$) que tienen lugar en promotores diana accesibles (ATAC +) de Ring1b y Cbx7 ($n=34$) (izquierda) y promotores no diana de Ring1b y Cbx7 ($n=41$) (derecha) alrededor del centro del pico de interacción, en la línea Ring1a-/-; Ring1bfl/fl no tratada (negro) y tratada con 4-hidroxitamoxifeno (rojo) en las fases del ciclo celular indicadas. E) Imagen del visualizador de genoma donde se observan los picos de interacción detectados por Capture-C entre el promotor del gen Nkx2-2 (viewpoint, VP) y otros promotores y regiones adyacentes en células silvestres para Ring1b (UNT) y mutantes (TMX) en G1 y G2. Los rectángulos delimitan los picos de interacción unidos por Ring1b y Cbx7, que se muestran como controles.

En primer lugar, analizamos cómo la eliminación de Ring1b y, por consiguiente, de PRC1, afecta a las interacciones tridimensionales de cromatina. Los resultados de Capture-C en G1 y G2 muestran que las interacciones se pierden en ambas fases en los promotores unidos por Ring1b y Cbx7 en el mutante de Ring1b, hecho que no sucede en los promotores que no son diana de estas proteínas (Figura RII-7D). Sin embargo, hay que destacar que la bajada de intensidad de interacción es significativamente mayor en G2 respecto a la línea silvestre para Ring1b. Este resultado puede observarse también en un gen candidato (*Nkx2-2*) mediante un visualizador de genoma, donde puede verse cómo los picos de interacción desaparecen en el mutante de Ring1b en ambas fases (Figura RII-7E). Esto sugiere que cPRC1 es necesario para mediar interacciones de cromatina tanto en fase G1 como en fase G2 en sus promotores diana.

En segundo lugar, nos preguntamos qué consecuencias tiene la eliminación de PRC1 a nivel transcripcional. Para responder a esta pregunta, llevamos a cabo un análisis de 4sU-seq en células silvestres y mutantes para Ring1b en G1, S y G2. Asombrosamente, en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 se observa con claridad como la depleción de Ring1b impacta principalmente en la síntesis de RNA durante fase G2, donde un porcentaje alto de estos genes (89.3%) aumentan su expresión respecto al silvestre, mientras que en G1 y S los efectos de la eliminación de Ring1b no son tan notables (aumenta la expresión en un 7.6% y en un 14.1% de los genes respectivamente). Esto contrasta visiblemente con el grupo de dianas específicas de vPRC1 donde los efectos en la expresión son menos apreciables (Figura RII-8A). En el análisis de síntesis de RNA medio alrededor del TSS se observan resultados similares. Mientras que los genes diana específicos de vPRC1 no exhiben diferencias notables en la expresión tras eliminar Ring1b en ninguna de las fases del ciclo, las dianas de comunes de Polycomb manifiestan un incremento de la expresión en el mutante de Ring1b que se hace más marcada conforme las células progresan a través del ciclo celular, repercutiendo principalmente en fase G2 (Figura

RII-8B). Esto también puede observarse en genes individuales ejemplo de cada uno de los grupos de dianas (*Cbx2*, *Eif5*) (Figura RII-8C). En cualquier caso, este aumento de la expresión no alcanza los niveles de un gen activo, lo que apoya datos que sugieren que PRC1 está implicado en controlar la frecuencia con la que se producen eventos de transcripción pero no el número de transcritos que se producen en cada

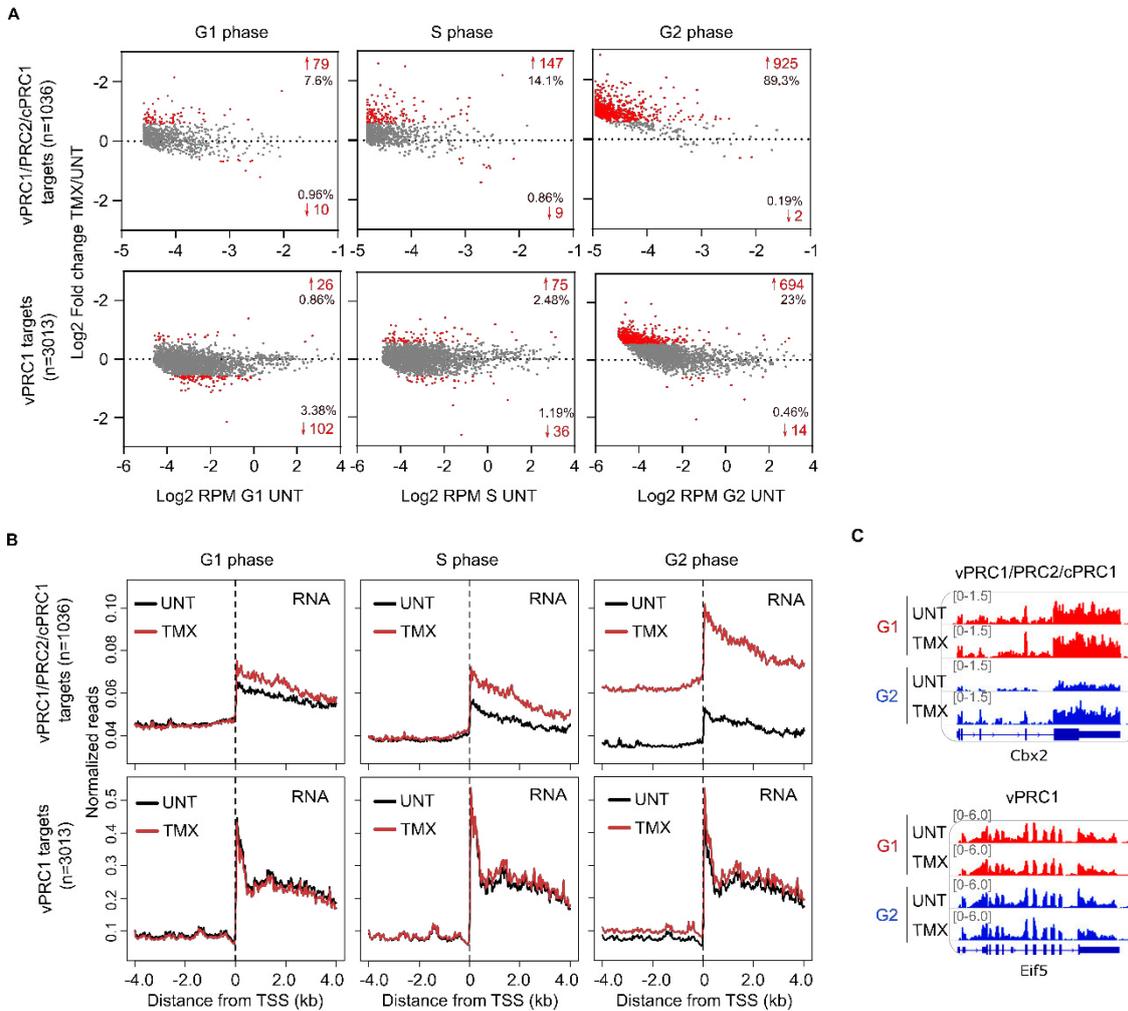


Figura RII-8. El mutante de Ring1b exhibe un aumento de la expresión en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 en fase G2. *A*) MA-plots del log2 del cambio en la expresión (FC) en células *Ring1a*^{-/-}; *Ring1b*^{fl/fl} sin tratar (UNT) y tratadas con 4-hidroxitamoxifeno (TMX) en el grupo de dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 (arriba) y en las dianas específicas de vPRC1 (abajo) en las fases de ciclo indicadas. Se muestran en rojo los cambios significativos con FC>1.5. Para cada fase se muestran el número de genes que aumentan y disminuyen su expresión tras la eliminación *Ring1b*, así como el porcentaje de genes del total de cada grupo que cambian para cada condición. *B*) Promedio de la producción de RNA naciente en la línea silvestre para *Ring1b* (negro, UNT) y mutante (rojo, TMX) en los promotores diana comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 (arriba) y en los promotores diana específicos de vPRC1 (abajo) en G1, S y G2. *C*) Vista del visualizador de genoma IGV de la producción de RNA en G1 (rojo) y G2 (azul) en la línea silvestre (UNT) y mutante (TMX) para *Ring1b* en dos genes candidatos ejemplo de cada uno de los grupos de genes analizados: *Cbx2* (vPRC1/PRC2/cPRC1) y *Eif5* (vPRC1).

evento (Dobrinić et al., 2021). En conjunto estos resultados muestran que PRC1 es necesario para reprimir los genes diana asociados con desarrollo embrionario principalmente en G2, mediante el reclutamiento de otras proteínas Polycomb y el establecimiento de interacciones de cromatina que hagan menos accesible el promotor. Además, el reducido efecto a nivel de síntesis de RNA de la eliminación de Ring1b en G1 también abre claros interrogantes acerca de cómo se regula la transcripción en esta fase.

Discusión

Discusión

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la regulación ejercida por los complejos represores Polycomb (PRCs) en los promotores bivalentes es dinámica y cambia a lo largo del ciclo celular, asentando las bases de un ciclo epigenético, que se sucede de forma paralela al ciclo de vida de la célula, en el que se producen cambios en el estado de la cromatina que favorecen, en fase G1, o dificultan, en fase S/G2, la salida de pluripotencia en mESCs (Figura D1). Esta conclusión se apoya en diversos análisis de ChIP-seq de proteínas que conforman los diferentes PRCs y que muestran que los complejos PRC2.2, vPRC1 y cPRC1 se reclutan de forma más robusta durante S y G2, lo que conlleva a un aumento de las marcas epigenéticas que catalizan (H3K27me3 y H2AK119ub1) en estas fases, mientras que PRC2.1 es

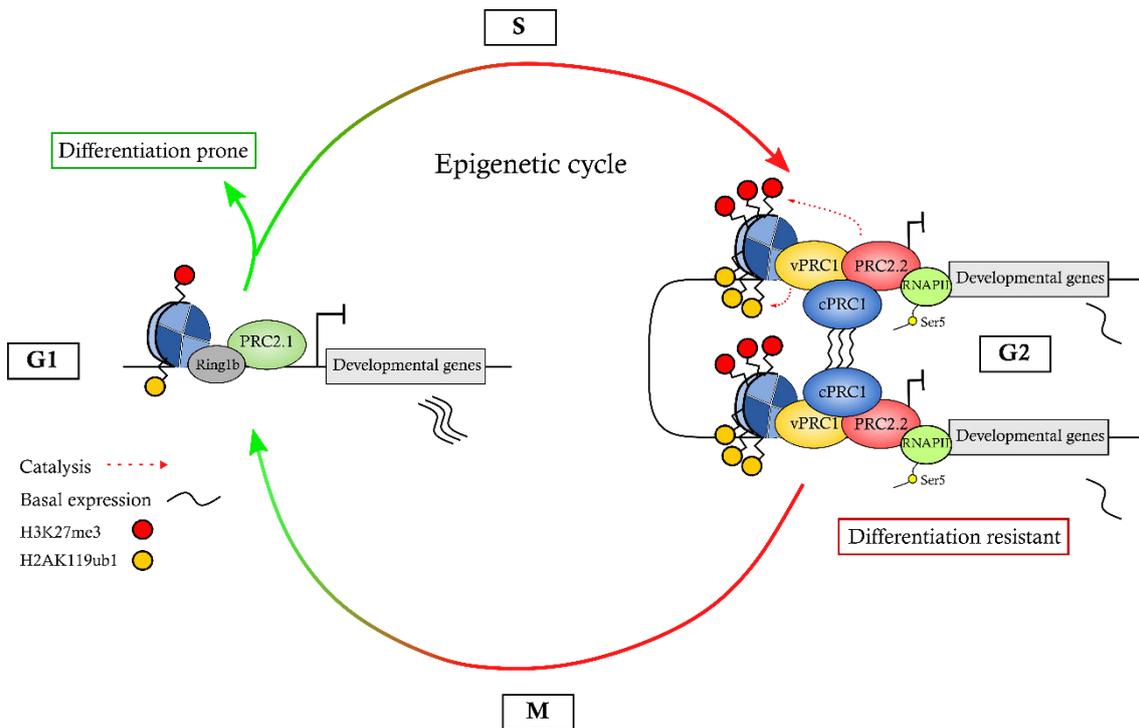


Figura D1. La dinámica de reclutamiento de los PRCs a lo largo del ciclo celular conforma un ciclo epigenético que determina la capacidad de la célula para diferenciarse. Modelo que representa cómo las proteínas Polycomb regulan los genes de desarrollo embrionario a través del ciclo celular. Durante G1 (izquierda), la reducida presencia de los complejos con mayor capacidad represora conforma un estado de la cromatina que hace que sea más proclive a la expresión de estos genes y, por tanto, a iniciar diferenciación. Esto se refleja en una expresión basal más elevada respecto a S y G2. PRC2.1 (verde) aparece unido en esta fase junto a Ring1b (gris). Por el contrario, en fase G2 (derecha), se produce un reclutamiento masivo de vPRC1 (amarillo), PRC2.2 (rojo) y cPRC1 (azul) que inducen una mayor represión a través de la catálisis de las marcas de histonas asociadas (H2AK119ub1 y H3K27me3) y controlando la conformación tridimensional de cromatina, traduciéndose en una reducción de la expresión basal, que hace que se acumule la Ser5-RNAPII (verde) en el promotor, y un incremento de la intensidad de las interacciones entre regiones de cromatina. Esta situación genera un estado de la cromatina resistente a diferenciación. Esta actividad diferencial de los complejos Polycomb a través de G1, S y G2 genera un ciclo epigenético, que cursa en paralelo al ciclo celular, y que hace más o menos permisiva la salida de pluripotencia en función de la fase en la que se encuentre la célula en el momento de la recepción de señales de diferenciación.

reclutado predominantemente en G1. Estas diferencias de reclutamiento tienen como consecuencia cambios en la represión génica que se traducen en una mayor expresión basal en fase G1, coincidente con un estado de la cromatina más permisivo. Este resultado se correlaciona también con una menor presencia de Ser5-RNAPII en el promotor durante fase G1, en contraste con S y G2, donde la Ser5-RNAPII tiende a acumularse. Además, mediante Capture-C y 4C-seq mostramos que la acumulación de PRCs durante la progresión de ciclo celular en G2 deriva también en interacciones de cromatina más marcadas entre regiones unidas por Polycomb, lo que probablemente limite la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a la cromatina conformando un estado resistente a la activación génica y salida de pluripotencia. A continuación, se discuten en detalle dichos resultados.

1.- El reclutamiento de los PRCs a sus genes dianas está regulado a través del ciclo celular.

En primer lugar, para comprender cómo actúa PRC2 a través del ciclo celular, llevamos a cabo análisis de ChIP-seq, tanto de la subunidad catalítica Ezh2, como de las subunidades accesorias de los subcomplejos PRC2.1 (EPOP y EloB) y PRC2.2 (Jarid2) en las diferentes fases del ciclo celular. Nuestros resultados muestran que EPOP y EloB son reclutados a los promotores bivalentes principalmente durante fase G1, al contrario que Jarid2 que tiende a ser reclutado mayoritariamente en G2. De acuerdo con esto, hemos visto que la subunidad catalítica Ezh2 aparece claramente más unida durante G2, lo que indica que la regulación a lo largo del ciclo celular no es exclusiva de las subunidades accesorias, sino que sucede también para el *core* del complejo. Esto está de acuerdo con estudios previos que apuntan a que la capacidad de unión de Ezh2 a la cromatina está regulada a través del ciclo celular mediante fosforilación por Cdk1 y Cdk2 en los residuos T345 y T487 (Kaneko et al., 2010; Wei et al., 2011). Asimismo, se ha señalado que la presencia de EPOP en el complejo disminuye la capacidad de unión de PRC2 a la cromatina (Beringer et al., 2016) mientras que Jarid2 favorece el reclutamiento de PRC2 y potencia la actividad catalítica (Landeira et al., 2010; Pasini et al., 2010a; Peng et al., 2009; Shen et al., 2009). Por tanto, el reducido reclutamiento de Ezh2 en fase G1 probablemente sea consecuencia de la acumulación de EPOP-PRC2 en lugar del complejo Jarid2-PRC2, lo que se corresponde con análisis en los que se hace referencia a la existencia de un

balance de unión entre PRC2.1-PRC2.2 a la cromatina que se pierde cuando se altera alguno de los dos complejos (Healy et al., 2019). Además, el reclutamiento de PRC2.1 es probablemente independiente de la presencia de otros PRCs durante G1 debido a su capacidad de unión a la cromatina a través del reconocimiento de islas CpG por la subunidad Pcl que forma parte de este complejo (Healy et al., 2019; Li et al., 2017; Perino et al., 2018), lo que explica por qué el reclutamiento de Ezh2 es menor esta fase. Mientras tanto, el aumento de Ezh2 en G2 está de acuerdo con una mayor presencia de Jarid2, cuyo reclutamiento es especialmente dependiente de vPRC1 a través de la marca H2AK119ub1 (Blackledge et al., 2014; Cooper et al., 2016b; Fursova et al., 2019; Healy et al., 2019; Sugishita et al., 2021), más predominante durante G2.

Una hipótesis que barajamos es que las diferencias halladas en el reclutamiento de Ezh2 quizás podrían ser consecuencia de que sea su proteína paróloga Ezh1 la que constituye el complejo PRC2 durante fase G1. Ezh1 se expresa a niveles similares a Ezh2 en mESCs (Mousavi et al., 2012), comparte con Ezh2 las subunidades del *core* de PRC2 (Suz12/Eed) y co-ocupa los mismos conjuntos de genes en ESCs (Lavarone et al., 2019; Margueron et al., 2008; Shen et al., 2008). La presencia de Ezh1-PRC2 en lugar de Ezh2-PRC2 durante fase G1 encaja con la reducción de la marca H3K27me3 observada durante esta fase, puesto que Ezh1 presenta pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos del sitio catalítico respecto a Ezh2 que reducen su respuesta a la estimulación alostérica, disminuyendo su capacidad catalítica (Lee et al., 2018b), por lo que no es capaz de propagar la marca de metilación de la H3K27 (Lavarone et al., 2019). Además, en mutantes de Ezh2, Ezh1 ha demostrado ser capaz de contrarrestar en parte la falta de Ezh2-PRC2, ya que no se han observado cambios en la expresión de los genes que coregulan, ni en el reclutamiento de Ring1b (Lavarone et al., 2019; Margueron et al., 2008). Esto sugiere que Ezh1-PRC2 podría estar actuando como represor transcripcional en G1 en sustitución de Ezh2-PRC2, bien catalizando la marca H3K27me2 (Lavarone et al., 2019) o bien, como se ha sugerido previamente, mediando compactación de cromatina (Margueron et al., 2008). Ezh1 interacciona, además, con EPOP por lo que podría estar constituyendo el complejo PRC2.1 en G1 (Beringer et al., 2016), y se ha reportado que Ezh1 posee una gran afinidad para unirse directamente a nucleosomas en comparación con Ezh2 (Lee et al., 2018b), justificando también el

reclutamiento de Ezh1-PRC2.1 de forma independiente de otros complejos y marcas en esta fase.

En base a nuestros resultados de ChIP-PCR, el incremento de PRC2.2 en G2 lleva también asociado un aumento de la marca H3K27me3 en esta fase en promotores bivalentes candidatos en relación con G1 y S. Este mismo resultado lo hemos podido observar recientemente mediante ChIP-seq de H3K27me3 (datos no mostrados), en el que vemos que esta marca aparece especialmente enriquecida en G2 en genes bivalentes, lo que conecta, no solo con un aumento del reclutamiento de Ezh2 en esta fase, sino también con una mayor unión de Cbx7-PRC1 (Min et al., 2003). A pesar de que algunos estudios en células somáticas muestran que la marca H3K27me3 se diluye tras la replicación en fase S debido a que la incorporación de esta marca es dependiente de secuencia y requiere más tiempo para establecerse que las marcas de mono- y di- metilación (Alabert et al., 2015; Alabert et al., 2020), otros autores han sugerido que, tanto en células diferenciadas como en ESCs, la reincorporación de la H3K27me3 a la cromatina tras replicación se produce rápidamente y de forma simultánea a la incorporación de las nuevas histonas (Hansen et al., 2008; Petruk et al., 2017). Estos datos que proponen una recuperación inmediata de la marca H3K27me3 tras fase S están de acuerdo con que en nuestros resultados no observemos una disminución de esta marca durante fase G2. El aumento de H3K27me3 en G2 respecto a G1 podría deberse entonces al enriquecimiento de PRC2.2 en esta fase, cuya activación alostérica del complejo mediada por Jarid2 y Eed a través del reconocimiento de H2AK119ub1 y H3K27me3 respectivamente, desencadena una mayor propagación de la marca (Cooper et al., 2016b; Kalb et al., 2014; Lee et al., 2018a; Margueron et al., 2009). Sin embargo, existen datos que sugieren que, en hESCs separadas en G2, M y G1 por citometría tras tratamiento con nocodazol en base al contenido de DNA y la presencia de la marca H3S28p (específica de mitosis), los niveles de H3K27me3 se mantienen constantes de G2 a G1 a través de mitosis en genes bivalentes mediante ChIP-seq (Grandy et al., 2016). Por ello, a pesar de que los datos generados para la marca H3K27me3 coinciden con lo esperado en base al reclutamiento de Ezh2 y Cbx7, este resultado contradictorio nos hace plantearnos que 1) puedan existir mínimas diferencias en el reclutamiento de PRC2 y el establecimiento de H3K27me3 a lo largo del ciclo entre hECs y mESCs en base a las diferencias ya conocidas en la regulación

de ciclo celular y 2) que el anticuerpo empleado no esté reconociendo correctamente la marca H3K27me3 durante G1. Por ello, actualmente estamos contrastando estos resultados y comprobando la especificidad de los anticuerpos empleados en ambos estudios para corroborar si existe o no realmente una deposición diferencial de esta marca a lo largo del ciclo celular.

En segundo lugar, continuamos analizando cómo el complejo PRC1 es reclutado a través del ciclo celular mediante ChIP-seq de las proteínas Ring1b (*core*), Rybp (vPRC1), Cbx7 (cPRC1) y la marca asociada H2AK119ub1. El análisis de la subunidad catalítica Ring1b mostró sorprendentemente que, al contrario que Ezh2, Ring1b parece reclutarse de manera estable a lo largo del ciclo celular a sus promotores diana. Este resultado se ha confirmado recientemente con un segundo ChIP-seq de Ring1b empleando un anticuerpo diferente (Cell Signalling #5694) (datos no mostrados). Si bien, aunque en ambos ChIPs se detecta un ligero aumento de Ring1b (del 30%) en fase S y que quizás podría asociarse con un papel de reparación de DNA durante replicación (Bravo et al., 2015; Ginjala et al., 2011; Ismail et al., 2010), no se detectan diferencias en el enriquecimiento entre G1 y G2. En contraste, el análisis de proteínas específicas de los dos tipos de subcomplejos de PRC1, Rybp y Cbx7, revela que ambas proteínas se reclutan principalmente durante fase G2 a sus promotores diana. Este aumento en la unión de Rybp-PRC1 coincide con un incremento de la marca H2AK119ub1, catalizada predominantemente por este complejo (Fursova et al., 2019; Rose et al., 2016), en G2 en comparación con G1 y S. La reducida deposición de H2AK119ub1 en G1 sugiere que la capacidad catalítica de Ring1b en G1 es menor, coincidiendo con datos que reportan que la presencia de Rybp es necesaria para estimular la actividad E3 ligasa de Ring1b (Rose et al., 2016). A su vez, la tendencia de Cbx7-cPRC1 a reclutarse también durante G2 puede asociarse con el incremento de PRC2.2 y H3K27me3 (Min et al., 2003).

El incremento de ambos tipos de complejos PRC1 en G2 en contraste con el enriquecimiento constante de Ring1b a lo largo del ciclo nos hace preguntarnos cómo se encuentra unido o a qué se asocia Ring1b durante fase G1. Una de las posibilidades que podrían hipotetizarse es que Ring1b sea capaz de unirse directamente al DNA o a las histonas sin necesidad de ser reclutado por otras proteínas del complejo. En esta línea, se han reportado dos estudios estructurales donde se sugiere que el dímero Ring1b-Pcgg4 es capaz de unirse directamente al DNA (Bentley et al., 2011) y a la

superficie de las histonas H2A-H2B (McGinty et al., 2014). Junto a esto, experimentos con dobles *knockdown* (dKD) de Rybp y Cbx7 muestran que Ring1b no se desplaza completamente de la cromatina en promotores de genes diana tras la atenuación de la expresión de estas subunidades, y que los niveles de H2AK119ub1 no se reducen de forma significativa (Morey et al., 2013), lo que plantea que sea capaz de unirse en ausencia de estas proteínas accesorias. Otra posible hipótesis que podríamos barajar es que Ring1b se esté reclutando en G1 en un complejo vPRC1 constituido por Yaf2 en sustitución de Rybp, ya que esta proteína es activa también en mESCs, formando parte de manera preferente del complejo Pcgf6-PRC1, y su depleción tiene efectos en diferenciación (Zhao et al., 2018). Estos estudios sirven como base para plantear hipótesis que expliquen cómo Ring1b aparece regulado y unido a los promotores diana durante G1, sin embargo, resulta necesario realizar experimentos específicamente centrados en responder a esta pregunta. En cualquier caso, independientemente de cómo se encuentre unido Ring1b a la cromatina en esta fase, se puede hipotetizar que la unión constante de Ring1b a lo largo del ciclo celular puede ser una pieza que sirva como punto de anclaje para reclutar al resto de complejos conforme la célula avanza a través del ciclo celular.

Ante estos resultados, uno de los planteamientos que surgen rápidamente es si estas diferencias mostradas en la unión de las proteínas Polycomb en las diferentes fases del ciclo pueden deberse a cambios en la cantidad de proteína total disponible en la célula. En este trabajo hemos analizado los niveles de proteína totales y los niveles de proteína en subfracciones celulares de cada una de las proteínas analizadas a lo largo del ciclo celular y mostramos que no existen cambios en la cantidad de proteína total ni unida a cromatina entre fases del ciclo, como se había observado previamente para Ezh2 y H3K27me3 en células somáticas (Kaneko et al., 2010). Esto sugiere que los cambios observados mediante ChIP-seq en promotores responden más bien a cambios en la distribución y reclutamiento de las proteínas a la cromatina. Así pues, este resultado nos lleva preguntarnos qué regula la distribución y la capacidad de unión de estos complejos a los promotores en función de la fase del ciclo celular.

Tal y como se ha reportado previamente, el contexto de la cromatina ejerce un papel fundamental en la regulación de la formación de dominios Polycomb. En este sentido, por ejemplo, la presencia de la marca H3K4me3 disminuye la capacidad

metiltransferasa de PRC2 (Klymenko and Müller, 2004; Schmitges et al., 2011) y se ha sugerido que esta marca aumenta en fase G1 en genes bivalentes en hESCs (Singh et al., 2015), lo que nos brinda una posible explicación a la disminución del reclutamiento de PRC2.2 y H3K27me3 a los promotores en esta fase. Por otro lado, también podríamos hipotetizar que cambios en la metilación del DNA de los promotores podrían asociarse con cambios en la capacidad de unión de los complejos Polycomb, como se ha observado previamente (Bartke et al., 2010; Wu et al., 2010). Sin embargo, a pesar de que un estudio sugiere que los niveles globales de la marca de metilación de DNA 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) está regulada a lo largo del ciclo celular en hESCs (Singh et al., 2013), otro estudio muestra resultados opuestos en mESCs (Bachman et al., 2014). Además, datos de análisis de metilación por bisulfito generados en nuestro laboratorio (datos no mostrados) apuntan también a que la metilación del DNA (5-mC y 5-hmC) de promotores bivalentes es estable a lo largo del ciclo celular, lo que sugiere que el reclutamiento diferencial de Polycomb a sus genes diana no está mediado por diferencias en la metilación. Esto coincide con datos que muestran que el reclutamiento de PRC2 es independiente de metilación en mutantes de Dnmt3a (*de novo methyltransferase 3A*) y Tet1 (*ten-eleven translocation 1*) en promotores bivalentes en mESCs (Gu et al., 2018). En definitiva, aún no existen evidencias robustas sobre cuál es la relación molecular entre ciclo celular y reclutamiento de complejos Polycomb a promotores bivalentes en mESCs en cada fase del ciclo, por lo que se requiere una investigación más profunda que abra camino a responder esta pregunta.

2.- La unión diferencial de los PRCs tiene consecuencias en la represión transcripcional de sus genes diana durante el ciclo celular

Con el fin de comprobar si el reclutamiento dependiente de ciclo celular de las proteínas Polycomb tiene consecuencias en la expresión de sus genes diana, llevamos a cabo un análisis mediante 4sU-seq de mESCs separadas por ciclo celular. Este análisis revela diferencias específicas en la transcripción de los genes bivalentes donde se observa un incremento de la expresión en fase G1 en relación a S y G2. Los genes bivalentes permanecen inactivos en estadio de ESCs, por lo que las diferencias halladas en la expresión hacen referencia a la expresión basal, no identificándose niveles de expresión que sugieran una completa activación transcripcional. Así, en

fase G1, lo que detectamos es un aumento de la expresión basal o del goteo de transcripción, lo cual coincide con un estado de la cromatina más permisivo, donde encontramos principalmente unido el complejo PRC2.1, que ha sido descrito como necesario para el mantenimiento de niveles bajos de expresión en genes bivalentes (Beringer et al., 2016). Por el contrario, durante S y G2 la expresión basal disminuye en comparación con G1, conectado con un aumento claro del reclutamiento de PRC2.2, vPRC1 y cPRC1, sus marcas de histonas asociadas y, por tanto, de la represión.

Junto a esto, el análisis mediante ChIP-seq del enriquecimiento de Ser5-RNAPII, muestra claras diferencias en el enriquecimiento de esta conformación de la polimerasa a lo largo del ciclo celular, acumulándose principalmente en fase G2. Este resultado puede vincularse directamente con los datos observados en el análisis de expresión: durante fase G1 el goteo de transcripción es mayor, lo que sugiere que la Ser5-RNAPII “escapa” del sitio de inicio de la transcripción y, por tanto, no llega a acumularse en el promotor como sucede durante S y G2, donde existe un estado de la cromatina más represivo. Esto coincide además con estudios que muestran que la marca H2AK119ub1, principalmente enriquecida en G2, parece estar implicada en restringir la elongación de la RNAPII (Brookes et al., 2012; Stock et al., 2007), explicando por qué se ve favorecida la acumulación de la Ser5-RNAPII. Además, mutantes de PRC1 muestran una disminución clara de Ser5-RNAPII en el promotor de los genes diana, asociado a un incremento de la actividad transcripcional (Dobrinić et al., 2021; Stock et al., 2007). Este fenotipo podríamos asimilarlo a fase G1, donde los niveles de vPRC1 y H2AK119ub1 son reducidos y por, tanto, la restricción de la elongación es menor. Asimismo, un estudio reciente señala que vPRC1 y H2AK119ub1 ejercen un papel importante en la regulación del inicio de la transcripción a través del control de la frecuencia con la que se producen eventos de transcripción (Dobrinić et al., 2021), lo que puede integrarse perfectamente en nuestro modelo en el que un aumento de este complejo y esta marca en fase G2 podría estar reduciendo los eventos de transcripción y la salida de la RNAPII en relación a fase G1. Hay que destacar también que, a pesar de que la frecuencia de estos eventos parece estar controlada por vPRC1 y H2AK119ub1, no es así para el número de transcritos que se producen en cada evento (Dobrinić et al., 2021). Esto podría explicar por qué la reducida presencia de vPRC1 y H2AK119ub1 en fase G1

no induce activación del gen y tan solo deriva en un aumento de la expresión basal respecto a S y G2 debido a un aumento de la frecuencia de los eventos de transcripción.

Estos resultados relativos a la regulación de la transcripción a lo largo del ciclo celular pueden servirnos también como base para hipotetizar cómo se reclutan los PRCs a la cromatina en cada fase del ciclo, ya que se ha señalado que existe una relación directa entre transcripción y reclutamiento de las proteínas Polycomb a los promotores diana. Por una parte, se ha observado que los RNAs nacientes son necesarios para el reclutamiento de PRC2 a través de la formación de *R-loops* (Alecki et al., 2020; Kanhere et al., 2010; Long et al., 2020; Skourti-Stathaki et al., 2019) mientras que, por otro lado, se ha reportado que el RNA naciente compite por el sitio catalítico de Ezh2 y lo desplaza de la cromatina, reduciendo su reclutamiento (Beltran et al., 2016; Kaneko et al., 2014b; Wang et al., 2017b; Zhang et al., 2019). Estos resultados opuestos concilian en un “modelo de puente de RNA” en el que el umbral de expresión de los genes determina si se promueve el reclutamiento de PRC2 o se inhibe (Long et al., 2020). En nuestro modelo de ciclo, los niveles de RNA naciente que se producen en G1 podrían resultar suficientes para inhibir la unión y la actividad catalítica de PRC2.2, lo que explica el bajo enriquecimiento de Ezh2 y la marca H3K27me3 en esta fase, mientras que el RNA naciente producido durante S y G2 sirve, por el contrario, como punto de reclutamiento de PRC2. De este modo, durante fase G1 un aumento de la transcripción podría estar favoreciendo la expulsión de PRC2 para preparar al gen para una posible activación ante señales de diferenciación, mientras que la bajada de transcripción en S y G2 refuerza el reclutamiento, aumenta la represión y reduce las posibilidades de diferenciación durante esta ventana. Sin embargo, el hecho de que el control de los niveles de RNA naciente puedan servir como punto diferencial de reclutamiento de PRCs a lo largo del ciclo celular plantea una pregunta clara: ¿Es la disminución de PRC2 y H3K27me3 consecuencia del aumento de transcripción en G1 o al contrario? A pesar de que muchos estudios previos han sugerido que PRC2 es necesario para mantener la represión transcripcional de sus genes diana en mESC (Boyer et al., 2006; Pasini et al., 2007), otros estudios muestran que la alteración de PRC2 no tiene efectos severos en la expresión de los genes a los que regula (Dobrinić et al., 2021; Lavarone et al., 2019; Leeb et al., 2010; Petracovici and Bonasio, 2021), lo que sugiere que los

cambios en la expresión durante G1 posiblemente no sean consecuencia de la reducción de PRC2 y H3K27me3 sino más bien del bajo enriquecimiento de vPRC1 y H2AK119ub1 (Brookes et al., 2012; Dobrinić et al., 2021; Stock et al., 2007), cuya mutación sí que ha demostrado tener efectos más robustos en la expresión génica (Dobrinić et al., 2021; Fursova et al., 2019). Esto nos llevaría a un modelo donde la reducida presencia de vPRC1 y H2AK119ub1 en G1 es lo que permite un aumento de la frecuencia con la que se producen los eventos de transcripción y los niveles de RNA naciente (Dobrinić et al., 2021), lo que provoca a su vez la expulsión de PRC2.2 durante esta fase (Beltran et al., 2016; Kaneko et al., 2014b; Wang et al., 2017b; Zhang et al., 2019), promoviendo un estado de la cromatina más permisivo a la recepción de señales de diferenciación.

El papel de los PRCs en el control de los niveles de expresión y la actividad de la RNAPII se visualiza de forma clara en los ensayos en los que hemos eliminado alguna de las proteínas que conforman estos complejos. En primer lugar, analizamos las consecuencias de alterar PRC2.2 a través de la eliminación de Jarid2. Se ha reportado, que la depleción de esta proteína tiene efectos en la deposición de la marca H3K27me3, el reclutamiento de Ezh2, Suz12 y Eed y el enriquecimiento en Ser5-RNAPII (Kasinath et al., 2018; Landeira et al., 2010; Li et al., 2010; Pasini et al., 2010a). De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran que la eliminación de Jarid2 impacta en la deposición de H3K27me3 y la Ser5-RNAPII particularmente durante S y G2 en genes bivalentes, coincidiendo con una mayor unión de Jarid2, lo que sugiere que la actividad de Jarid2-PRC2 tiene lugar principalmente en estas fases. Esto se corresponde también con un aumento de la síntesis de RNA naciente durante S y G2 en mutantes nulos de Jarid2 comparado con la línea silvestre. Aunque otros autores señalan que no existen cambios claros en la expresión de los genes diana de PRC2 en mutantes de Jarid2 (Landeira et al., 2010; Li et al., 2010; Peng et al., 2009), nuestros resultados no están en desacuerdo con los obtenidos anteriormente en estos estudios, ya que debemos tener en cuenta que esos análisis se realizaron en líneas celulares asincrónicas y, por tanto, los resultados obtenidos se corresponden con la media de las tres fases de ciclo. El análisis de los efectos de la eliminación de Jarid2 en la expresión génica a través del ciclo celular resulta, por tanto, más informativo. En cualquier caso, es evidente que, aun cuando los cambios en S y G2 son estadísticamente significativos entre mutante y silvestre, los efectos en la expresión

de la eliminación Jarid2 no son muy severos, como se ha señalado previamente en mutantes de PRC2 (Dobrinić et al., 2021; Lavarone et al., 2019; Leeb et al., 2010; Petracovici and Bonasio, 2021). Esto está de acuerdo con publicaciones que sugieren que el papel represor recae principalmente en vPRC1 y H2AK119ub1 (Blackledge et al., 2020; Fursova et al., 2019; Sugishita et al., 2021; Tamburri et al., 2020), cuya unión a sus promotores diana no se ve afectada en el mutante de Jarid2 (Healy et al., 2019).

Por ello, posteriormente analizamos los efectos de la depleción de Ring1b para comprobar el impacto que tiene la eliminación PRC1 (vPRC1 y cPRC1) durante el ciclo celular. En este caso, la supresión de la actividad de PRC1 si exhibe consecuencias más robustas en la expresión de los genes diana de Polycomb, como se ha reportado anteriormente (Dobrinić et al., 2021; Fursova et al., 2019). En concreto, en nuestro modelo mostramos que la eliminación de Ring1b induce un incremento de la actividad transcripcional de forma específica en los promotores diana comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 durante G2, mostrando niveles de expresión incluso superiores a los observados durante fase G1 en el silvestre. Esto coincide con la acumulación de ambos subcomplejos de PRC1 en fase G2, lo que sugiere que el papel represivo de éstos tiene lugar mayoritariamente en esta fase. Se ha reportado previamente que la depleción de Ring1b desencadena una disminución drástica de PRC2 unido cromatina y una reducción masiva de la marca H2AK119ub1 tan solo dos horas tras la inducción de la mutación y que la marca H3K27me3 también se ve afectada, pero de forma más paulatina (Dobrinić et al., 2021). Por tanto, es de esperar que la depleción de Ring1b en G2 desencadene también el desplazamiento de PRC2.2, lo que supone la ausencia de complejos que repriman estos promotores en esta fase, explicando el fenotipo de expresión observado. No obstante, cabe destacar que, durante fase G1 los niveles de expresión se mantienen similares a la línea silvestre, lo que apunta hacia que PRC1 no es necesario para reprimir los genes diana de Polycomb en esta fase en concreto. Por ello, cabría esperar que, en G2, en ausencia de PRC1 se observaran niveles de transcripción basal similares a fase G1 y, sin embargo, el RNA naciente producido es superior, lo que nos hace preguntarnos: ¿qué regula la expresión de los genes durante G1? ¿existe una capa adicional de represión en G1 que funciona como un doble seguro para regular la salida de pluripotencia específicamente en esta fase?

Estos interrogantes invitan a realizar análisis dirigidos directamente a responder estas preguntas en mutantes específicos, por ejemplo, de PRC2.1 o Ezh1, con la finalidad de comprender en más profundidad cómo Polycomb maneja la salida de pluripotencia durante fase G1.

3.- La acumulación de cPRC1 en G2 correlaciona con un incremento de las interacciones tridimensionales de cromatina.

El complejo canónico de PRC1 es responsable de mediar interacciones de cromatina entre promotores y regiones del genoma reguladas por Polycomb (Eskeland et al., 2010; Kundu et al., 2017; Schoenfelder et al., 2015). Por ello, regiones densamente reguladas por cPRC1 exhiben interacciones entre promotores más robustas (Kundu et al., 2017). Nuestros resultados están de acuerdo con estos datos, ya que muestran que la intensidad de las interacciones entre los promotores a los que se une cPRC1 (Ring1b+Cbx7) se ve incrementada en fase G2, coincidiendo con un mayor enriquecimiento de este complejo en esta fase. Además, se ha reportado que el reclutamiento de Cbx7-cPRC1 a través de la marca H3K27me3 es necesario para que se establezcan estas interacciones, ya que la eliminación de Ezh2 (Cai et al., 2021) o Eed (Cruz-Molina et al., 2017; Denholtz et al., 2013; Eskeland et al., 2010) conlleva a la disolución de estos contactos, lo que sugiere que el incremento observado de PRC2.2 y H3K27me3 en G2 resulta necesario para instaurar esta conformación de la cromatina durante esta fase. Sin embargo, aún no se entiende con exactitud el papel de estas interacciones, ya que la perturbación de cPRC1 no muestra cambios significativos en la expresión génica de células asincrónicas (Fursova et al., 2019; Kundu et al., 2017). No obstante, como se ha comentado anteriormente, los resultados de expresión en poblaciones asincrónicas resultan de la media de las tres fases del ciclo, por lo que analizar los efectos de eliminar cPRC1 y, por consiguiente, las interacciones de cromatina, de forma específica de ciclo celular, podría resultar más informativo y nos permitiría entender con más precisión el papel de este complejo en el control de los genes bivalentes.

Por otra parte, algunos autores señalan que cPRC1 media interacciones tridimensionales entre promotores y *enhancers*, lo que podría resultar interesante en términos de inicio de diferenciación. En concreto, estas interacciones tienen lugar entre promotores unidos por PRC1 y *poised enhancers* (PEs), potenciadores que se

asocian específicamente con genes de desarrollo embrionario y exhiben las marcas H3K27me3 y H3K4me1 (Rada-Iglesias et al., 2010). Se sabe que la perturbación de PRC1 o de su reclutamiento origina la pérdida de estas interacciones (Schoenfelder et al., 2015) y provoca fallos en diferenciación (Cruz-Molina et al., 2017; Kundu et al., 2017). Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se han realizado en mutantes de Ring1a/b, lo que nos hace imposible distinguir si estos efectos son realmente consecuencia de la pérdida de interacciones y/o de la eliminación represión ejercida por vPRC1 y del reclutamiento de PRC2. En mutantes de PRC2 también se observa una disminución de estas interacciones promotor-PE, sin embargo, se ha confirmado que esto se debe a fallos en el reclutamiento de cPRC1 (Crispatzu et al., 2021; Eskeland et al., 2010). Estos mutantes muestran fallos en diferenciación y activación de genes neurales (Cruz-Molina et al., 2017), lo que nos da una idea de que las interacciones entre promotores y PEs mediadas por cPRC1 podrían resultar necesarias para la activación transcripcional tras el inicio de la diferenciación. Esto contrasta con nuestro modelo, donde las interacciones promotor-PE son más intensas durante fase G2 (datos no mostrados), mientras que es en fase G1 donde nos encontramos un estado de la cromatina más permisivo para iniciar diferenciación. Nuestros resultados muestran que existen interacciones también durante fase G1, aunque menos intensas. Sin embargo, podríamos argumentar que los contactos promotor-*enhancer* hallados durante G1 podrían resultar suficientes para activar el gen si fuera necesario, mientras que durante G2, a pesar de que el contacto sea más estrecho, la actividad represora de Polycomb podría impedir esta activación. Por tanto, para comprender el papel de cPRC1 y su papel en el establecimiento de interacciones tridimensionales de cromatina en la regulación de los genes bivalentes a lo largo del ciclo celular, resulta necesario analizar qué efectos tiene a nivel de expresión génica, interacciones tridimensionales y diferenciación la eliminación de cPRC1 en fracciones de ciclo celular.

En este sentido, en este trabajo mostramos qué efectos tiene la depleción de PRC1, a través de la eliminación de la subunidad catalítica Ring1b, en la estructura tridimensional de cromatina a lo largo del ciclo celular. Como era de esperar en base a otros estudios, la eliminación de Ring1a y Ring1b provoca la pérdida masiva de interacciones tridimensionales (Schoenfelder et al., 2015), hecho que se refleja del mismo modo cuando lo analizamos centrándonos en fase G1 y G2 del ciclo celular.

En ambas fases, se pierden drásticamente las interacciones tridimensionales halladas en la línea silvestre, lo que sugiere que PRC1 es necesario para mediar estas interacciones en ambas fases del ciclo. Sin embargo, los efectos en expresión génica parecen específicos de G2, por lo que es posible que las interacciones establecidas durante fase G1 no cumplan un papel represor, lo que va en línea con la posibilidad de que PRC1 sea necesario para mediar interacciones entre promotores y PEs en esta fase.

4.- Los complejos represores Polycomb colaboran para reprimir promotores de factores de transcripción asociados a desarrollo embrionario durante el ciclo celular.

Las dianas clásicas de los PRCs en ESCs son los promotores bivalentes de los genes asociados a desarrollo embrionario (Boyer et al., 2006; Ku et al., 2008), aunque también se ha reportado unión de Polycomb a genes activos (Brookes et al., 2012; Morey et al., 2013; Scelfo et al., 2019; Zepeda-Martinez et al., 2020). Esto está de acuerdo con nuestros datos, donde hemos observado que PRC2, vPRC1 y cPRC1 convergen en un gran número de dianas significativamente enriquecidas en factores de transcripción asociados con desarrollo embrionario y, distinguimos, además, otro grupo de dianas específicas de vPRC1 asociadas con procesos metabólicos que ya habían sido identificadas previamente (Morey et al., 2013; Zepeda-Martinez et al., 2020). No obstante, recientemente hemos llevado a cabo un análisis de ambos tipos de dianas en células asincrónicas silvestres y mutantes para *Ring1b* (datos no mostrados) y hemos observado que, mientras que la señal de *Ring1b* en dianas comunes de Polycomb desaparece por completo en el mutante, en las dianas específicas de vPRC1 no se pierde totalmente, lo que nos hace preguntarnos si el anticuerpo empleado está reaccionando además con otro tipo de proteína en esos genes en concreto. De todos modos, estas dianas coinciden con también con dianas de Rybp y además han sido identificadas en otros estudios con anticuerpos diferentes, por lo que es razonable asumir que son verdaderas dianas de vPRC1. Cabe destacar que esta clasificación en dianas compartidas por vPRC1/PRC2/cPRC1 y específicas de vPRC1 se basa en el establecimiento de un umbral de detección de picos por CHIP-seq por lo que no podemos asegurar que en todas las dianas específicas de vPRC1 no exista unión de los demás complejos Polycomb. De hecho, es posible detectar unión

de Suz12 y Eed del complejo PRC2 en algunas de estas dianas (Zepeda-Martinez et al., 2020). Esto pone en evidencia que la capacidad de reclutamiento de los diferentes complejos Polycomb depende considerablemente del contexto de la cromatina. En este sentido, podemos asumir que en el contexto de estas dianas específicas de vPRC1 que, tal como hemos observado y se ha sugerido previamente, exhiben unos niveles de expresión medios cercanos a los de un genes activo (Morey et al., 2013; Scelfo et al., 2019; Zepeda-Martinez et al., 2020), la capacidad de unión de Ring1b y Rybp no se ve tan mermada en comparación con la capacidad de reclutamiento de PRC2, lo que podría explicarse basándonos en datos que sugieren que el RNA nascente compite con PRC2, lo desplaza de la cromatina e inhibe su actividad metiltransferasa (Beltran et al., 2016; Kaneko et al., 2014b; Wang et al., 2017b; Zhang et al., 2019). Esto explicaría también por qué observamos menos unión de Cbx7-cPRC1 en estas dianas, teniendo en cuenta que este complejo requiere de la presencia de H3K27me3 para su reclutamiento (Min et al., 2003).

Por otro lado, en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1, observamos en general un mayor enriquecimiento de todas las proteínas analizadas, en relación a las dianas específicas de vPRC1, lo que coincide con las diferencias observadas en los niveles de expresión de cada grupo de dianas. Esto demuestra que el contexto de la cromatina en estas dianas permite el reclutamiento y comunicación entre complejos, promoviendo la acumulación de marcas de histonas y la formación de dominios Polycomb. Por otro lado, en las dianas específicas de vPRC1, es el primer complejo (vPRC1) de la cascada de reclutamiento de complejos Polycomb el que mejor se recluta, sin embargo, no es capaz de reclutar de forma eficiente al resto de complejos. Esto debe asociarse claramente con los niveles de H2AK119ub1 en estas dianas, que son visiblemente menores a los hallados en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1, lo que probablemente resulte insuficiente para atraer la unión de PRC2 (Cooper et al., 2016a). Estos reducidos niveles de H2AK119ub1 en estas dianas sugiere que 1) la capacidad catalítica de vPRC1 en este contexto es más reducida o 2) que existe una eliminación activa de la marca en estos promotores.

Cabe destacar además que en nuestros análisis hemos observado que el enriquecimiento de Ring1b es similar en ambos tipos de dianas. Esta última observación no coincide, sin embargo, con datos publicados en los que se señala que el reclutamiento de Ring1b en las dianas específicas de vPRC1 es significativamente

menor (Scelfo et al., 2019; Zepeda-Martinez et al., 2020). Además, los datos de ChIP-seq de Ring1b obtenidos recientemente con otro anticuerpo, así como los obtenidos para este mismo anticuerpo en células asincrónicas silvestres para Ring1b (datos no mostrados), muestran resultados similares a estas publicaciones, por lo que es posible que exista un problema técnico en este análisis que debamos revisar. En cualquier caso, los patrones de reclutamiento constantes de Ring1b a lo largo del ciclo en promotores bivalentes sí coinciden con los resultados obtenidos con un anticuerpo de Ring1b diferente, por lo que la conclusión general en relación a la regulación a través del ciclo de estas dianas permanece intacta.

En definitiva, entre ambos grupos de dianas se observan claras diferencias de reclutamiento de los complejos Polycomb lo que parece repercutir de forma evidente en la regulación que ejercen estas proteínas a lo largo del ciclo. De este modo, en las dianas comunes de vPRC1/PRC2/cPRC1 se observa una regulación de la unión de las proteínas Polycomb a través del ciclo celular más acusada, coincidiendo a su vez con diferencias en la síntesis de RNA que se ven alteradas tras la eliminación de PRC2.2 y PRC1. Por el contrario, en las dianas identificadas como específicas de vPRC1, la regulación por ciclo no resulta tan evidente y por ello no se observan diferencias significativas en la expresión a lo largo del ciclo. Además, la expresión en estas dianas no se ve afectada por la eliminación de PRC1 (Zepeda-Martinez et al., 2020), lo que nos hace preguntarnos si este complejo ejerce un papel específico en estos promotores o si, simplemente, se une porque el contexto de la cromatina se lo permite.

5.- La actividad dinámica de Polycomb establece un ciclo epigenético que favorece un estado de la cromatina compatible con inicio de diferenciación en G1 en ESCs.

En conjunto, en este trabajo demostramos que la unión de las subunidades de los complejos Polycomb está controlada por mecanismos dependientes del ciclo celular en mESCs. Nuestros experimentos de ChIP-seq en mESCs muestran que el reclutamiento de todas las subunidades con función represora analizadas tiende a incrementar conforme la célula avanza durante interfase a excepción de Ring1b, cuya unión es similar entre fases de ciclo. Esto sugiere que componentes específicos del

sistema Polycomb, como Ring1b, podrían permanecer unidos a promotores de genes diana durante mitosis mientras que otros se reubican en otras regiones de la cromatina. Esto abre paso a proponer que el marcaje mitótico por parte de las proteínas Polycomb podría ser una parte esencial de su mecanismo molecular que facilita la herencia de su actividad reguladora en sus genes diana tras mitosis perpetuando así la identidad celular. Cuando las células entran en mitosis, sufren severos cambios en la estructura del DNA que desafían el mantenimiento de los procesos regulatorios y la transcripción génica que las identifica (Coux et al., 2020). Esto nos hace preguntarnos cómo las células hijas recuperan los perfiles de expresión procedentes de sus madres de forma que se preserve la identidad celular. ¿Qué mantiene los genes del desarrollo reprimidos a la salida de mitosis? ¿Qué sucede con las proteínas Polycomb unidas en G2 durante la división celular? En definitiva, ¿es Polycomb responsable de transmitir la memoria y la identidad celular a la progenie? Para responder a estas preguntas, resulta imprescindible analizar la dinámica de los PRCs durante mitosis, con el fin de comprender si alguno de ellos ejerce además un papel en la transmisión de la identidad celular tras la división celular.

Asimismo, esta regulación de Polycomb dependiente de ciclo celular puede ser funcionalmente relevante en el contexto de diferenciación de células pluripotentes ya que nuestras observaciones encajan con el papel previamente establecido de Polycomb como regulador durante el proceso de diferenciación en ESCs (Landeira et al., 2010; Leeb and Wutz, 2007; Pereira et al., 2010; Petracovici and Bonasio, 2021; Shen et al., 2008). Sin embargo, para establecer plenamente la relevancia de esta regulación en la función de Polycomb mediada por el ciclo celular, es preciso realizar análisis que aborden cómo la falta de proteínas Polycomb en determinadas fases del ciclo celular afecta a la diferenciación. Actualmente, en nuestro laboratorio estamos abordando esta cuestión induciendo diferenciación en mESCs silvestres y mutantes para proteínas Polycomb de forma dependiente de ciclo con la finalidad de comprender en más profundidad el papel de los PRCs en la diferenciación celular y salida de pluripotencia durante el ciclo celular.

La actividad dinámica de los PRCs a través del ciclo celular puede conceptualizarse en lo que hemos denominado “ciclo epigenético”, el cual favorece un estado de la cromatina compatible con diferenciación celular durante fase G1 y reduce las posibilidades de diferenciación durante S y G2. Esta propuesta está de

acuerdo con estudios previos que sugieren que las ESCs son más proclives a iniciar diferenciación durante fase G1 (Calder et al., 2013; Coronado et al., 2013; Gonzales et al., 2015; Pauklin and Vallier, 2013; Sela et al., 2012). Asimismo, también se ha señalado que, durante el inicio de la diferenciación, los factores de transcripción pioneros específicos de linaje son reclutados a la cromatina durante replicación en fase S y que la acumulación de H3K27me3 en el DNA naciente bloquea el reclutamiento de estos factores e impide la diferenciación (Petruk et al., 2017), lo que sugiere que 1) estos factores deben expresarse principalmente en G1 tras la recepción de la señal de diferenciación coincidiendo con un estado permisivo de la cromatina y 2) que los complejos Polycomb son esenciales para bloquear la unión de estos factores pioneros a la cromatina durante fase S y G2, impidiendo así el avance de la diferenciación. Esto va en línea con resultados que indican que las células son más propensas a mantener el estado de pluripotencia en S y G2 (Gonzales et al., 2015). Por consiguiente, proponemos que la configuración de cromatina presente en G1 crea una ventana de oportunidad donde los factores de transcripción pioneros pueden ser más proclives a expresarse ante señales de diferenciación, y que Polycomb actúa como un doble seguro durante S y G2 que garantiza que estos factores se expresen en la ventana de tiempo adecuada y que, a su vez, salvaguarda el estado pluripotente evitando que los factores inducidos en G1 ante señales de activación inapropiadas accedan a la cromatina. En términos moleculares, el inicio de la diferenciación podría entonces representar la inducción de los factores de transcripción pioneros en respuesta a señalización en G1, y la pérdida de pluripotencia podría reflejar la capacidad de estos factores para unirse a sus genes de linaje diana reprimidos por Polycomb en S y G2, cuya activación es esencial para la salida de pluripotencia.

Dado que los principios generales que subyacen a la función de Polycomb están ampliamente conservados desde las moscas hasta los seres humanos (Schuettengruber et al., 2017), nuestros datos serán probablemente relevantes para otros sistemas modelo en los que la regulación de la expresión génica por Polycomb debe coordinarse con la replicación del DNA y la división celular, incluyendo las células madre adultas y las células tumorales (Margueron and Reinberg, 2011). Además, los PRCs también pueden regular la actividad génica en células somáticas detenidas en fase G1 (Margueron and Reinberg, 2011) y, por tanto, en el futuro será interesante ver hasta qué punto las diferencias en la regulación por proteínas

Polycomb en diferentes sistemas modelo son consecuencia de sus diferentes configuraciones del ciclo celular. Por ello, analizar si existe una conexión directa entre maquinaria de ciclo celular y la actividad de los complejos Polycomb resultará esencial en un futuro para trasladar los resultados obtenidos en mESCs a otros modelos celulares.

Conclusiones

Conclusiones

1. El reclutamiento de los complejos PRC2 y PRC1 a sus promotores diana está regulado de manera diferencial durante el ciclo celular en células madre embrionarias de ratón.
2. El complejo EPOP-PRC2.1 se recluta a sus promotores diana preferentemente en fase G1 mientras que la unión de Jarid2-PRC2.2 esta principalmente favorecida en S y G2.
3. La subunidad catalítica de PRC1, Ring1b, permanece unida de manera constante a sus promotores diana durante interfase.
4. El complejo Rybp-vPRC1 se recluta predominantemente a sus dianas genómicas durante fase G2, lo cual se asocia con un incremento en la deposición de H2AK119ub1.
5. El complejo Cbx7-cPRC1 se recluta a sus promotores diana preferentemente durante S y G2, lo que se asocia con el incremento de interacciones tridimensionales entre promotores diana de PRC1.
6. La acumulación de vPRC1, PRC2.2 y cPRC1 durante fase G2 se correlaciona con una reducción de la actividad transcripcional en los promotores de desarrollo y con una mayor retención de la Ser5-RNAPII en el sitio de inicio de la transcripción.
7. El reclutamiento diferencial de las proteínas Polycomb a sus genes diana a lo largo del ciclo celular se debe a cambios en la distribución de estas proteínas en la cromatina y no a diferencias en la cantidad global de proteína disponible en la célula.
8. La eliminación de las proteínas Jarid2 y Ring1b altera la represión transcripcional dependiente de ciclo celular, sugiriendo que tanto PRC2 como PRC1 cooperan en el mantenimiento de este tipo de regulación.

9. La eliminación de Ring1b altera la conformación tridimensional de la cromatina dependiente de ciclo celular, indicando que PRC1 contribuye al mantenimiento de este tipo de regulación.
10. La modulación de la regulación Polycomb durante el ciclo celular ocurre en general en todos sus genes diana, pero es especialmente evidente en los promotores de genes reguladores del desarrollo, en los cuales los complejos vPRC1, PRC2.2 y cPRC1 se acumulan de manera coordinada durante S y G2.
11. Durante la fase G1 hay una menor acumulación de PRCs y modificaciones de histonas H3K27me3 y H2AK119ub1 en promotores diana, dando lugar a un estado de la cromatina probablemente más favorable para ser inducida transcripcionalmente durante el inicio de la diferenciación celular.

Conclusions

Conclusions

1. Recruitment of PRC2 and PRC1 complexes to target promoters is regulated across cell cycle in mouse embryonic stem cells.
2. The EPOP-PRC2.1 complex is preferentially recruited to target promoters in G1 phase while Jarid2-PRC2.2 binding is favoured in S and G2.
3. The catalytic subunit of PRC1, Ring1b, remains bound to its target promoters during interphase.
4. The Rybp-vPRC1 complex is predominantly recruited to its genomic targets during G2 phase, coupled with an increased deposition of H2AK119ub1.
5. The Cbx7-cPRC1 complex is recruited to its target promoters preferentially during S and G2, associated with increased 3D-chromatin interactions between PRC1-regulated promoters.
6. Accumulation of vPRC1, PRC2.2 and cPRC1 during G2 phase correlates with reduced transcriptional activity at developmental promoters and increased retention of Ser5-RNAPII at the transcriptional start site.
7. The differential recruitment of Polycomb proteins to target genes across the cell cycle is due to changes in the distribution of these proteins on chromatin, but not to differences in the total amount of Polycomb proteins available in the cell in each cell cycle phase.
8. Depletion of Jarid2 and Ring1b alters the cell cycle-dependent regulation of gene repression, indicating that both PRC2 and PRC1 cooperate to carry out this type of regulation.
9. Deletion of Ring1b disrupts the cell cycle-dependent three-dimensional chromatin conformation, indicating that PRC1 contributes to the maintenance of this type of regulation.

10. Modulation of Polycomb regulation during cell cycle transition occurs in all its target genes but it is especially evident at the promoters of developmental master regulator genes, in which the vPRC1, PRC2.2 and cPRC1 complexes accumulate in a coordinated manner during S and G2.

11. During G1 phase there is a reduced accumulation of PRCs, H3K27me3 and H2AK119ub1 at target promoters, resulting in a chromatin state that is probably more compatible with transcriptional induction during cell differentiation.

Materiales y métodos

1.- Cultivos celulares

1.1- Condiciones de cultivo

Las líneas de mESCs empleadas (Tabla M1-Anexo III) se cultivaron en condiciones de 37°C y 5% CO₂ en placas gelatinizadas (gelatina al 0.1%) en medio Dmem KO (Gibco) suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), *leukaemia-inhibiting factor* (LIF), penicilina/estreptomicina (Gibco), L-glutamina (Gibco), 2-mercaptoetanol (Gibco) e Higromicina B (InvivoGen). Para inducir la depleción condicional de la proteína Ring1b en la línea Ring1a^{-/-}; Ring1b^{fl/fl}; Rosa26::CreERT2 FUCCI, las células se trataron con 800 nM de 4-hidroxitamoxifeno (Sigma) durante 48 horas y se recogieron 24 horas después para los subsecuentes análisis.

1.2.-Generación de líneas FUCCI y separación por citometría

Las líneas de mESCs FUCCI se generaron mediante transfección con lipofectamina siguiendo las instrucciones del fabricante (Lipofectamina 2000, Thermo Fisher). Para la transfección, se emplearon 3 µg de plásmido ES-FUCCI (Repositorio Addgene #62451) previamente digerido con la enzima BglII. Posteriormente, se seleccionaron las células que incorporaron el plásmido con Higromicina B (InvivoGen), empleando una concentración de 20-40 µg/ml en función de la línea celular. Las colonias resistentes se aislaron en placas de 96 pocillos y se seleccionaron mediante citometría de flujo aquellas que expresaban simultáneamente los marcadores mCherry:hCdt y Citrine:Geminin. Los clones positivos para ambos marcadores se comprobaron mediante separación por ciclo y tinción con yoduro de propidio.

Para separar las células FUCCI en las diferentes fracciones de ciclo celular (G1, S y G2), se resuspendieron en buffer de *sorting* (1% PBS, 2% FBS, EDTA 2 mM y LIF) a 4°C y se filtraron con un filtro de 100 µm en tubos de citómetro a una concentración aproximada de 15-20 millones de células/ml. El proceso de separación se llevó a cabo en un citómetro *FACS Aria Fusion* disponible en la Unidad de Citometría del centro Genyo (Granada). Este citómetro está equipado con los láseres 488 y 561 necesarios para discriminar entre las células que expresan la proteína

fluorescente Citrina (516 nm/529 nm) y las positivas para mCherry (587 nm/610 nm). Para cada uno de los análisis posteriores a la separación por ciclo, se recogió una fracción de cada fase para comprobar los perfiles de ciclo con yoduro de propidio.

1.3.- Análisis del perfil de ciclo celular con yoduro de propidio

Con la finalidad de analizar la correcta separación de las células FUCCI por citometría, se analizó el contenido de DNA de cada una de las fracciones mediante tinción con yoduro de propidio. Para ello, se recogieron $1-5 \times 10^5$ células de cada fracción y se fijaron con 1 ml de etanol al 70% a -20°C añadido gota a gota en agitación. Tras dos lavados con PBS (450g 5 min 4°C), se resuspendió el pellet en 200 μl de buffer de tinción de yoduro de propidio (1% PBS, 0.05% NP-40, 3 mM EDTA pH 8.0, 1 mg/ml RNase A y 1 mg/ml yoduro de propidio) y se incubó en tubos de citómetro durante 10 min a temperatura ambiente y 20 minutos en hielo protegidas de la luz. El análisis se realizó en un citómetro FACS Verse comparando las fracciones obtenidas con un perfil de un control asincrónico.

2.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP para Ser5-RNAPII, Ezh2, Jarid2, EPOP, Ring1b, Cbx7, H2AUb y Rybp se realizaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Brookes et al., 2012), con algunas modificaciones para adaptarlo a un número bajo de células: se recogieron 1-2 millones de células separadas por ciclo celular, se resuspendieron en medio completo a 37°C (200 μl por millón de células) y se incubaron con formaldehído al 1% en una plataforma giratoria durante 12 min a temperatura ambiente. Tras detener la reacción con una concentración final de glicina de 125 nM y realizar 2 lavados con 1% PBS, las células fijadas se incubaron durante 10 min en hielo en *Sweeling buffer* (25 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas (EDTA-free tablets de Roche, 1 mM PMSF) y, en el caso de ChIPs fosfo-específicos, inhibidores de fosfatasa (5 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4). Para aislar los núcleos se empleó un homogeneizador Dounce (50 repeticiones con varilla estrecha). La sonicación se llevó a cabo en un sonicador

Bioruptor Plus (Diagenode) durante 1 h 4°C (30'on/30'off) a máxima potencia tras resuspender los núcleos aislados en buffer de sonicación (50 mM HEPES pH 7.9, 140 nM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) previamente suplementado con inhibidores de proteasas y, de ser necesario, de fosfatasa. Tanto el aislamiento de núcleos como la sonicación se realizaron a una concentración de 2×10^6 células/ml. En el caso del CHIP de EloB, esta primera parte se realizó tal y como se ha descrito, pero adicionando un paso de doble fijación de cromatina tal y como se describe en Beringer et al., 2016: las células se resuspendieron en PBS a 4°C y se incubaron con CHIP Crosslink Gold (Diagenode, 0.8 µl en 200 µl de PBS por 1 millón de células) en una plataforma giratoria durante 30 min a temperatura ambiente. Después de un paso de lavado, la cromatina se fijó con formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para inmunoprecipitar los fragmentos de cromatina unidos a cada una de las proteínas de interés, se incubó la cromatina sonicada junto con el anticuerpo específico ([Tabla M2-Anexo III](#)) en una rueda giratoria a 4°C toda la noche. Las concentraciones empleadas para cada anticuerpo aparecen reflejadas en la [Tabla M2-Anexo III](#). Como control negativo para cada inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo anti-IgG a la misma concentración que el anticuerpo principal. Al día siguiente, se añadieron a cada tubo 50 µl de partículas magnéticas de proteína G (Dynabeads, Invitrogen) previamente lavadas con buffer de sonicación y se incubó durante 5 horas a 4°C en una rueda giratoria. Tras ello, se llevaron a cabo los siguientes lavados durante 5 minutos a 4°C con 1 ml de los siguientes buffers: 1 x buffer de sonicación, 1 x buffer de lavado A (50 mM HEPES pH 7.9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS), 1 x buffer de lavado B (20 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate), 2 x TE Buffer pH 8.0. Una vez finalizados los lavados, la cromatina inmunoprecipitada se eluyó en buffer de elución (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% SDS en fresco) incubando 2 x 250 µl 5 min a 65°C y 15 min en rueda giratoria a temperatura ambiente. Finalmente, para aislar el DNA de interés, se incubó la cromatina durante toda la noche a 65°C con 160 mM NaCl y 20 µg/ml de RNasa A, seguido de 2h de incubación a 45°C con proteinasa K (220 ng/ml), extracción fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Las muestras input tomadas de forma previa

a la inmunoprecipitación corresponden al 1% de la reacción de ChIP original y fueron tratadas de forma idéntica en este último paso.

2.1.- ChIP-qPCR

El análisis por ChIP-qPCR como control de calidad de todas las muestras de DNA inmunoprecipitado se realizó utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). El enriquecimiento se calculó respecto al 1% de input para todos los ChIPs, excepto para Ser5-RNAPII, que se normalizó cargando la misma cantidad de DNA, como se ha descrito anteriormente (Brookes et al., 2012). Los detalles de los *primers* utilizados están disponibles en la [Tabla M3-Anexo III](#).

2.2.- ChIP-seq

Las librerías de ChIP se generaron a partir de 1-5 ng de DNA inmunoprecipitado usando el kit NEBNext Ultra DNA Library Prep para Illumina (#7370) según las instrucciones del fabricante en el Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona y se secuenciaron en un secuenciador HiSeq 2500 de Illumina. La librería para la Ser5-RNAPII se realizó con el kit NextFlex ChIP-Seq (Bio Scientific #NOVA-5143-01), partiendo de 4 ng de DNA inmunoprecipitado y se secuenció en el Centro de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO, Granada) con tecnología Illumina (NextSeq 500) según las instrucciones del fabricante. Tras la secuenciación se obtuvieron 20-30 millones de lecturas (lecturas individuales de 50 pares de bases (pb)) para cada muestra.

3.- Análisis de expresión génica

3.1.- Extracción de RNA Naciente (4sU-seq)

Los experimentos de 4sU-seq se llevaron a cabo como se describe en (Rutkowski and Dölken, 2017) con modificaciones menores: Las células se trataron con 500 mM de 4-tiouridina (4sU, Carbosynth) durante 1 hora a 37°C antes de la tripsinización y separación por ciclo mediante citometría de flujo. Un millón de células de cada fracción se resuspendieron en 500 ul de TRIzol Reagent (Invitrogen) y se aisló el RNA total según las instrucciones del fabricante. Tras ello, se llevó a

cabo la reacción de biotinilización (Biotin-HPDP, Cayman Chemicals) del RNA (90 minutos a temperatura ambiente con agitación protegida de la luz), seguido de la separación del RNA marcado con 4sU haciendo uso del kit μ MACS Streptavidin (Miltenyi). La concentración se cuantificó mediante NanoDrop (Thermo Fisher), la integridad del RNA (RIN) se comprobó con Bioanalyzer (Agilent) y se llevó a cabo análisis por RT-qPCR como control de calidad. Los *primers* para RT-qPCR se diseñaron para amplificar específicamente regiones contiguas exón-intrón (RNA naciente) y secuencias dentro de exones (RNA total) (Tabla M3-Anexo III).

Para la secuenciación del RNA naciente, se generaron librerías de RNA específicas de cadena con el kit NextFlex Rapid Directional RNA-seq (Bio Scientific, NOVA-5138-07) según las instrucciones del fabricante. Estas muestras se secuenciaron con tecnología Illumina (NextSeq500) en el centro Genyo (50 millones de lecturas de 75 paired-end). Las librerías para el análisis de RNA naciente en el silvestre y mutante para Ring1b se generaron con el kit TruSeq stranded mRNA Library prep según las instrucciones del fabricante sin selección inicial con PolyA en el Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona y se secuenciaron en un secuenciador HiSeq 2500 de Illumina (30 millones de lecturas de 75 paired-end).

3.2.- Retrotranscripción de RNA

Con la finalidad de analizar la expresión por RT-qPCR, la retrotranscripción del RNA hasta cDNA se realizó con el kit de transcripción inversa RevertAid RT Reverse Transcription (Thermo Fisher) partiendo de 200-1000 ng de RNA siguiendo las instrucciones del fabricante, tras tratar la muestra con DNase I (Thermo Fisher) durante 15 minutos. La muestra final se eluyó habitualmente en un volumen final de 200 μ l.

4.- Análisis de estructura tridimensional de cromatina

4.1.- 4C-seq

Los experimentos de 4C se han realizado durante una estancia en el CMMC de Colonia (Alemania) en colaboración con el laboratorio de Álvaro Rada-Iglesias.

En total, 2×10^6 células de cada fracción de ciclo (G1 y G2), se fijaron con formaldehído al 1% durante 20 min. Tras ello, la reacción se detuvo incubando con glicina 0,125 M durante 10 minutos. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 5 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100 y 1×inhibidores de proteasa) durante 10 min en hielo. Tras centrifugar (650g 5 min 4°C), los núcleos se resuspendieron en 0.5 ml de tampón de restricción con 0.3% de SDS y se incubaron a 37°C/900 r.p.m. durante 1 h. Posteriormente, se añadió Triton X-100 a una concentración del 2%, seguido de 1 h de incubación a 37 °C/900 rpm. A continuación, la cromatina se digirió durante toda la noche a 37 °C/900 rpm con 700 U de NlaIII (R0125L, NEB) y se añadieron 100 U más al día siguiente durante 1 h a 37°C. La NlaIII se inactivó añadiendo SDS a una concentración del 1,6% y se incubó durante 25 minutos a 65 °C/900 rpm. La cromatina digerida se mezcló con 6.125 ml de tampón de ligación 1.15× (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM ditiotreitól). Se añadió Triton X-100 a una concentración del 1% y la solución se incubó durante 1 hora a 37 °C mientras se agitaba suavemente (300 rpm). La cromatina digerida se ligó con 100 U de DNA ligasa T4 (15224-041, Life Technologies) durante 8 h a 16 °C, seguido de un tratamiento con RNasa A (Peqlab, 12-RA-03) durante 45 min a 37 °C. Posteriormente, se eliminó la proteína unida a la cromatina añadiendo 300 ug de proteinasa K (Peqlab, 04-1075) e incubando a 65 °C durante toda noche. El DNA se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, se resuspendió en 100 ul de agua y se digirió con 50 U de DpnII (R0543M, NEB) a 37 °C durante la noche. La enzima se inactivó posteriormente incubando a 65°C durante 10 min. Tras ello, el DNA se volvió a purificar mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol y se resuspendió en 100 µl de H₂O. A continuación, se añadieron 200 U de ligasa de DNA T4 en un volumen final de 14 ml de tampón de ligación 1×, seguido de una incubación toda la noche a 16 °C. Seguidamente, las muestras de DNA se sometieron a extracción con fenol/cloroformo y a precipitación con etanol, se resuspendieron en 100 µl de agua y se purificaron en columna (28104, QIAGEN). Los productos de DNA resultantes (50 ng por reacción) se amplificaron mediante PCR inversa utilizando *primers* (Tabla M4-Anexo III) que amplifican posiciones previamente seleccionadas con el sistema PCR Expand Long Template (11681842001, Roche) (94 °C 2 min, 30× (94 °C 10 s,

59 °C 1 min, 68 °C 3 min), 68 °C 5 min). Las muestras de 4C-seq se secuenciaron en un secuenciador Illumina HiSeq 2500, generando lecturas individuales de 74 bases de longitud en el Center for Biomics Erasmus University Medical Center en Rotterdam (Holanda).

4.2.- Capture-C

Los experimentos de Capture-C se han llevado a cabo en colaboración con el laboratorio de Robert J. Klose en la Universidad de Oxford (UK). Las librerías de Capture-C se prepararon como se ha descrito anteriormente con ligeras modificaciones (Dimitrova et al., 2021). La fijación de la cromatina tras la separación por citometría en las fracciones G1 y G2 se llevó a cabo en el centro Genyo. En primer lugar, se resuspendieron 2×10^6 células de cada fracción en 1.86 ml de medio completo. Tras ello, se fijaron con formaldeído (1.89%) y se incubaron durante 10 minutos en una rueda giratoria a temperatura ambiente. La reacción de fijación se detuvo añadiendo glicina fría (concentración final 150 mM). Tras ello, se centrifugó (5 min 1000 rpm 4°C) y se lavó 1x con PBS frío. Tras volver a centrifugar, se resuspendieron las células en buffer de lisis frío (10 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl, 0.2% NP-40, inhibidor de proteasa 1x) y se incubó durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugó (5 min, 1800 rpm, 4°C), se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer de lisis y se congelaron las muestras (-80°C).

Los siguientes pasos del protocolo se llevaron a cabo por Emilia Dimitrova del laboratorio de Robert J. Klose en la Universidad de Oxford (UK). Los lisados se descongelaron en hielo, se pelletearon y se resuspendieron en tampón 1x DpnII (New England Biology). Los lisados se trataron con una concentración final del 0,28% de SDS (Thermo Fischer Scientific) en un volumen de reacción de 200µl durante 1 hora a 37°C en un termoagitador agitando a 500rpm (30 segundos ON/ 30 segundos OFF). A continuación, la reacción se detuvo añadiendo Triton X-100 con una concentración final del 1,67% durante 1 hora a 37 °C en un termoagitador a 500 rpm (30 segundos ON/ 30 segundos OFF), tras lo cual, se digirieron durante 24 horas con 3x10µl de DpnII (de producción propia) a 37 °C en un termoagitador a 500 rpm (30 segundos ON/ 30 segundos OFF). La cromatina digerida se ligó con 8 µl de T4 Ligasa (240U, Thermo Firsher Scientific) durante 20 horas a 16°C. Los núcleos que contenían la cromatina ligada se centrifugaron para eliminar cualquier cromatina no

nuclear, se separó el DNA de la cromatina y el DNA ligado se purificó con fenol-cloroformo. La muestra se volvió a mezclar en 100µl de agua y se sonicó durante 135 segundos utilizando Covaris ME220 con tubos microTUBE-50 AFA para conseguir un tamaño de fragmento de aproximadamente 200bp. Se ligaron dos reacciones de 2-4 µg de DNA cada una y se indexaron utilizando el NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) y NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs). Las librerías se amplificaron con 7 ciclos de PCR utilizando el kit Herculase II Fusion Polymerase (Agilent). La hibridación de las librerías se realizó como se ha descrito anteriormente (Dimitrova et al., 2021). Este análisis se llevó a cabo con 4 réplicas biológicas de cada fracción de ciclo.

5.- Análisis bioinformático

Los análisis bioinformáticos de los datos crudos de ChIP-seq y 4sU-seq han sido llevados a cabo por el Dr. Jordi Martorell Marugán de la Unidad de Bioinformática del centro Genyo (Granada). El análisis bioinformático de 4C-seq lo ha realizado el Dr. Tomás Pachano del laboratorio de Álvaro Rada Iglesias (IBBTEC, Santander). Por último, los datos de Capture-C han sido analizados por la Dra. Angelika Feldmann del laboratorio de Robert J. Klose (Universidad de Oxford, UK).

5.1.- Clasificación de promotores

La lista de genes bivalentes de alta fidelidad (HC-Bivalent - 1678 genes) se obtuvo extrayendo los genes bivalentes descritos en tres estudios diferentes (Brookes et al., 2012; Ku et al., 2008; Mikkelsen et al., 2007). Los genes activos (1557 genes) se determinaron utilizando datos publicados (Brookes et al., 2012): genes positivos para H3K4me3, que contienen RNAPII fosforilada (Ser5, Ser2 y Ser7) e hipofosforilada (anticuerpo 8WG16), con expresión de RNA superior a 20 FPKM y negativos para la unión de PRC2 (Ezh2, Suz12, y H3K27me3). Los promotores hipermetilados en mESCs (con más del 80% de metilación de CpG) se identificaron utilizando datos de bisulfito (Kobayashi et al., 2012) y se cruzaron con los datos publicados (Brookes et al., 2012) para identificar los promotores hipermetilados no expresados (menos de 1 FPKM) y no unidos por PRC2 (Ezh2, Suz12 y H3K27me3) (656 genes).

5.2.- ChIP

Las lecturas se han alineado y cuantificado utilizando STAR 2.5.2 (Dobin and Gingeras, 2015) con el genoma GENCODE NCBI m37 (mm9). Se ha empleado SAMtools 1.3.1 (Li et al., 2009) para descartar las alineaciones con una puntuación de calidad <200 para eliminar las lecturas *multimapping*. Por último, se ha utilizado BamCompare de la suite deepTools (Richter et al., 2016) para crear archivos bigwig con la señal normalizada en lecturas por millón (RPM) contra la muestra input. La detección de picos se ha realizado con MACS2. El análisis de los datos públicos de ChIP-seq (Tabla RI-3-Anexo I) se ha llevado a cabo de la misma manera. El paquete CoverageView (paquete de visualización de cobertura para R: Versión 1.20.0.) se ha usado para calcular la cobertura alrededor del TSS.

Las lecturas medias normalizadas (en RPM) teniendo en cuenta una ventana de -0.5+1.5kb respecto al TSS para cada uno de los promotores analizados se han representado en *boxplots* y se han analizado mediante *clustering* utilizando el software Cluster 3.0 seguido del programa Java TreeViewer, para lo que se representa el log₂ de los valores de unión relativos a la media. Los gráficos de unión media de ChIP-seq se han generado teniendo en cuenta las lecturas normalizadas cada 10 pb. Los análisis de *heatmaps* representan la densidad de lecturas en RPM transformadas al log₂ dentro de los percentiles 5 y 95. Para comparar entre muestras de ciclo, los genes se ordenaron en el *heatmap* según fase G2 (Ezh2, Jarid2, Ser5-RNAPII, Ring1b, Rybp, Cbx7, H2AK119ub1) o G1 (EPOP y EloB). Los análisis de ontología se han realizado con la *Gene Ontology knowledge database* (geneontology.org).

5.3.- 4sU-seq

Tras el control de calidad, se ha empleado el software SortMeRNA 2.1 (Kopylova et al., 2012) para filtrar las lecturas de RNA ribosómico. Las lecturas filtradas se alinearon y cuantificaron con STAR 2.5.2 (Dobin and Gingeras, 2015) utilizando GENCODE NCBI m37 (mm9) como genoma de referencia. Para eliminar los alineamientos con una puntuación de calidad <200 y descartar lecturas *multimapping* se ha empleado SAMtools 1.3.1 (Li et al., 2009). Por último, se ha utilizado BamCompare de la suite deepTools (Richter et al., 2016) para crear archivos bigwig con la señal normalizada en RPMs y con valores positivos para la

cadena directa y negativos para la cadena inversa. Para normalizar los valores de expresión génica, se han calculado los valores en TMM (trimmed mean of M values) (Robinson and Oshlack, 2010) con el paquete NOISeq (Tarazona et al., 2015).

5.4.- 4C

Las lecturas de 4C obtenidas tras la secuenciación se asignaron a las muestras en función de sus 10 primeras bases, se eliminaron las secuencias del *primer* de las lecturas y las secuencias restantes se recortaron a 36 bases por lectura. Estas 36 bases se alinearon con el genoma de referencia de ratón (mm10) utilizando el alineador HISAT252. A partir de estos alineamientos, se cuantificaron las lecturas por fragmento de restricción NlaIII utilizando bedtools91. A continuación, se eliminaron las lecturas que correspondían al *viewpoint*, así como los fragmentos de restricción anteriores y posteriores. Por último, los archivos bedgraph resultantes se normalizaron como lecturas por millón (RPM), considerando el número total de lecturas mapeables que quedaban para cada muestra. Estos archivos bedgraph normalizados se utilizaron para la visualización posterior de los datos de 4C-seq en el visualizador de genoma de la plataforma UCSC.

5.5.- Capture-C

Las lecturas se alinearon con el genoma de referencia mm10 y se filtraron en busca de artefactos Hi-C utilizando HiCUP (Wingett et al., 2015) y Bowtie 2 (Langmead y Salzberg, 2012) (Langmead y Salzberg, 2012), con el filtro de fragmentos establecido en 100-800bp. Los recuentos de lecturas que se alinean con los promotores de genes capturados y las puntuaciones de interacción (=interacciones significativas) fueron recopilados con CHiCAGO (Cairns et al., 2016).

Para la visualización de los datos de Capture-C, los recuentos de lecturas ponderados de los archivos de datos de CHiCAGO se normalizaron con respecto al recuento total de lecturas que se alineaban con los promotores de genes capturados en la muestra y, además, con respecto al número de promotores en el respectivo experimento de captura y se multiplicaron por un número constante para simplificar

la visualización en el navegador de genomas mediante la siguiente fórmula: $\text{normCounts} = 1 / \text{cov} * \text{nprom} * 100000$. Se generaron archivos Bigwig a partir de estos recuentos de lecturas normalizados.

Para el análisis de los gráficos de barras y de dispersión, primero se determinaron todas las interacciones entre los promotores y un conjunto dado de intervalos (es decir, los picos de ATAC) utilizando la puntuación de Chicago de ≥ 5 como límite. Estos promotores ATAC se filtraron y se seleccionaron aquellos unidos por Ring1b y Cbx7, empleando como referencia los datos de ChIP publicados en (Fursova et al., 2019). A continuación, para cada interacción promotor-intervalo cuantificamos la suma de los recuentos de lecturas normalizados o las puntuaciones CHICAGO en todos los fragmentos DpnII que se solapan con este intervalo. En el caso de los metaperfiles, estos recuentos se normalizaron además con los recuentos dentro del fragmento DpnII que se solapaba con el pico de interacción en la muestra G2. Además, se invirtieron las lecturas para representar los perfiles direccionales desde las lecturas distales del promotor (-40) hasta las proximales del promotor (+40).

5.6.- Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de secuenciación se realizaron con R 3.5.1. En los *boxplots*, las barras indican el intervalo dentro de $1.5 \times$ el rango del intercuartil, y los *p* valores se calcularon mediante la prueba de Mann-Whitney (diferencias significativas P valor < 0.0001). El promedio de lecturas mapeadas alrededor del TSS se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA), comparando todas las muestras en una ventana de -0.5 a +1.5 kb desde el TSS (diferencias significativas $P < 0.0001$). El análisis estadístico de ChIP-qPCR se realizó por triplicado y utilizando la prueba T de Student (diferencias significativas $P < 0.05$).

6.- Western Blot

6.1.- Extractos totales de proteína

El análisis por Western blot de extractos totales de proteína se realizó con 1 millón de células de cada fracción de ciclo. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 50 μl de PBS y 50 μl de Laemmli Buffer 2x (0.1 M de tris (pH 6.8),

2% de SDS y 5% de glicerol) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1x inhibidor de proteasas sin EDTA (Roche), 1 mM de PMSF, 5 mM NaF y 2 mM Na₃VO₄), tras lo cual se incubaron a 95°C durante 5 min y en hielo 2 min. La concentración de proteína se midió con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante en un lector de placas M200 Nanoquant. A la muestra final se le añadió β-Mercaptoetanol y azul de Bromofenol antes de cargar en el gel. La técnica de Western blot se llevó a cabo utilizando procedimientos estándar. Los anticuerpos y concentraciones empleadas pueden consultarse en la [Tabla M2-Anexo III](#).

6.2.- Subfraccionamiento celular

Con el fin de analizar extractos de proteína de fracciones subcelulares (citoplasma, nucleoplasma y cromatina), se emplearon 1 millón de células de cada fase de ciclo para realizar el subfraccionamiento celular tal como se describe en (Beringer et al., 2016). Para extraer la fracción total, las células se resuspendieron en 500 µl de Buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M Sacarosa, 10% Glicerol, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 1x inhibidores de proteasas (Roche)) y se incubaron durante 10 min en hielo. Tras centrifugar (1300g 5 min 4°C) se recogieron 50 µl de sobrenadante como fracción citoplasmática. El pellet se lavó con Buffer A y se resuspendió en 50 µl del mismo buffer que se diluyeron con 500 µl de Buffer B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1x inhibidores de proteasas) y se incubó durante 30 min en hielo. A continuación, se centrifugó (1700g 5 min 4°C) y se recogió una alícuota de 50 µl como la fracción nucleoplasmática. Por último, la fracción cromatínica se obtuvo tras lavar el pellet con Buffer B y resuspenderlo en lisis Buffer B-SDS 1x (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 2 mM EDTA, 2% SDS). El resto de las fracciones aisladas se mezclaron con un volumen de B-SDS 2x (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 4 mM EDTA, 4% SDS) y todas se calentaron a 95°C durante 10 min y, en caso de ser necesario, se sonicaron en un Sonicator Bioruptor Plus (Diagenode). Para el Western blot se cargó una cantidad equivalente de células de cada fracción de ciclo. La técnica de Western blot se llevó a cabo utilizando procedimientos estándar. La cuantificación de la intensidad de las bandas y la normalización con Lamina B e histona H3 se llevó a cabo utilizando el software ImageJ.

Anexos

Anexo I. Resultados: Capítulo I.

Tabla RI-1. Comprobación de la pureza de las mESCs separadas por ciclo celular empleadas en los análisis de ChIP-seq. Se muestra el porcentaje de cada fase para los ChIPs analizados.

	Población 1				Población 2				Población 3			
ChIP	Pureza (%)	% en G1	% en S	% en G2	Pureza (%)	% en G1	% en S	% en G2	Pureza (%)	% en G1	% en S	% en G2
Ezh2	97,9	71,9	14,3	13,8	92,6	17,8	58,5	23,8	94,8	1,1	22,0	77,0
Jarid2	96,7	82,0	10,5	7,6	80,5	12,9	48,8	38,3	85,4	3,4	22,3	74,3
EPOP	97,3	84,9	8,6	6,5	92,3	14,3	56,2	29,5	95,1	0,8	18,6	80,6
EloB	97,4	83,2	10,3	6,6	91,5	7,2	59,4	33,4	96,5	1,3	19,9	78,8
Ser5-RNAPII	96,2	74,0	14,2	11,8	72,3	34,3	38,3	27,4	81,0	3,5	31,1	65,4

Tabla RI-2. Análisis de los picos detectados en los experimentos de ChIP-seq. Se indican los umbrales asignados para detectar los picos para cada proteína (columna izquierda). *Promotor definido como +2kb respecto al TSS.

ChIP	Fase de ciclo	Todos los picos	Genes HC bivalentes		Otros
			Promotor*	Cuerpo del gen	
Ezh2 (FDR 0.05)	G1	6316	787	682	5046
	S	9630	1890	1099	7488
	G2	15967	2204	1737	13045
Jarid2 (FDR 0.05)	G1	3861	1540	563	2596
	S	3886	1557	599	2624
	G2	4453	1708	635	3105
EPOP (p-value 0.001)	G1	8684	607	796	7380
	G2	1735	79	126	1536
EloB (p-value 0.01)	G1	4341	239	295	3834
	S	800	15	44	747
	G2	856	28	42	787
Ser5-RNAPII (FDR 0.05)	G1	2662	125	133	2452
	S	7913	721	515	7048
	G2	14270	874	715	13209

Tabla RI-3. Datos de ChIP-seq de células asincrónicas empleados para el análisis presentado en la figura RI-9. Todos los datos empleados derivan de análisis en poblaciones de células asincrónicas.

Datos (ChIP-seq)	Publicación	Código (<i>accession number GEO</i>)
Ezh2	Ku, M., et al. (2008). PLoS Genetics	GSM327668
Eed	Oksuz, O., et al, (2018) Mol Cell	GSM2759294
Suz12	Ku, M., et al. (2008). PLoS Genetics	GSM327667
H3K27me3	Mikkelsen et al., (2007) Nature	GSM307619
Jarid2	Pasini et al, (2010) Nature	GSM480678
Mtf2	Li et al, (2010) Genes and development	GSM491759
EPOP	Beringer et al., (2016) Mol Cell	GSM2098943
EloB	Beringer et al., (2016) Mol Cell	GSM2098954
Mll2	Denissov, S., et al. (2014) Development	GSM1258241
H3K4me3	Mikkelsen et al., (2007) Nature	GSM307618

Anexo II. Resultados: Capítulo II.

Tabla RII-1. Análisis de los picos detectados en los experimentos de ChIP-seq. Se indican los umbrales asignados para detectar los picos para cada proteína (columna izquierda). *Promotor definido como +2kb respecto al TSS.

ChIP	Fase de ciclo	Todos los picos	Picos en Promotor*	Picos en cuerpo del gen	Picos en regiones intergénicas	Promotores diana
Ring1b (FDR 0.05)	G1	4488	2597	789	1102	2109
	S	8748	5560	1383	1805	4605
	G2	5590	2604	1237	1749	2067
Rybp (FDR 0.01)	G1	4233	2851	716	666	2046
	S	17880	13160	2569	2151	10211
	G2	15525	11858	1909	1758	9524
H2AK119ub1 (p-value 0.001)	G1	233	73	88	72	36
	S	751	233	292	226	116
	G2	1582	518	557	507	282
Cbx7 (FDR 0.05)	G1	3810	2295	783	732	1488
	S	3473	2175	665	633	1426
	G2	5219	3230	1005	984	2303

Anexo III. Materiales y métodos

Tabla M1. Líneas celulares empleadas y condiciones de cultivo

Línea celular	FUCCI	Condiciones de cultivo	Procedencia
Jarid2 fl/fl	Sí. Clon 3H	DMEM KO complete + Higromicina (40 µg/ml). Pase 1:6 cada 2 días.	Laboratorio de Amanda Fisher. MRC, Londres (UK). Clon FUCCI generado en esta tesis.
Jarid2 -/-	Sí. Clon 9D	DMEM KO complete + Higromicina (40 µg/ml). Pase 1:6 cada 2 días.	Laboratorio de Amanda Fisher. MRC, Londres. Clon FUCCI generado en esta tesis.
Ring1a-/-; Ring1bfl/fl; Rosa26::CreERT2	Sí. Clon 1A	DMEM KO complete + Higromicina (40 µg/ml). Pase 1:8 cada 2 días.	Laboratorio de Álvaro Rada Iglesias. CMMC, Colonia (Alemania). Clon FUCCI generado en esta tesis.

Tabla M2. Anticuerpos empleados para ChIP / Western blot y concentraciones empleadas.

Anticuerpo	Referencia	Uso	Concentración
Ezh2	Diagenode C15410039	ChIP / Western blot	ChIP: 1.25 µg/millón de células Western: 1:1000
Jarid2	Novus Bio NB100-2214	ChIP / Western blot	ChIP: 1.25 µg/millón de células Western: 1:500
EPOP	Regalo de Luciano Di Croce	ChIP / Western blot	ChIP: 2 µg/millón de células Western: 1:1000
EloB	Regalo de Luciano Di Croce	ChIP / Western blot	ChIP: 2 µg/millón de células Western: 1:1000
Ser5-RNAPII	Millipore 05-623	ChIP / Western blot	ChIP: 5 µg/millón de células Western: 1:1000
H3K27me3	Active Motif 39535	ChIP / Western blot	ChIP: 1.25 µg/millón de células Western: 1:1000
Ring1b	MBL D139-3	ChIP / Western blot	ChIP: 1.25 µg/millón de células Western: 1:1000
Cbx7	Abcam ab21873	ChIP / Western blot	ChIP: 2.5 µg/millón de células Western: 1:1000
Rybp	Millipore AB3637	ChIP / Western blot	ChIP: 2.5 µg/millón de células Western: 1:1000
H2AUb	Cell signalling 8240	ChIP / Western blot	ChIP: 2.5 µg/millón de células Western: 1:2000
Anti-mouse IgG	Dako Z0259	ChIP	ChIP: Misma concentración que anticuerpo principal
LaminB	Santa Cruz Sc-6216	Western blot	Western: 1:1000
H3 total	Abcam ab1791	Western	Western: 1:1000

Tabla M3. Primers empleados para análisis mediante ChIP-qPCR y RT-qPCR (4sU).

ChIP-qPCR Primers	
Genes	Secuencias (<i>Forward, reverse 5'-3'</i>)
Oct4	GTGAGCCGTCTTTCCACCAGG, GGGTGAGAAGGCGAAGTCTGAA
Nanog	GGGTAGGGTAGGAGGCTTGA, CGGCTCAAGGCGATAGATT
Hprt1	CGGCTGGATCTCAAATCTTATGAC, TCCCAGATAATCACTCCGCATTT
Dach1	TGCGCTCGCTCTTTCTTAACC, CAACAAGCACTCTAGGAAGGAAC
Sox7	GCGCCGCCCCAGAGAGT, CCAGCAGCCTCGGGCTTG
Ascl1	CCAGGCTGGAGCAAGGGA, CGGTTGGCTTCGGGAGC
Pax3	GGGCGGATATAGCAAGGTTTCC, CCTGTCCCTCTACATGAGATTCAGC
Msx1	ACAGAAGAAATAGCACAGACCATAAGA, TTCTACCAAGTTCAGAGGGACTTT
Nkx2-2	CAGGTTTCGTGAGTGGAGCCC, GCGCGGCCTCAGTTTGTAAC
Myf5	GGAGATCCGTGCGTTAAGAATCC, CGGTAGCAAGACATTAAGTTCCGTA
λ-5	AGGCCCTAACAGTTTCATCTACTC, GCATCTGGGCCTCGGTTTA

4sU Primers	
Genes	Secuencias (<i>Forward, reverse 5'-3'</i>)
Actin-unspliced	CCACCCGCGAGCACA, CCGGCGTCCCTGCTTAC
Actin-total	GGGAATGGGTCAGAAGGACT, CTTTTCACGGTTGGCCTTAG
C-myc-unspliced	TGTGTGGTGGGTGACTGTTC, CGGGGTAGCAGCTCCTAAGT
C-myc-total	CATCACTTAGGAGCTGCTACCC, TATTTCTCTTTCATTTCTGCCAAT

Tabla M4. Primers empleados para análisis mediante 4C-seq

Primer name	Secuencia	Barcode	Adaptador Illumina
Six2_prom_p7	AACCTCCGCTCTGTGCAGAG	ACAGTG	CAAGCAGAAGACGGCATACGA
Six2_prom_p5_G1	TCTAGCTGACAACACCCACC	GTGAAA	AATGATACGGCGACCACCGAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT
Six2_prom_p5_G2	TCTAGCTGACAACACCCACC	CTTGTA	AATGATACGGCGACCACCGAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT

Abreviaturas

ALT: *Alternative Lengthening of Telomeres*
Cdks: *Cyclin-Dependent protein Kinases*
dKD: *double knockdown*
ECCs: *Embryonal Carcinoma Cells*
EPI: *Epiblast*
EpiESCs: *Epiblast Embryonic Stem Cells*
ESCs: *Embryonic Stem Cells*
FBS: *Fetal Bovine Serum*
FGF: *Fibroblast Growth Factor*
FUCCI: *Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicator*
hESCs: *Human Embryonic Stem Cells*
HSCs: *Hematopoietic Stem Cells*
ICM: *Inner Cell Mass*
iPSCs: *Induced Pluripotent Stem Cells*
LIF: *Leukemia inhibitory factor*
lncRNAs: *long non-coding RNAs*
MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*
mESCs: *mouse Embryonic Stem Cells*
NSCs: *Neural Stem Cells*
PGRN: *Pluripotency Gene Regulatory Network*
PRCs: *Polycomb Repressor Complexes*
PRC1: *Polycomb Repressor Complex 1*
PRC2: *Polycomb Repressor Complex 2*
PrE: *Primitive Endoderm*
PSCs: *Pluripotent Stem Cells*
PTMs: *Post-Translational Modifications*
TE: *Trophectoderm*
TERT: *Telomerase Reverse Transcriptase*
TSCs: *Trophectoderm Stem Cells*
TSS: *Transcription Start Site*

Referencias

- Abranches, E., Bekman, E., and Henrique, D. (2013). Generation and characterization of a novel mouse embryonic stem cell line with a dynamic reporter of Nanog expression. *PLoS One* *8*, e59928.
- Ahmed, K., Dehghani, H., Rugg-Gunn, P., Fussner, E., Rossant, J., and Bazett-Jones, D.P. (2010). Global chromatin architecture reflects pluripotency and lineage commitment in the early mouse embryo. *PLoS One* *5*, e10531.
- Alabert, C., Barth, T.K., Reverón-Gómez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O.N., Imhof, A., and Groth, A. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes & Development* *29*, 585-590.
- Alabert, C., Loos, C., Voelker-Albert, M., Graziano, S., Forné, I., Reveron-Gomez, N., Schuh, L., Hasenauer, J., Marr, C., Imhof, A., *et al.* (2020). Domain Model Explains Propagation Dynamics and Stability of Histone H3K27 and H3K36 Methylation Landscapes. *Cell Reports* *30*, 1223-1234.e1228.
- Alecki, C., Chiwara, V., Sanz, L.A., Grau, D., Arias Pérez, O., Boulier, E.L., Armache, K.J., Chédin, F., and Francis, N.J. (2020). RNA-DNA strand exchange by the Drosophila Polycomb complex PRC2. *Nat Commun* *11*, 1781.
- Almeida, M., Pintacuda, G., Masui, O., Koseki, Y., Gdula, M., Cerase, A., Brown, D., Mould, A., Innocent, C., Nakayama, M., *et al.* (2017). PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science* *356*, 1081-1084.
- Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Wilson, D.B. (1993). Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* *13*, 2235-2246.
- Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M.A., Polo, J.M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N., and Hochedlinger, K. (2011). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell* *9*, 317-329.
- Arrigoni, R., Alam, S.L., Wamstad, J.A., Bardwell, V.J., Sundquist, W.I., and Schreiber-Agus, N. (2006). The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein. *FEBS Letters* *580*, 6233-6241.
- Artus, J., Panthier, J.J., and Hadjantonakis, A.K. (2010). A role for PDGF signaling in expansion of the extra-embryonic endoderm lineage of the mouse blastocyst. *Development* *137*, 3361-3372.
- Artus, J., Piliszek, A., and Hadjantonakis, A.-K. (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Developmental Biology* *350*, 393-404.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development* *17*, 126-140.
- Azura, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merkschlager, M., *et al.* (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature Cell Biology* *8*, 532-538.
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., and Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature Chemistry* *6*, 1049-1055.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* *461*, 1292-1295.
- Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* *143*, 470-484.

- Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 209, 883-893.
- Belaghzal, H., Borrman, T., Stephens, A.D., Lafontaine, D.L., Venev, S.V., Weng, Z., Marko, J.F., and Dekker, J. (2021). Liquid chromatin Hi-C characterizes compartment-dependent chromatin interaction dynamics. *Nature Genetics* 53, 367-378.
- Beltran, M., Yates, C.M., Skalska, L., Dawson, M., Reis, F.P., Viiri, K., Fisher, C.L., Sibley, C.R., Foster, B.M., Bartke, T., *et al.* (2016). The interaction of PRC2 with RNA or chromatin is mutually antagonistic. *Genome Res* 26, 896-907.
- Bentley, M.L., Corn, J.E., Dong, K.C., Phung, Q., Cheung, T.K., and Cochran, A.G. (2011). Recognition of Ubch5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. *The EMBO Journal* 30, 3285-3297.
- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., and Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & development* 23, 781-783.
- Beringer, M., Pisano, P., Di Carlo, V., Blanco, E., Chammas, P., Vizán, P., Gutiérrez, A., Aranda, S., Payer, B., Wierer, M., *et al.* (2016). EPOP Functionally Links Elongin and Polycomb in Pluripotent Stem Cells. *Molecular Cell* 64, 645-658.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N.C., Moreno, I., Burks, D., Brown, S., Pedersen, R.A., Gaffney, D., Mendjan, S., *et al.* (2015). Activin/nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes Dev* 29, 702-717.
- Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-169.
- Bessonnard, S., De Mot, L., Gonze, D., Barriol, M., Dennis, C., Goldbeter, A., Dupont, G., and Chazaud, C. (2014). Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development* 141, 3637-3648.
- Birke, M., Schreiner, S., García-Cuellar, M.P., Mahr, K., Titgemeyer, F., and Slany, R.K. (2002). The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res* 30, 958-965.
- Blackledge, Neil P., Farcas, Anca M., Kondo, T., King, Hamish W., McGouran, Joanna F., Hanssen, Lars L.P., Ito, S., Cooper, S., Kondo, K., Koseki, Y., *et al.* (2014). Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell* 157, 1445-1459.
- Blackledge, N.P., Fursova, N.A., Kelley, J.R., Huseyin, M.K., Feldmann, A., and Klose, R.J. (2020). PRC1 Catalytic Activity Is Central to Polycomb System Function. *Molecular Cell* 77, 857-874.e859.
- Blackledge, N.P., and Klose, R.J. (2021). The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Blackledge, N.P., Rose, N.R., and Klose, R.J. (2015). Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: modifications to a complex story. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 643-649.

- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., and Nichols, J. (2014). 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.
- Boward, B., Wu, T., and Dalton, S. (2016). Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *STEM CELLS* *34*, 1427-1436.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* *441*, 349-353.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* *2*, 151-159.
- Bravo, M., Nicolini, F., Starowicz, K., Barroso, S., Calés, C., Aguilera, A., and Vidal, M. (2015). Polycomb RING1A- and RING1B-dependent histone H2A monoubiquitylation at pericentromeric regions promotes S-phase progression. *Journal of Cell Science* *128*, 3660.
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., *et al.* (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* *448*, 191-195.
- Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5709-5712.
- Brookes, E., de Santiago, I., Hebenstreit, D., Morris, K.J., Carroll, T., Xie, S.Q., Stock, J.K., Heidemann, M., Eick, D., Nozaki, N., *et al.* (2012). Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell* *10*, 157-170.
- Bruggeman, S.W.M., Valk-Lingbeek, M.E., van der Stoop, P.P.M., Jacobs, J.J.L., Kieboom, K., Tanger, E., Hulsman, D., Leung, C., Arsenijevic, Y., Marino, S., *et al.* (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes & Development* *19*, 1438-1443.
- Cai, Y., Zhang, Y., Loh, Y.P., Tng, J.Q., Lim, M.C., Cao, Z., Raju, A., Lieberman Aiden, E., Li, S., Manikandan, L., *et al.* (2021). H3K27me3-rich genomic regions can function as silencers to repress gene expression via chromatin interactions. *Nature Communications* *12*, 719.
- Calder, A., Roth-Albin, I., Bhatia, S., Pilquill, C., Lee, J.H., Bhatia, M., Levadoux-Martin, M., McNicol, J., Russell, J., Collins, T., *et al.* (2013). Lengthened G1 phase indicates differentiation status in human embryonic stem cells. *Stem cells and development* *22*, 279-295.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* *15*, 57-67.
- Cavalli, G. (2015). PRC1 proteins orchestrate three-dimensional genome architecture. *Nature Genetics* *47*, 1105.
- Cervantes, R.B., Stringer, J.R., Shao, C., Tischfield, J.A., and Stambrook, P.J. (2002). Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 3586-3590.
- Cooper, S., Grijszenhout, A., Underwood, E., Ancelin, K., Zhang, T., Nesterova, T.B., Anil-Kirmizitas, B., Bassett, A., Kooistra, S.M., Agger, K., *et al.* (2016a). Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. *Nature Communications* *7*, 13661.

- Cooper, S., Grijzenhout, A., Underwood, E., Ancelin, K., Zhang, T., Nesterova, T.B., Anil-Kirmizitas, B., Bassett, A., Kooistra, S.M., Agger, K., *et al.* (2016b). Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. *Nature Communications* 7, 13661.
- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Taponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., *et al.* (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Research* 10, 118-131.
- Coux, R.-X., Owens, N.D.L., and Navarro, P. (2020). Chromatin accessibility and transcription factor binding through the perspective of mitosis. *Transcription* 11, 236-240.
- Crispatzu, G., Rehim, R., Pachano, T., Bleckwehl, T., Cruz-Molina, S., Xiao, C., Mahabir, E., Bazzi, H., and Rada-Iglesias, A. (2021). The chromatin, topological and regulatory properties of pluripotency-associated poised enhancers are conserved in vivo. *Nature Communications* 12, 4344.
- Cruz-Molina, S., Respuela, P., Tebartz, C., Kolovos, P., Nikolic, M., Fueyo, R., van Ijcken, W.F.J., Grosveld, F., Frommolt, P., Bazzi, H., *et al.* (2017). PRC2 Facilitates the Regulatory Topology Required for Poised Enhancer Function during Pluripotent Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* 20, 689-705.e689.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230-1234.
- Chan, Y.S., Göke, J., Ng, J.H., Lu, X., Gonzales, K.A., Tan, C.P., Tng, W.Q., Hong, Z.Z., Lim, Y.S., and Ng, H.H. (2013). Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* 13, 663-675.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Developmental Cell* 10, 615-624.
- Chen, D., Liu, W., Zimmerman, J., Pastor, W.A., Kim, R., Hosohama, L., Ho, J., Aslanyan, M., Gell, J.J., Jacobsen, S.E., *et al.* (2018a). The TFAP2C-Regulated OCT4 Naive Enhancer Is Involved in Human Germline Formation. *Cell Reports* 25, 3591-3602.e3595.
- Chen, H., Aksoy, I., Gonnot, F., Osteil, P., Aubry, M., Hamela, C., Rognard, C., Hochard, A., Voisin, S., Fontaine, E., *et al.* (2015). Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat Commun* 6, 7095.
- Chen, S., Bohrer, L.R., Rai, A.N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J.A., and Huang, H. (2010). Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat Cell Biol* 12, 1108-1114.
- Chen, S., Jiao, L., Shubbar, M., Yang, X., and Liu, X. (2018b). Unique Structural Platforms of Suz12 Dictate Distinct Classes of PRC2 for Chromatin Binding. *Molecular Cell* 69, 840-852.e845.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., *et al.* (2008). Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* 133, 1106-1117.
- Chew, J.L., Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.L., Yeap, L.S., Li, P., Ang, Y.S., Lim, B., Robson, P., *et al.* (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 25, 6031-6046.

- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.-J., Johnson, J., Meisner, L., and Lanza, R. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* *439*, 216-219.
- Dalton, S. (2015). Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends in Cell Biology* *25*, 592-600.
- De Jaime-Soguero, A., Aulicino, F., Ertaylan, G., Griego, A., Cerrato, A., Tallam, A., Del Sol, A., Cosma, M.P., and Lluis, F. (2017). Wnt/Tcf1 pathway restricts embryonic stem cell cycle through activation of the Ink4/Arf locus. *PLoS Genet* *13*, e1006682.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* *25*, 1010-1022.
- Denholtz, M., Bonora, G., Chronis, C., Splinter, E., de Laat, W., Ernst, J., Pellegrini, M., and Plath, K. (2013). 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.
- Dimitrova, E., Feldmann, A., van der Weide, R.H., Flach, K.D., Lastuvkova, A., de Wit, E., and Klose, R.J. (2021). Distinct roles for CDK-Mediator in controlling Polycomb-dependent chromosomal interactions and priming genes for induction. *bioRxiv*, 2021.2011.2004.467119.
- Diwan, S.B., and Stevens, L.C. (1976). Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *Journal of the National Cancer Institute* *57*, 937-942.
- Dobin, A., and Gingeras, T.R. (2015). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current protocols in bioinformatics* *51*, 11.14.11-11.14.19.
- Dobrinić, P., Szczurek, A.T., and Klose, R.J. (2021). PRC1 drives Polycomb-mediated gene repression by controlling transcription initiation and burst frequency. *Nature Structural & Molecular Biology* *28*, 811-824.
- Duncan, S.A., Manova, K., Chen, W.S., Hoodless, P., Weinstein, D.C., Bachvarova, R.F., and Darnell, J.E., Jr. (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7598-7602.
- Eakin, G.S., Hadjantonakis, A.K., Papaioannou, V.E., and Behringer, R.R. (2005). Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Dev Biol* *288*, 150-159.
- Edgar, B.A., and Lehner, C.F. (1996). Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* *274*, 1646-1652.
- Efroni, S., Duttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoepfner, D.J., Dash, C., Bazett-Jones, D.P., Le Grice, S., McKay, R.D., Buetow, K.H., *et al.* (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *2*, 437-447.
- Eistetter, H.R. (1989). Pluripotent Embryonal Stem Cell Lines Can Be Established from Disaggregated Mouse Morulae. *Dev Growth Differ* *31*, 275-282.
- Enders, A.C., Given, R.L., and Schlafke, S. (1978). Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. *The Anatomical record* *190*, 65-77.
- Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Fujimura, Y.-i., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A.P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M., *et al.* (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development (Cambridge, England)* *135*, 1513-1524.
- Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K.-i., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., *et al.* (2012). Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate

PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. *PLOS Genetics* 8, e1002774.

Escobar, T.M., Oksuz, O., Saldaña-Meyer, R., Descostes, N., Bonasio, R., and Reinberg, D. (2019). Active and Repressed Chromatin Domains Exhibit Distinct Nucleosome Segregation during DNA Replication. *Cell* 179, 953-963.e911.

Eskeland, R., Leeb, M., Grimes, G.R., Kress, C., Boyle, S., Sproul, D., Gilbert, N., Fan, Y., Skoultchi, A.I., Wutz, A., *et al.* (2010). Ring1B Compacts Chromatin Structure and Represses Gene Expression Independent of Histone Ubiquitination. *Molecular Cell* 38, 452-464.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Fan, H., Guo, Y., Tsai, Y.H., Storey, A.J., Kim, A., Gong, W., Edmondson, R.D., Mackintosh, S.G., Li, H., Byrum, S.D., *et al.* (2021). A conserved BAH module within mammalian BAHD1 connects H3K27me3 to Polycomb gene silencing. *Nucleic Acids Res* 49, 4441-4455.

Fan, H., Lu, J., Guo, Y., Li, D., Zhang, Z.-M., Tsai, Y.-H., Pi, W.-C., Ahn, J.H., Gong, W., Xiang, Y., *et al.* (2020). BAHCC1 binds H3K27me3 via a conserved BAH module to mediate gene silencing and oncogenesis. *Nature Genetics* 52, 1384-1396.

Farcas, A.M., Blackledge, N.P., Sudbery, I., Long, H.K., McGouran, J.F., Rose, N.R., Lee, S., Sims, D., Cerase, A., Sheahan, T.W., *et al.* (2012). KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *eLife* 1, e00205.

Ferrari, K.J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T., and Pasini, D. (2014). Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell* 53, 49-62.

Filipczyk, A.A., Laslett, A.L., Mummery, C., and Pera, M.F. (2007). Differentiation is coupled to changes in the cell cycle regulatory apparatus of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 1, 45-60.

Finogenova, K., Bonnet, J., Poepsel, S., Schäfer, I.B., Finkl, K., Schmid, K., Litz, C., Strauss, M., Benda, C., and Müller, J. (2020). Structural basis for PRC2 decoding of active histone methylation marks H3K36me2/3. *Elife* 9.

Fluckiger, A.C., Marcy, G., Marchand, M., Nègre, D., Cosset, F.L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P., and Dehay, C. (2006). Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 547-556.

Fursova, N.A., Blackledge, N.P., Nakayama, M., Ito, S., Koseki, Y., Farcas, A.M., King, H.W., Koseki, H., and Klose, R.J. (2019). Synergy between Variant PRC1 Complexes Defines Polycomb-Mediated Gene Repression. *Molecular Cell* 74, 1020-1036.e1028.

Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012). PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes. *Molecular Cell* 45, 344-356.

Gavet, O., and Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* 18, 533-543.

Gehani, S.S., Agrawal-Singh, S., Dietrich, N., Christophersen, N.S., Helin, K., and Hansen, K. (2010). *Mol Cell* 39, 886-900.

Gil, J., Bernard, D., Martínez, D., and Beach, D. (2004). Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol* 6, 67-72.

- Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S.J., Yao, M., Citterio, E., van Lohuizen, M., and Ganesan, S. (2011). BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol Cell Biol* *31*, 1972-1982.
- Glancy, E., Ciferri, C., and Bracken, A.P. (2021). Structural basis for PRC2 engagement with chromatin. *Current Opinion in Structural Biology* *67*, 135-144.
- Gonzales, K.A.U., Liang, H., Lim, Y.-S., Chan, Y.-S., Yeo, J.-C., Tan, C.-P., Gao, B., Le, B., Tan, Z.-Y., Low, K.-Y., *et al.* (2015). Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways. *Cell* *162*, 564-579.
- Grandy, R.A., Whitfield, T.W., Wu, H., Fitzgerald, M.P., VanOudenhove, J.J., Zaidi, S.K., Montecino, M.A., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., *et al.* (2016). Genome-Wide Studies Reveal that H3K4me3 Modification in Bivalent Genes Is Dynamically Regulated during the Pluripotent Cell Cycle and Stabilized upon Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* *36*, 615-627.
- Gu, T., Lin, X., Cullen, S.M., Luo, M., Jeong, M., Estecio, M., Shen, J., Hardikar, S., Sun, D., Su, J., *et al.* (2018). DNMT3A and TET1 cooperate to regulate promoter epigenetic landscapes in mouse embryonic stem cells. *Genome Biology* *19*, 88.
- Guo, G., von Meyenn, F., Rostovskaya, M., Clarke, J., Dietmann, S., Baker, D., Sahakyan, A., Myers, S., Bertone, P., Reik, W., *et al.* (2017). Epigenetic resetting of human pluripotency. *Development* *144*, 2748-2763.
- Guo, S., Zi, X., Schulz, V.P., Cheng, J., Zhong, M., Koochaki, S.H., Megyola, C.M., Pan, X., Heydari, K., Weissman, S.M., *et al.* (2014). Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell* *156*, 649-662.
- Habibi, E., Brinkman, Arie B., Arand, J., Kroeze, Leonie I., Kerstens, Hindrik H.D., Matarese, F., Lepikhov, K., Gut, M., Brun-Heath, I., Hubner, Nina C., *et al.* (2013). Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Two Distinct Interconvertible DNA Methylomes of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *13*, 360-369.
- Hansen, K.H., Bracken, A.P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S.S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M., and Helin, K. (2008). A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nature Cell Biology* *10*, 1291-1300.
- Harlen, K.M., and Churchman, L.S. (2017). The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 263-273.
- Hayashi, K., de Sousa Lopes, S.M.C., Tang, F., Lao, K., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* *3*, 391-401.
- Healy, E., Mucha, M., Glancy, E., Fitzpatrick, D.J., Conway, E., Neikes, H.K., Monger, C., Van Mierlo, G., Baltissen, M.P., Koseki, Y., *et al.* (2019). PRC2.1 and PRC2.2 Synergize to Coordinate H3K27 Trimethylation. *Molecular Cell* *76*, 437-452.e436.
- Heasman, J. (2006). Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* *133*, 1205-1217.
- Ho, L., and Crabtree, G.R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature* *463*, 474-484.
- Holoch, D., and Margueron, R. (2017). Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. *Trends in Biochemical Sciences* *42*, 531-542.
- Hong, Y., Cervantes, R.B., Tichy, E., Tischfield, J.A., and Stambrook, P.J. (2007). Protecting genomic integrity in somatic cells and embryonic stem cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *614*, 48-55.

- Humphrey, R.K., Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., King, C.C., Firpo, M.T., Rose-John, S., and Hayek, A. (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells* *22*, 522-530.
- Huseyin, M.K., and Klose, R.J. (2021). Live-cell single particle tracking of PRC1 reveals a highly dynamic system with low target site occupancy. *Nature Communications* *12*, 887.
- Ismail, I.H., Andrin, C., McDonald, D., and Hendzel, M.J. (2010). BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *The Journal of Cell Biology* *191*, 45.
- Isono, K., Endo, T.A., Ku, M., Yamada, D., Suzuki, R., Sharif, J., Ishikura, T., Toyoda, T., Bernstein, B.E., and Koseki, H. (2013). SAM domain polymerization links subnuclear clustering of PRC1 to gene silencing. *Dev Cell* *26*, 565-577.
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* *397*, 164-168.
- Jadhav, U., Manieri, E., Nalapareddy, K., Madha, S., Chakrabarti, S., Wucherpfennig, K., Barefoot, M., and Shivdasani, R.A. (2020). Replicational Dilution of H3K27me3 in Mammalian Cells and the Role of Poised Promoters. *Mol Cell* *78*, 141-151.e145.
- Jermann, P., Hoerner, L., Burger, L., and Schübeler, D. (2014). Short sequences can efficiently recruit histone H3 lysine 27 trimethylation in the absence of enhancer activity and DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E3415-3421.
- Johnson, M.H., and Ziomek, C.A. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* *24*, 71-80.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., *et al.* (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *467*, 430-435.
- Kahan, B.W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute* *44*, 1015-1036.
- Kajiume, T., Ninomiya, Y., Ishihara, H., Kanno, R., and Kanno, M. (2004). Polycomb group gene *me1-18* modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* *32*, 571-578.
- Kalb, R., Latwiel, S., Baymaz, H.I., Jansen, P.W.T.C., Müller, C.W., Vermeulen, M., and Müller, J. (2014). Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nature Structural & Molecular Biology* *21*, 569-571.
- Kaneko, S., Bonasio, R., Saldaña-Meyer, R., Yoshida, T., Son, J., Nishino, K., Umezawa, A., and Reinberg, D. (2014a). Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin. *Mol Cell* *53*, 290-300.
- Kaneko, S., Li, G., Son, J., Xu, C.-F., Margueron, R., Neubert, T.A., and Reinberg, D. (2010). Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes & Development* *24*, 2615-2620.
- Kaneko, S., Son, J., Bonasio, R., Shen, S.S., and Reinberg, D. (2014b). Nascent RNA interaction keeps PRC2 activity poised and in check. *Genes Dev* *28*, 1983-1988.
- Kanhere, A., Viiri, K., Araújo, C.C., Rasaiyaah, J., Bouwman, R.D., Whyte, W.A., Pereira, C.F., Brookes, E., Walker, K., Bell, G.W., *et al.* (2010). Short RNAs Are Transcribed from Repressed Polycomb Target Genes and Interact with Polycomb Repressive Complex-2. *Molecular Cell* *38*, 675-688.

- Kasinath, V., Faini, M., Poepsel, S., Reif, D., Feng, X.A., Stjepanovic, G., Aebersold, R., and Nogales, E. (2018). Structures of human PRC2 with its cofactors AEBP2 and JARID2. *Science* *359*, 940.
- Kim, C., Sung, S., Kim, J.-S., Lee, H., Jung, Y., Shin, S., Kim, E., Seo, J.J., Kim, J., Kim, D., *et al.* (2021). Telomeres reformed with non-telomeric sequences in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications* *12*, 1097.
- Kim, C.A., Gingery, M., Pilpa, R.M., and Bowie, J.U. (2002). The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nature Structural Biology* *9*, 453-457.
- Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* *127*, 265-275.
- Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research* *24*, 1544.
- Kloet, S.L., Makowski, M.M., Baymaz, H.I., van Voorthuijsen, L., Karemaker, I.D., Santanach, A., Jansen, P.W.T.C., Di Croce, L., and Vermeulen, M. (2016). The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. *Nature Structural & Molecular Biology* *23*, 682.
- Klose, R.J., Cooper, S., Farcas, A.M., Blackledge, N.P., and Brockdorff, N. (2013). Chromatin sampling--an emerging perspective on targeting polycomb repressor proteins. *PLoS genetics* *9*, e1003717-e1003717.
- Klymenko, T., and Müller, J. (2004). The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep* *5*, 373-377.
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Imai, M., Takahashi, N., Fukuda, A., Yayoi, O., Sato, S., Nakabayashi, K., Hata, K., Sotomaru, Y., *et al.* (2012). Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks. *PLOS Genetics* *8*, e1002440.
- Kojima, Y., Kaufman-Francis, K., Studdert, Joshua B., Steiner, Kirsten A., Power, Melinda D., Loebel, David A.F., Jones, V., Hor, A., de Alencastro, G., Logan, Grant J., *et al.* (2014). The Transcriptional and Functional Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak. *Cell Stem Cell* *14*, 107-120.
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* *26*, 903-911.
- Kopylova, E., Touzet, H., and Noé, L. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* *28*, 3211-3217.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.
- Ku, M., Koche, R.P., Rheinbay, E., Mendenhall, E.M., Endoh, M., Mikkelsen, T.S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A.S., *et al.* (2008). Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains. *PLOS Genetics* *4*, e1000242.
- Kundu, S., Ji, F., Sunwoo, H., Jain, G., Lee, J.T., Sadreyev, R.I., Dekker, J., and Kingston, R.E. (2017). Polycomb Repressive Complex 1 Generates Discrete Compacted Domains that Change during Differentiation. *Molecular Cell* *65*, 432-446.e435.
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* *103*, 389-398.

- Landeira, D., Sauer, S., Poot, R., Dvorkina, M., Mazzarella, L., Jørgensen, H.F., Pereira, C.F., Leleu, M., Piccolo, F.M., Spivakov, M., *et al.* (2010). 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. *12*, 618.
- Lavarone, E., Barbieri, C.M., and Pasini, D. (2019). Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nature Communications 10*, 1679.
- Lee, C.-H., Yu, J.-R., Kumar, S., Jin, Y., LeRoy, G., Bhanu, N., Kaneko, S., Garcia, B.A., Hamilton, A.D., and Reinberg, D. (2018a). Allosteric Activation Dictates PRC2 Activity Independent of Its Recruitment to Chromatin. *Molecular Cell 70*, 422-434.e426.
- Lee, C.H., Holder, M., Grau, D., Saldaña-Meyer, R., Yu, J.R., Ganai, R.A., Zhang, J., Wang, M., LeRoy, G., Dobenecker, M.W., *et al.* (2018b). Distinct Stimulatory Mechanisms Regulate the Catalytic Activity of Polycomb Repressive Complex 2. *Mol Cell 70*, 435-448.e435.
- Lee, J., Go, Y., Kang, I., Han, Y.M., and Kim, J. (2010). Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *The Biochemical journal 426*, 171-181.
- Leeb, M., Pasini, D., Novatchkova, M., Jaritz, M., Helin, K., and Wutz, A. (2010). Polycomb complexes act redundantly to repress genomic repeats and genes. *Genes & Development 24*, 265-276.
- Leeb, M., and Wutz, A. (2007). Ring1B is crucial for the regulation of developmental control genes and PRC1 proteins but not X inactivation in embryonic cells. *The Journal of cell biology 178*, 219-229.
- Lehmann, L., Ferrari, R., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., Kurdistani, S.K., and Carey, M. (2012). Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) Disassembles RNA Polymerase II Preinitiation Complexes. *Journal of Biological Chemistry 287*, 35784-35794.
- Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., Encheva, V., Carroll, T., Grabole, N., Mansfield, W., Nashun, B., Knezovich, J.G., Smith, A., *et al.* (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nature Structural & Molecular Biology 20*, 311-316.
- Lewis, E., and Mislove, R. (1947). New mutants report. *Drosoph. Inf. Serv 21*, 69.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature 276*, 565-570.
- Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B.E., and Reinberg, D. (2010). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes & Development 24*, 368-380.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., and Homer, N. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics 25*.
- Li, H., Liefke, R., Jiang, J., Kurland, J.V., Tian, W., Deng, P., Zhang, W., He, Q., Patel, D.J., Bulyk, M.L., *et al.* (2017). Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature 549*, 287-291.
- Li, M., and Belmonte, J.C.I. (2017). Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nature Reviews Genetics 18*, 180.
- Li, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2018). Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nature Cell Biology 20*, 382-392.
- Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S.Y., Qin, J., Wong, J., Cooney, A.J., Liu, D., *et al.* (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol 10*, 731-739.

- Lindeman, L.C., Andersen, I.S., Reiner, A.H., Li, N., Aanes, H., Østrup, O., Winata, C., Mathavan, S., Müller, F., Aleström, P., *et al.* (2011). Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation. *Dev Cell* *21*, 993-1004.
- Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L., Seyfang, A., *et al.* (2007). Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* *9*, 1436-1441.
- Liu, L., Michowski, W., Inuzuka, H., Shimizu, K., Nihira, N.T., Chick, J.M., Li, N., Geng, Y., Meng, A.Y., Ordureau, A., *et al.* (2017). G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* *19*, 177-188.
- Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A., and Sicinski, P. (2019). The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nature Cell Biology* *21*, 1060-1067.
- Liu, X., Tan, J.P., Schröder, J., Aberkane, A., Ouyang, J.F., Mohenska, M., Lim, S.M., Sun, Y.B.Y., Chen, J., Sun, G., *et al.* (2021). Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature* *591*, 627-632.
- Long, Y., Hwang, T., Gooding, A.R., Goodrich, K.J., Rinn, J.L., and Cech, T.R. (2020). RNA is essential for PRC2 chromatin occupancy and function in human pluripotent stem cells. *Nature Genetics* *52*, 931-938.
- Loubiere, V., Papadopoulos, G.L., Szabo, Q., Martinez, A.M., and Cavalli, G. (2020). Widespread activation of developmental gene expression characterized by PRC1-dependent chromatin looping. *Sci Adv* *6*, eaax4001.
- Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *13*, 436-447.
- Macfarlan, T.S., Gifford, W.D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H.M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., and Pfaff, S.L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* *487*, 57-63.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* *1*, 55-70.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury Iii, W.J., Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., De Marco, V., *et al.* (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* *461*, 762-767.
- Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Molecular Cell* *32*, 503-518.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* *469*, 343-349.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *4*, 141-154.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., *et al.* (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* *149*, 590-604.
- Martello, G., and Smith, A. (2014). The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *30*, 647-675.

- Martin, G.R. (1975). Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* 5, 229-243.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Martin, G.R., and Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1441-1445.
- Mas, G., Blanco, E., Ballaré, C., Sansó, M., Spill, Y.G., Hu, D., Aoi, Y., Le Dily, F., Shilatifard, A., Marti-Renom, M.A., *et al.* (2018). Promoter bivalency favors an open chromatin architecture in embryonic stem cells. *Nature Genetics*.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 9, 625-635.
- Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., and Andrews, P.W. (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 22, 659-668.
- McGinty, R.K., Henrici, R.C., and Tan, S. (2014). Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature* 514, 591-596.
- Meilhac, S.M., Adams, R.J., Morris, S.A., Danckaert, A., Le Garrec, J.-F., and Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Developmental biology* 331, 210-221.
- Mendenhall, E.M., Koche, R.P., Truong, T., Zhou, V.W., Issac, B., Chi, A.S., Ku, M., and Bernstein, B.E. (2010). GC-Rich Sequence Elements Recruit PRC2 in Mammalian ES Cells. *PLOS Genetics* 6, e1001244.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., and Giannoukos, G. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448.
- Milne, T.A., Dou, Y., Martin, M.E., Brock, H.W., Roeder, R.G., and Hess, J.L. (2005). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14765-14770.
- Miller, S.A., Damle, M., Kim, J., and Kingston, R.E. (2021). Full methylation of H3K27 by PRC2 is dispensable for initial embryoid body formation but required to maintain differentiated cell identity. *Development* 148.
- Min, J., Zhang, Y., and Xu, R.M. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* 17, 1823-1828.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631-642.
- Morey, L., Aloia, L., Cozzuto, L., Benitah, Salvador A., and Di Croce, L. (2013). RYBP and Cbx7 Define Specific Biological Functions of Polycomb Complexes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Reports* 3, 60-69.

- Morey, L., Santanach, A., and Di Croce, L. (2015). Pluripotency and Epigenetic Factors in Mouse Embryonic Stem Cell Fate Regulation. *Molecular and Cellular Biology* *35*, 2716-2728.
- Moris, N., Alev, C., Pera, M., and Martinez Arias, A. (2021). Biomedical and societal impacts of in vitro embryo models of mammalian development. *Stem Cell Reports* *16*, 1021-1030.
- Mousavi, K., Zare, H., Wang, A.H., and Sartorelli, V. (2012). Polycomb Protein Ezh1 Promotes RNA Polymerase II Elongation. *Molecular Cell* *45*, 255-262.
- Mummery, C.L., van Rooijen, M.A., van den Brink, S.E., and de Laat, S.W. (1987). Cell cycle analysis during retinoic acid induced differentiation of a human embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell differentiation* *20*, 153-160.
- Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* *132*, 661-680.
- Nagy, A., Gócza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Iványi, E., Markkula, M., and Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* *110*, 815-821.
- Neganova, I., Zhang, X., Atkinson, S., and Lako, M. (2009). Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene* *28*, 20-30.
- Ng, H.-H., and Surani, M.A. (2011). The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature Cell Biology* *13*, 490-496.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* *11*, 709-719.
- Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* *4*, 487-492.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* *95*, 379-391.
- Niwa, H., Miyazaki, J.-i., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* *24*, 372-376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* *123*, 917-929.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S., and Thomson, J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* *19*, 193-204.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* *60*, 461-472.
- Oksuz, O., Narendra, V., Lee, C.-H., Descostes, N., LeRoy, G., Raviram, R., Blumenberg, L., Karch, K., Rocha, P.P., Garcia, B.A., *et al.* (2018). Capturing the Onset of PRC2-Mediated Repressive Domain Formation. *Molecular Cell* *70*, 1149-1162.e1145.
- Pan, G., Tian, S., Nie, J., Yang, C., Ruotti, V., and Wei, H. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *1*.
- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 1286-1290.

- Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* *423*, 302-305.
- Park, S.H., Park, S.H., Kook, M.C., Kim, E.Y., Park, S., and Lim, J.H. (2004). Ultrastructure of human embryonic stem cells and spontaneous and retinoic acid-induced differentiating cells. *Ultrastructural pathology* *28*, 229-238.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Hansen, J.B., Capillo, M., and Helin, K. (2007). The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol* *27*, 3769-3779.
- Pasini, D., Cloos, P.A.C., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J.-P., Johansen, J.V., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., and Helin, K. (2010a). JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* *464*, 306-310.
- Pasini, D., Malatesta, M., Jung, H.R., Walfridsson, J., Willer, A., Olsson, L., Skotte, J., Wutz, A., Porse, B., Jensen, O.N., *et al.* (2010b). Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Res* *38*, 4958-4969.
- Pauklin, S., Madrigal, P., Bertero, A., and Vallier, L. (2016). Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D. *Genes Dev* *30*, 421-433.
- Pauklin, S., and Vallier, L. (2013). The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell* *155*, 135-147.
- Pauler, F.M., Sloane, M.A., Huang, R., Regha, K., Koerner, M.V., Tamir, I., Sommer, A., Aszodi, A., Jenuwein, T., and Barlow, D.P. (2009). H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome. *Genome Res* *19*, 221-233.
- Peng, J.C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A., and Wysocka, J. (2009). Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* *139*, 1290-1302.
- Pereira, C.F., Piccolo, F.M., Tsubouchi, T., Sauer, S., Ryan, N.K., Bruno, L., Landeira, D., Santos, J., Banito, A., Gil, J., *et al.* (2010). ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell stem cell* *6*, 547-556.
- Perino, M., van Mierlo, G., Karemaker, I.D., van Genesen, S., Vermeulen, M., Marks, H., van Heeringen, S.J., and Veenstra, G.J.C. (2018). MTF2 recruits Polycomb Repressive Complex 2 by helical-shape-selective DNA binding. *Nature Genetics* *50*, 1002-1010.
- Petracovici, A., and Bonasio, R. (2021). Distinct PRC2 subunits regulate maintenance and establishment of Polycomb repression during differentiation. *Molecular Cell*.
- Petruk, S., Cai, J., Sussman, R., Sun, G., Kovermann, S.K., Mariani, S.A., Calabretta, B., McMahon, S.B., Brock, H.W., Iacovitti, L., *et al.* (2017). Delayed Accumulation of H3K27me3 on Nascent DNA Is Essential for Recruitment of Transcription Factors at Early Stages of Stem Cell Differentiation. *Molecular Cell* *66*, 247-257.e245.
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., and Hadjantonakis, A.K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* *135*, 3081-3091.
- Qin, H., Hejna, M., Liu, Y., Percharde, M., Wossidlo, M., Blouin, L., Durruthy-Durruthy, J., Wong, P., Qi, Z., Yu, J., *et al.* (2016). YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Rep* *14*, 2301-2312.

- Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Swigut, T., Brugmann, S.A., Flynn, R.A., and Wysocka, J. (2010). A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* *470*, 279.
- Rathjen, P.D., Toth, S., Willis, A., Heath, J.K., and Smith, A.G. (1990). Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage. *Cell* *62*, 1105-1114.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* *18*, 399-404.
- Reverón-Gómez, N., González-Aguilera, C., Stewart-Morgan, K.R., Petryk, N., Flury, V., Graziano, S., Johansen, J.V., Jakobsen, J.S., Alabert, C., and Groth, A. (2018). Accurate Recycling of Parental Histones Reproduces the Histone Modification Landscape during DNA Replication. *Molecular Cell* *72*, 239-249.e235.
- Richter, A.S., Ryan, D.P., Kilpert, F., Ramírez, F., Heyne, S., Manke, T., Bhardwaj, V., Grüning, B., and Dündar, F. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* *44*, W160-W165.
- Riising, E.M., Comet, I., Leblanc, B., Wu, X., Johansen, J.V., and Helin, K. (2014). Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol Cell* *55*, 347-360.
- Robinson, M.D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* *11*, R25.
- Rose, N.R., King, H.W., Blackledge, N.P., Fursova, N.A., Ember, K.J., Fischer, R., Kessler, B.M., and Klose, R.J. (2016). RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. *eLife* *5*, e18591.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* *345*, 686-692.
- Rossant, J. (1975). Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. *Journal of embryology and experimental morphology* *33*, 991-1001.
- Rossant, J. (2015). Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. *Development* *142*, 9-12.
- Rossant, J., Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *358*, 1341-1349.
- Rugg-Gunn, P.J., Cox, B.J., Ralston, A., and Rossant, J. (2010). Distinct histone modifications in stem cell lines and tissue lineages from the early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 10783-10790.
- Rutkowski, A.J., and Dölken, L. (2017). High-Resolution Gene Expression Profiling of RNA Synthesis, Processing, and Decay by Metabolic Labeling of Newly Transcribed RNA Using 4-Thiouridine. In *Eukaryotic Transcriptional and Post-Transcriptional Gene Expression Regulation*, N. Wajapeyee, and R. Gupta, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 129-140.
- Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes & development* *14*, 3037-3050.
- Saiz, N., and Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction (Cambridge, England)* *145*, R65-80.

Saiz, N., Williams, K.M., Seshan, V.E., and Hadjantonakis, A.-K. (2016). Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nature Communications* 7, 13463.

Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., *et al.* (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132, 487-498.

Sanulli, S., Justin, N., Teissandier, A., Ancelin, K., Portoso, M., Caron, M., Michaud, A., Lombard, B., da Rocha, S.T., Offer, J., *et al.* (2015). Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. *Mol Cell* 57, 769-783.

Satyanarayana, A., and Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28, 2925-2939.

Savatier, P., Huang, S., Szekely, L., Wiman, K.G., and Samarut, J. (1994). Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene* 9, 809-818.

Scelfo, A., Fernández-Pérez, D., Tamburri, S., Zanotti, M., Lavarone, E., Soldi, M., Bonaldi, T., Ferrari, K.J., and Pasini, D. (2019). Functional Landscape of PCGF Proteins Reveals Both RING1A/B-Dependent-and RING1A/B-Independent-Specific Activities. *Molecular Cell* 74, 1037-1052.e1037.

Schmitges, F.W., Prusty, A.B., Faty, M., Stützer, A., Lingaraju, G.M., Aiwazian, J., Sack, R., Hess, D., Li, L., Zhou, S., *et al.* (2011). Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell* 42, 330-341.

Schoenfelder, S., Sugar, R., Dimond, A., Javierre, B.-M., Armstrong, H., Mifsud, B., Dimitrova, E., Matheson, L., Tavares-Cadete, F., Furlan-Magaril, M., *et al.* (2015). Polycomb repressive complex PRC1 spatially constrains the mouse embryonic stem cell genome. *Nature Genetics* 47, 1179.

Schöler, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *Embo j* 9, 2185-2195.

Schuettengruber, B., Bourbon, H.M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* 171, 34-57.

Sela, Y., Molotski, N., Golan, S., Itskovitz-Eldor, J., and Soen, Y. (2012). Human Embryonic Stem Cells Exhibit Increased Propensity to Differentiate During the G1 Phase Prior to Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *STEM CELLS* 30, 1097-1108.

Sharma, R. (2019). Stem Cells and Tissue Engineering in Medical Practice: Ethical and Regulatory Policies. *Current drug targets* 20, 388-398.

Shen, X., Kim, W., Fujiwara, Y., Simon, M.D., Liu, Y., Mysliwiec, M.R., Yuan, G.-C., Lee, Y., and Orkin, S.H. (2009). Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* 139, 1303-1314.

Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.-J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.-C., and Orkin, S.H. (2008). EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency. *Molecular Cell* 32, 491-502.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18, 2699-2711.

Shilatifard, A. (2012). The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annual review of biochemistry* 81, 65-95.

- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition. *PLOS Biology* 6, e253.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722-737.
- Singh, A.M. (2015). Cell Cycle-Driven Heterogeneity: On the Road to Demystifying the Transitions between Poised and Restricted Pluripotent Cell States. *Stem Cells International* 2015, 9.
- Singh, Amar M., Chappell, J., Trost, R., Lin, L., Wang, T., Tang, J., Wu, H., Zhao, S., Jin, P., and Dalton, S. (2013). Cell-Cycle Control of Developmentally Regulated Transcription Factors Accounts for Heterogeneity in Human Pluripotent Cells. *Stem Cell Reports* 1, 532-544.
- Singh, Amar M., Sun, Y., Li, L., Zhang, W., Wu, T., Zhao, S., Qin, Z., and Dalton, S. (2015). Cell-Cycle Control of Bivalent Epigenetic Domains Regulates the Exit from Pluripotency. *Stem Cell Reports* 5, 323-336.
- Skourti-Stathaki, K., Torlai Triglia, E., Warburton, M., Voigt, P., Bird, A., and Pombo, A. (2019). R-Loops Enhance Polycomb Repression at a Subset of Developmental Regulator Genes. *Molecular Cell* 73, 930-945.e934.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Snow, M.H.L. (1977). Gastrulation in the mouse: Growth and regionalization of the epiblast. *Development* 42, 293-303.
- Solter, D., Skreb, N., and Damjanov, I. (1970). Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 227, 503-504.
- Somarowthu, S., Legiewicz, M., Chillón, I., Marcia, M., Liu, F., and Pyle, A.M. (2015). HOTAIR forms an intricate and modular secondary structure. *Mol Cell* 58, 353-361.
- Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dhingra, U., Rathjen, P., Walker, D., and Dalton, S. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* 21, 8320-8333.
- Stewart-Morgan, K.R., Petryk, N., and Groth, A. (2020). Chromatin replication and epigenetic cell memory. *Nature Cell Biology* 22, 361-371.
- Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nature Cell Biology* 9, 1428-1435.
- Streubel, G., Watson, A., Jammula, S.G., Scelfo, A., Fitzpatrick, D.J., Oliviero, G., McCole, R., Conway, E., Glancy, E., Negri, G.L., *et al.* (2018). The H3K36me2 Methyltransferase Nsd1 Demarcates PRC2-Mediated H3K27me2 and H3K27me3 Domains in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell* 70, 371-379.e375.
- Struhl, G. (1981). A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature* 293, 36-41.
- Strumpf, D., Mao, C.A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093-2102.

- Sugishita, H., Kondo, T., Ito, S., Nakayama, M., Yakushiji-Kaminatsui, N., Kawakami, E., Koseki, Y., Ohinata, Y., Sharif, J., Harachi, M., *et al.* (2021). Variant PCGF1-PRC1 links PRC2 recruitment with differentiation-associated transcriptional inactivation at target genes. *Nature Communications* *12*, 5341.
- Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.-X., Han, J.W., Kim, S., Namburi, S., Hermetz, K., Kim, J.J., Rudd, M.K., *et al.* (2011). Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells. *PLOS Genetics* *7*, e1002154.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficuz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., *et al.* (2014). Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell* *158*, 1254-1269.
- Tam, P.P.L., and Rossant, J. (2003). Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development* *130*, 6155.
- Tamburri, S., Lavarone, E., Fernández-Pérez, D., Conway, E., Zanotti, M., Manganaro, D., and Pasini, D. (2020). Histone H2AK119 Mono-Ubiquitination Is Essential for Polycomb-Mediated Transcriptional Repression. *Molecular Cell* *77*, 840-856.e845.
- Tanay, A., Donnell, A.H., Damelin, M., and Bestor, T.H. (2007). Hyperconserved CpG domains underlie Polycomb-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 5521.
- Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* *6*, 468-478.
- Tarazona, S., Furió-Tarí, P., Turrà, D., Pietro, A.D., Nueda, M.J., Ferrer, A., and Conesa, A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic acids research* *43*, e140-e140.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural & Molecular Biology* *14*, 1025-1040.
- Ter Huurne, M., Chappell, J., Dalton, S., and Stunnenberg, H.G. (2017). Distinct Cell-Cycle Control in Two Different States of Mouse Pluripotency. *Cell Stem Cell* *21*, 449-455.e444.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196-199.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.
- Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K., and Niwa, H. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* *135*, 909-918.
- van Mierlo, G., Dirks, R.A.M., De Clerck, L., Brinkman, A.B., Huth, M., Kloet, S.L., Saksouk, N., Kroeze, L.I., Willems, S., Farlik, M., *et al.* (2019). Integrative Proteomic Profiling Reveals PRC2-Dependent Epigenetic Crosstalk Maintains Ground-State Pluripotency. *Cell Stem Cell* *24*, 123-137.e128.
- Voigt, P., Leroy, G., Drury, W.J., Zee, B.M., Son, J., and Beck, D.B. (2012). Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell* *151*.

- Voigt, P., Tee, W.-W., and Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes & Development* *27*, 1318-1338.
- Volarevic, V., Markovic, B.S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., and Stojkovic, M. (2018). Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci* *15*, 36-45.
- Voncken, J.W., Roelen, B.A., Roefs, M., de Vries, S., Verhoeven, E., Marino, S., Deschamps, J., and van Lohuizen, M. (2003). Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2468-2473.
- Wang, H., Zhang, K., Liu, Y., Fu, Y., Gao, S., Gong, P., Wang, H., Zhou, Z., Zeng, M., Wu, Z., *et al.* (2017a). Telomere heterogeneity linked to metabolism and pluripotency state revealed by simultaneous analysis of telomere length and RNA-seq in the same human embryonic stem cell. *BMC biology* *15*, 114.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., and Orkin, S.H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* *444*, 364-368.
- Wang, R., Taylor, A.B., Leal, B.Z., Chadwell, L.V., Ilangoan, U., Robinson, A.K., Schirf, V., Hart, P.J., Lafer, E.M., Demeler, B., *et al.* (2010). Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. *Structure (London, England : 1993)* *18*, 966-975.
- Wang, X., Paucek, R.D., Gooding, A.R., Brown, Z.Z., Ge, E.J., Muir, T.W., and Cech, T.R. (2017b). Molecular analysis of PRC2 recruitment to DNA in chromatin and its inhibition by RNA. *Nature Structural & Molecular Biology*.
- Wang, X.Q., Lo, C.M., Chen, L., Ngan, E.S., Xu, A., and Poon, R.Y. (2017c). CDK1-PDK1-PI3K/Akt signaling pathway regulates embryonic and induced pluripotency. *Cell death and differentiation* *24*, 38-48.
- Ware, C.B., Nelson, A.M., Mecham, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E.C., Jimenez-Caliani, A.J., Deng, X., Cavanaugh, C., Cook, S., *et al.* (2014). Derivation of naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 4484.
- Weber, C.M., Hafner, A., Kirkland, J.G., Braun, S.M.G., Stanton, B.Z., Boettiger, A.N., and Crabtree, G.R. (2021). mSWI/SNF promotes Polycomb repression both directly and through genome-wide redistribution. *Nature Structural & Molecular Biology* *28*, 501-511.
- Wei, Y., Chen, Y.H., Li, L.Y., Lang, J., Yeh, S.P., Shi, B., Yang, C.C., Yang, J.Y., Lin, C.Y., Lai, C.C., *et al.* (2011). CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat Cell Biol* *13*, 87-94.
- White, J., and Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews* *1*, 131-138.
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R.A., Sasaki, H., and Ralston, A. (2014). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet* *10*, e1004618.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684-687.
- Windhager, L., Bonfert, T., Burger, K., Ruzsics, Z., Krebs, S., Kaufmann, S., Malterer, G., L'Hernault, A., Schilhabel, M., Schreiber, S., *et al.* (2012). Ultrashort and progressive 4sU-tagging reveals key characteristics of RNA processing at nucleotide resolution. *Genome Research* *22*, 2031-2042.

- Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nature Cell Biology* *13*, 838-845.
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., and Sun, Y.E. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* *329*, 444-448.
- Wu, S.C., and Zhang, Y. (2011). Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. *J Biol Chem* *286*, 28511-28519.
- Yap, D.B., Chu, J., Berg, T., Schapira, M., Cheng, S.W., Moradian, A., Morin, R.D., Mungall, A.J., Meissner, B., Boyle, M., *et al.* (2011). Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* *117*, 2451-2459.
- Yarden, A., and Geiger, B. (1996). Zebrafish cyclin E regulation during early embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *206*, 1-11.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519-523.
- Young, M.D., Willson, T.A., Wakefield, M.J., Trounson, E., Hilton, D.J., and Blewitt, M.E. (2011). ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* *39*.
- Young, Richard A. (2011). Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell* *144*, 940-954.
- Yu, L., Wei, Y., Duan, J., Schmitz, D.A., Sakurai, M., Wang, L., Wang, K., Zhao, S., Hon, G.C., and Wu, J. (2021). Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature* *591*, 620-626.
- Yuan, P., Han, J., Guo, G., Orlov, Y.L., Huss, M., Loh, Y.-H., Yaw, L.-P., Robson, P., Lim, B., and Ng, H.-H. (2009). Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes & Development* *23*, 2507-2520.
- Yuan, W., Xu, M., Huang, C., Liu, N., Chen, S., and Zhu, B. (2011). H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J Biol Chem* *286*.
- Zeng, S., Liu, L., Sun, Y., Xie, P., Hu, L., Yuan, D., Chen, D., Ouyang, Q., Lin, G., and Lu, G. (2014). Telomerase-mediated telomere elongation from human blastocysts to embryonic stem cells. *J Cell Sci* *127*, 752-762.
- Zepeda-Martinez, J.A., Pribitzer, C., Wang, J., Bsteh, D., Golumbeanu, S., Zhao, Q., Burkard, T.R., Reichholf, B., Rhie, S.K., Jude, J., *et al.* (2020). Parallel PRC2/cPRC1 and vPRC1 pathways silence lineage-specific genes and maintain self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Science Advances* *6*, eaax5692.
- Zhang, Q., McKenzie, N.J., Warneford-Thomson, R., Gail, E.H., Flanigan, S.F., Owen, B.M., Lauman, R., Levina, V., Garcia, B.A., Schittenhelm, R.B., *et al.* (2019). RNA exploits an exposed regulatory site to inhibit the enzymatic activity of PRC2. *Nature Structural & Molecular Biology* *26*, 237-247.
- Zhang, W.W., Zhang, X.J., Liu, H.X., Chen, J., Ren, Y.H., Huang, D.G., Zou, X.H., and Xiao, W. (2011). Cdk1 is required for the self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Journal of cellular biochemistry* *112*, 942-948.

Zhang, X., Neganova, I., Przyborski, S., Yang, C., Cooke, M., Atkinson, S.P., Anyfantis, G., Fenyk, S., Keith, W.N., Hoare, S.F., *et al.* (2009). A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J Cell Biol* *184*, 67-82.

Zhao, W., Liu, M., Ji, H., Zhu, Y., Wang, C., Huang, Y., Ma, X., Xing, G., Xia, Y., Jiang, Q., *et al.* (2018). The polycomb group protein Yaf2 regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* *293*, 12793-12804.

Zhao, X.D., Han, X., Chew, J.L., Liu, J., Chiu, K.P., Choo, A., Orlov, Y.L., Sung, W.K., Shahab, A., Kuznetsov, V.A., *et al.* (2007). Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *1*, 286-298.

Zimmerlin, L., Park, T.S., Huo, J.S., Verma, K., Pather, S.R., Talbot, C.C., Jr., Agarwal, J., Stepan, D., Zhang, Y.W., Considine, M., *et al.* (2016). Tankyrase inhibition promotes a stable human naïve pluripotent state with improved functionality. *Development* *143*, 4368-4380.