Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Departamento de Química Biológica

Relevancia de la SUMOilación de Akt en células madre embrionarias: establecimiento del modelo experimental y análisis del efecto sobre la expresión del factor de transcripción Nanog

Marcos Gabriel Francia

Trabajo de tesis para optar al título de
Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Directora: Dra. Alejandra Sonia Guberman

Directora Asistente: Lic. María Soledad Cosentino

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en Células Madre, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN, CONICET.

Buenos Aires, Noviembre 2017

No importa lo lento que vayas mientras no te detengas.

Confucio (551 a.C.-479 a.C.)

Agradecimientos

¡Cuánto por agradecer!

En primer lugar, infinitas gracias a mis viejos.

Gracias a mi mamá, Lucia, por apoyarme siempre en todas mis decisiones y en todas mis ocurrencias. ¡Si te habré hecho renegar de chico desarmando todo y "descubriendo" de que estaban hechas las cosas de mi casa ("rompiendo todo", según vos)! Gracias por tu infinito amor y paciencia. Gracias por estos 25 años de haberme dado todo lo mejor que estuvo a tu alcance. Y con respecto a la carrera, Gracias por haberme bancado en estos últimos 7 años día a día en todos mis diferentes estados de ánimo durante los infinitos días y noches de estudio. Gracias por hacerme el café todas las mañanas, sea la hora que sea y gracias por esperarme con un plato de comida caliente, también a cualquier hora. Sin vos, literalmente nada de esto hubiese existido. ¡Gracias má!

Gracias a mi primer papá, Horacio, por haberme dado la vida y haber compartido conmigo el tiempo que pudiste. Sé que me estas cuidando y aconsejando desde el más allá.

Gracias a mi segundo papá, Pedro, por adoptarme y brindarme dos hermanos, Javi y Ceci. Gracias por haberme bancado todos estos años y haber estado siempre para nosotros.

Gracias a mi abuela, Lola, y a mi tío Marcelo, por haberme ayudado siempre que los necesité. ¡Gracias por haberme esperado todas esas noches cuando llegaba tarde! Y gracias al resto de mi familia por haberme apoyado en ser el primer universitario de la familia.

Gracias a mis amigos de toda la vida Fede, Karu, Marian y Sara por tantos años de amistad incondicional. Gracias por su apoyo de todos estos años y por haber entendido cuando no podía juntarme porque rendía al otro día.

Gracias a mis profesores de ciencias naturales de la primaria y secundaria, y en especial, a mi profe de biología, Verónica Tello. Gracias Vero por haberme prestado ese microscopio aquel fin de semana de mi último año de polimodal. Me enseñaste un mundo microscópico que nunca hubiese podido descubrir solo… y del cual me enamoré.

Gracias a mi segunda casa, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que me formó en estos 7 años y me seguirá formando en los próximos. Gracias a todos los profesores, JTPs y ayudantes, sin ellos nada de esto hubiera ocurrido. Pero, por sobre todo, Gracias FCEN por hacer posible que en este camino me encontrara con personas increíbles.

Gracias a mis amigos de la facu Lau, Nico, Agus, Marian, Javi, Caro y Facu. Gracias por tantas horas de cursadas, estudio, charlas, risas, llantos, almuerzos, meriendas y salidas. Estos años definitivamente hubiesen sido muy aburridos sin ustedes.

Gracias a mi Quiti por bancarme en todo y ser mi compañía mientras escribía esta tesis.

Gracias al Laboratorio de Regulación Génica de Células Madre, alias “el labo”.

Gracias Ale por ser la jefa que sos. Gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu grupo. Gracias por ser parte de mi formación, tanto desde la parte académica como humana.

Gracias Sole, mi co-directora, por tu dedicación y tu infinita paciencia en este tiempo.

Miles de Gracias al resto de los gubis: Clau, Cami, Vicky, Aye, Pau, Camilita, Jesi y Ari. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme. Gracias por la buena onda de todos los días y por hacer que nuestro labo sea el más copado de todos.

Gracias al Departamento de Química Biológica y a todos los que trabajan en él por hacer de este departamento un lugar ameno y solidario.

Gracias a Anabella Srebrow y Guillermo Risso por proveernos las construcciones de Akt utilizadas en este trabajo.

Gracias a Mara Rosenzvit y a su equipo por responder a nuestro pedido.

Gracias al Laboratorio de Oncología Molecular por proveernos el anticuerpo, sin el cual realmente no podríamos haber hecho la mayor parte de este trabajo.

Gracias al Ministerio de Educación por la Beca Bicentenario durante los 7 años de mi carrera. Gracias al Anses por el Plan Progresar.

Gracias a la Universidad de Buenos Aires por el soporte institucional y en especial por la Beca Estímulo UBACyT. Estoy sumamente orgulloso de pertenecer a esta casa de estudios.

Gracias a CONICET por la financiación a nuestro laboratorio.

Por último, Gracias a todos los argentinos, incluso a aquellos que no han podido pisar una universidad, por financiar una educación pública, gratuita y de calidad.

Una vez más ¡¡¡Gracias!!!

Without stem cells, wounds would never heal, your skin and blood could not continually renew themselves, fertilized eggs would not grow into babies, and babies would not grow into adults. […] They are the body's silent reserves

Sin células madre, nuestras heridas nunca sanarían, nuestra piel y nuestra sangre no podrían renovarse constantemente, los óvulos fertilizados no se desarrollarían ni formarían bebés, y los bebés no se convertirían en adultos […] Ellas son las reservas silenciosas de nuestro cuerpo.

Nature.com

Resumen

Relevancia de la SUMOilación de Akt en células madre embrionarias: establecimiento del modelo experimental y análisis del efecto sobre la expresión del factor de transcripción Nanog

Las células madre embrionarias (CME) son células derivadas del macizo celular interno del blastocisto de mamíferos. Poseen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente en cultivo en condiciones adecuadas y pueden dar origen a células derivadas de las tres capas germinales, propiedad conocida como pluripotencia.

Existen tres factores de transcripción fundamentales para la regulación génica de las células madre pluripotentes, Oct4, Sox2 y Nanog, que actúan como el núcleo de una red regulatoria modulando la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación celular. La vía PI3K/Akt es clave en el mantenimiento de los niveles y actividad de estos factores de transcripción y por lo tanto en el mantenimiento de las células en su estado indiferenciado. El efector de esta vía, la enzima Akt posee varias isoformas y se encuentra ampliamente descripta en la bibliografía. Particularmente, la sobreexpresión de mutantes constitutivamente activas de la isoforma Akt1 es suficiente para el mantenimiento de la pluripotencia en CME.

Se conocen varios eventos de modificación post-traduccional que están involucrados en la modulación de la actividad de Akt. Particularmente se ha descripto en los últimos años que la SUMOilación, unión covalente de una pequeña cadena aminoacídica llamada SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), tiene un rol crítico en la regulación de la actividad quinasa de la isoforma Akt1, con consecuencias en el patrón de splicing, la proliferación y el ciclo celular de diferentes tipos celulares. A partir de estos antecedentes, hipotetizamos que la SUMOilación de Akt es relevante para mantener las propiedades fundamentales de CME y está involucrada en su supervivencia y proliferación.

En este trabajo de tesis, estudiamos el efecto de esta modificación post-traduccional de Akt1 en la regulación de la expresión del factor de transcripción fundamental en CME, Nanog. En primer lugar, estudiamos el efecto sobre la actividad del promotor de Nanog mediante co-transfección de vectores de expresión de variantes de Akt1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas junto con un vector reportero del sistema Luciferasa controlado por el promotor de Nanog. Encontramos una actividad diferencial de este promotor dependiendo del nivel de SUMOilación de Akt1, donde una mayor SUMOilación de Akt1 genera un aumento en la actividad de dicho promotor. Posteriormente, mediante inmunofluorescencia, estudiamos el efecto de la transfección de estas variantes sobre los niveles endógenos de la proteína Nanog. Según resultados preliminares, en las células transfectadas con las variantes de Akt1 cuya SUMOilación es normal o aumentada (wt y E17K), los niveles de Nanog son mayores que en las células sin transfectar. Contrariamente, las células transfectadas con las variantes 2KR o E17K/2KR, cuya SUMOilación se encuentra

disminuida, presentan los niveles de Nanog similares a las células sin transfectar. Estos resultados sugirieren que esta modificación post-traduccional de Akt1 podría modular la expresión de Nanog en CME.

Por otro lado, para determinar la relevancia de la SUMOilación de Akt1 en la regulación de la proliferación y supervivencia, evaluamos diferentes condiciones para inducir apoptosis en nuestro sistema y pusimos a punto diferentes técnicas para estudiar este proceso. El cultivo de CME en ausencia de la citoquina LIF y de los inhibidores "2i" por un período de hasta 4 días resultó ser una buena condición para inducir apoptosis, detectada tanto por la técnica de *DNA Ladder*, como por clivaje de PARP-1 y Caspasa 3 mediante Western Blot.

En este trabajo nos propusimos estudiar un proceso cuya relevancia en células madre embrionarias aún se desconoce. A su vez, iniciamos una nueva línea de investigación que planeamos continuar a partir de la puesta a punto de los diseños experimentales presentados y de los resultados generados. Esperamos que este proyecto contribuya al conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en los procesos básicos de las CME, fundamentales para su futura aplicación en el área de la medicina regenerativa.

Trabajos publicados

Parte de los contenidos de este trabajo de tesis de licenciatura serán presentados en las siguientes reuniones científicas:

1. **RELEVANCE OF AKT SUMOYLATION IN MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS**
   Francia, M.; Cosentino, S.; Vazquez Echegaray, C.; Toro, A., Solari, C.; Petrone, MV.; Waisman, A.; Barañao, L.; Srebrow, A., Guberman, A.
   LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).
   Lugar y fecha: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Noviembre 2017.

2. **Relevancia de la SUMOilación de Akt en células madre embrionarias**
   Francia, M.; Cosentino, S.; Vazquez Echegaray, C.; Toro, A., Solari, C.; Petrone, MV.; Waisman, A.; Barañao, L.; Srebrow, A., Guberman, A.
   Jornadas Interdisciplinarias de Química Biológica 2017
   Lugar y fecha: Facultad de ciencias exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires. Diciembre 2017.

Índice

AGRADECIMIENTOS **3**

RESUMEN **6**

TRABAJOS PUBLICADOS **8**

ABREVIATURAS **11**

INTRODUCCIÓN **13**

CÉLULAS MADRE 14

Origen y clasificación de las células madre *14*

CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES EMBRIONARIAS DE RATÓN 18

Bases moleculares del mantenimiento de la pluripotencia *18*

Mantenimiento de la pluripotencia in vitro *24*

LA QUINASA DE SERINAS/TREONINAS AKT 25

CONJUGACIÓN A SUMO 26

SUMOilación de Akt *27*

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **29**

MATERIALES Y MÉTODOS **31**

CULTIVO CELULAR 32

Propagación y mantenimiento del stock celular *32*

Cálculo de células en cámara de Neubauer *33*

Congelamiento y descongelamiento de células *33*

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA 34

Transfección transitoria con PEI *34*

Ensayo de actividad de Luciferasa *35*

Curva de sensibilidad al antibiótico Blasticidina *36*

SUPERVIVENCIA, VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS 36

Detección de fragmentación de ADN mediante electroforesis (Técnica de DNA Ladder) *36*

Ensayo de Cristal Violeta *37*

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS 37

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida *37*

Ensayo de Western Blot *38*

Inmunofluorescencia *39*

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS 40

Transformación de bacterias: método de Golpe de calor *40*

Purificación de ADN plasmídico *41*

Cuantificación de muestras de ADN *42*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 42

SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS 43

RESULTADOS **47**
PRIMERA PARTE: PREPARACIÓN DE LOS VECTORES, DETECCIÓN DE SU EXPRESIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL 48
Preparación de los vectores de las diferentes variantes de Akt *48*
Detección de la expresión de las variantes de Akt1 ..... *49*
Diseño experimental para ensayos de expresión génica *52*
SEGUNDA PARTE: EFECTO DE LA SUMOILACIÓN DE AKT1 SOBRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FUNDAMENTAL NANOG 54
Efecto sobre el promotor de Nanog *54*
Efecto sobre los niveles endógenos de proteína de Nanog *56*
Efecto sobre los niveles endógenos del ARN mensajero de Nanog *62*
TERCERA PARTE: INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DEL PROCESO DE APOPTOSIS EN CME 68
DISCUSIÓN **72**
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **78**

Abreviaturas

2i inhibidores de la quinasas MEK (PD 0325901) y GSK3 (CHIR 99021)

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AKT Quinasa de proteinas B ó PKB

ARN Ácido Ribonucleico

ARNm ARN mensajero

ATP Adenosina trifosfato

BMP Proteína Morfogénica del Hueso

CHO Células de ovario de hámster chino

CM Células Madre

CME Células Madre Embrionarias

CMP Células Madre Pluripotentes

CMPI Células Madre Pluripotentes Inducidas

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO DimetilSulfóxido

dNTP Nucleótido de ADN

DTT Ditiotreitol

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

FT Factor de Transcripción

GAPDH Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa

H2Odest Agua destilada

H2OmQ Agua Milli Q

HA Etiqueta hematoglutinina de gripe humana

LIF Factor Inhibidor de Leucemia

LIFR Receptor de LIF

Luc Luciferasa

MCI Macizo Celular Interno

MEF Fibroblastos Embrionarios Murinos

MP Medio de propagación

MW Placa de pocillos multiple

ON Over night

PBS Buffer Fosfato Salino

PEI Polietilenimina

PKB Quinasa de proteinas B ó AKT

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNAsa Ribonucleasa

RT-PCR Retrotranscripción seguida de PCR

RT-qPCR Retrotranscripción seguida de qPCR

SEM Error estándar de la media

SDS Dodecil Sulfato de Sodio

SFB Suero Fetal Bovino

STAT3 Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3

TA Temperatura ambiente

Introducción

Células madre

Las *células madre* (CM) son aquellas células que, en un organismo adulto o en desarrollo, poseen simultáneamente dos propiedades fundamentales: la de auto-renovación y la de diferenciación[1]. La auto-renovación es la capacidad de propagarse ilimitadamente mediante sucesivas divisiones celulares de tipo simétricas, que dan lugar a dos células hijas iguales entre sí e iguales a la célula progenitora. Por otro lado, la capacidad de diferenciación, permite a las CM diferenciarse mediante un cambio fenotípico, en un tipo celular más especializado que cumple una determinada función. Existen distintos tipos de CM que se encuentran en diferentes estadios de la vida de un organismo y que discutiremos a continuación. Debido a las características mencionadas, hoy en día las CM son una gran promesa en el área de la medicina regenerativa por ser una fuente ilimitada de células potencialmente diferenciables a diferentes tipos celulares de acuerdo a la necesidad del investigador, médico o paciente.

Origen y clasificación de las células madre

Como mencionamos anteriormente, existen diferentes tipos de CM, las cuales pueden clasificarse principalmente según su origen y su potencial de diferenciación. Esto se refiere al estadio embrionario en el cual se las encuentra o se las aísla y a su capacidad de diferenciarse en pocos o muchos tipos celulares específicos.

Según su origen, las CM pueden ser clasificadas en dos grandes grupos, en *células madre embrionarias* (CME) o en *células madre adultas*[2]. Las CME son células derivadas de estadios muy tempranos en el desarrollo y pueden ser diferenciadas a todos los tipos celulares del organismo. Por otro lado, las células madre adultas se encuentran en tejidos de organismos ya desarrollados y en general son capaces de diferenciarse solo en un rango limitado de tipos celulares. Estas CM están asociadas con la renovación de los tejidos por su normal deterioro, como también con la reparación del mismo frente a un daño.

Según su potencial de diferenciación, las CM pueden clasificarse en *totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes*[2,3].

Las *células madre totipotentes* son aquellas capaces de dar origen a todos los tipos celulares de un organismo incluidos los anexos extraembrionarios. El cigoto, célula formada por la unión del oocito y el espermatozoide en el evento de la fecundación, es por excelencia ejemplo de totipotencia[4]. Algunos autores también consideran totipotentes a los primeros blastómeros, células que surgen a partir de las primeras divisiones celulares del cigoto[5]. Tanto el cigoto como los blastómeros hasta la segunda o tercer división celular, pueden potencialmente dar origen a todos los tipos celulares y anexos extraembrionarios de un organismo en desarrollo, pero solo el cigoto tiene además la arquitectura necesaria para

formar un embrión completo[4]. A medida que transcurre el desarrollo, las células del embrión continúan diferenciándose y se comprometen hacia un linaje particular, perdiendo su capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares (*Figura 1*). Cabe destacar que dado que las células madre totipotentes se encuentran los estadios tempranos del desarrollo, podrían ser consideradas como un tipo de CME. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido establecer en cultivo indefinido, una línea celular de CM totipotentes[1]. Por este motivo, el término CME se utiliza en general para describir el tipo de CM pluripotentes presentado a continuación, del cual se ha logrado derivar con éxito cultivos *in vitro*.

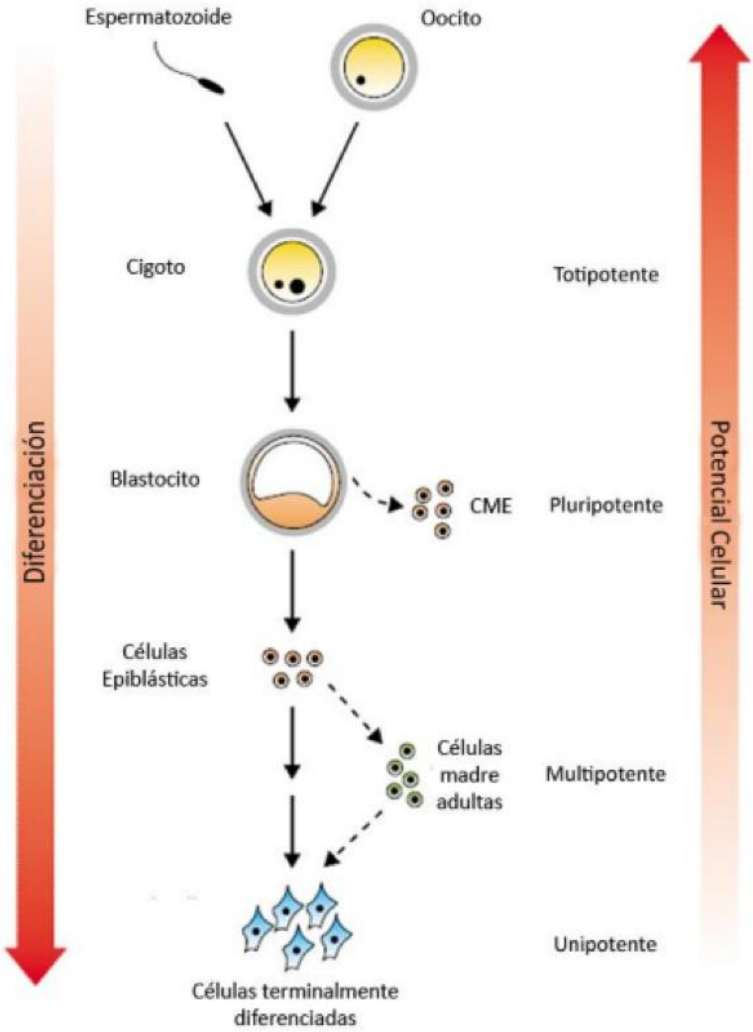


Figura 1: Estadios de la diferenciación celular versus el potencial para diferenciarse. Extraído y adaptado de Hochedlinger & Jaenisch[6].

Las *células madre pluripotentes* (CMP) son aquellas capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales, ectodermo, endodermo y

mesodermo, pero no son capaces de dar origen a todos los anexos extraembrionarios[2]. Estas células están un grado más abajo en la escala de potencial de diferenciación, es decir, se encuentran en un grado mayor de compromiso celular en comparación con las totipotentes. Luego de sucesivas divisiones de los blastómeros, el embrión se encuentra en una forma esférica maciza llamada mórula. La mórula es un estadio breve, debido a que en su interior rápidamente comienza el proceso de cavitación en el que se forma una cavidad interna llamado blastocele. Este proceso da origen a una estructura denominada blastocisto. Las CMP embrionarias, o simplemente CME, son clásicamente derivadas a partir de una de las dos regiones diferenciables del blastocisto, llamada macizo celular interno[7] (*Figura 2*). El otro tipo celular, las células del trofoectodermo, se encuentran alrededor de esta estructura y son las que en estadios posteriores en el desarrollo darán lugar únicamente a tejidos extraembrionarios. Debido a los nuevos avances, hoy en día existe otro tipo de CMP no embrionarias, las cuales se obtienen mediante la manipulación de la expresión génica de células terminalmente diferenciadas. En 2006, Shinya Yamanaka logró reprogramar células murinas terminalmente diferenciadas a un estadio pluripotente similar al de las CME, a partir de la expresión forzada de cuatro factores de transcripción. Estas células son llamadas *células madre pluripotentes inducidas*[8] (CMPI). Un año después, se obtuvieron resultados similares a partir de fibroblastos humanos, generando así nuevas perspectivas en la futura aplicación de células madre pluripotentes en terapias regenerativas. Estos logros, basados en los experimentos originales de clonación por transferencia nuclear de J. Gurdon de los años 60, dejaron atrás el antiguo dogma de la biología del desarrollo que indicaba que una célula diferenciada no era capaz de volver a un estadio de desarrollo anterior.

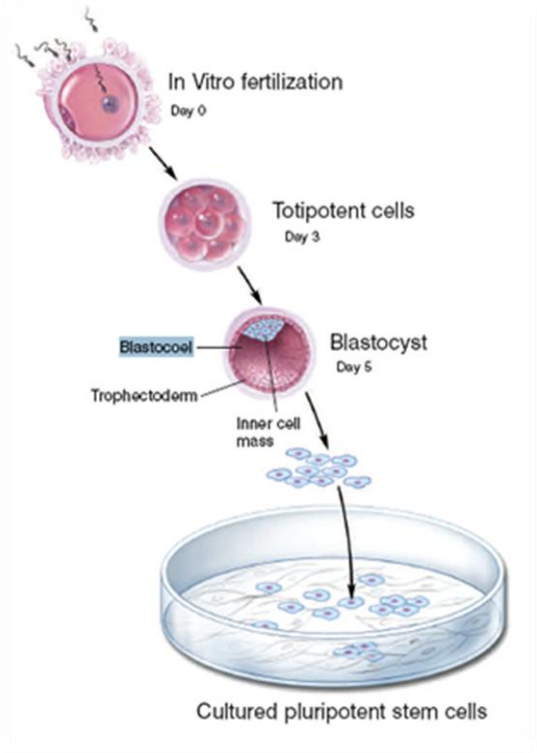
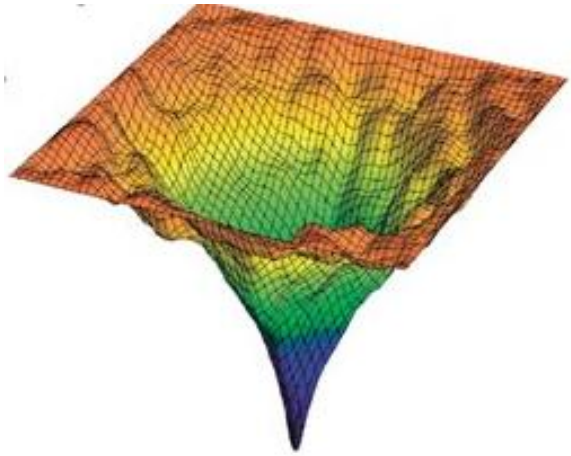


Figura 2: Obtención de células madre pluripotentes embrionarias. Adaptado de Yu & Thompson[9], ilustración original de Terese Winslow.

Por otro lado, tanto las *células madre multipotentes* como las *unipotentes* se encuentran presentes en el organismo adulto[3]. Ambas son células madre adultas y son las responsables de la renovación de los tejidos que se van deteriorando normalmente a lo largo del tiempo, como también de la reparación de ciertos daños que los tejidos puedan sufrir durante la vida del organismo. Las CM multipotentes son células más comprometidas en la diferenciación y solo son capaces de dar origen a un rango limitado de tipos celulares. El ejemplo clásico de este tipo celular en un mamífero adulto es el de las CM hematopoyéticas, presentes en la médula ósea. Estas células son capaces de renovarse constantemente durante toda la vida del organismo y además, de diferenciarse en diferentes linajes de células sanguíneas. Por último, las CM unipotentes están en la base del potencial de diferenciación y son precursoras de un solo tipo celular terminalmente diferenciado. Un ejemplo claro de este tipo de CM son los hepatoblastos, presentes en el hígado adulto, los cuales solo pueden generar hepatocitos.

En general, una célula terminalmente diferenciada permanece como tal toda su vida y en condiciones normales no puede volver para atrás en el proceso de diferenciación. Durante este proceso las células se van especializando en una función determinada y a su vez, pierden la capacidad proliferativa. Podríamos pensar a este proceso como un embudo de energía potencial de diferenciación, en donde en las capas superiores se encuentran las células en estados más indiferenciados, mientras que en la base del embudo se encuentran aquellas con una función más especializada (Figura 3). Si bien no es fácil, naturalmente ocurren reversiones hacia estadios celulares más indiferenciados, ascendiendo en el embudo de potencial de diferenciación, pero esta condición lleva a patologías como el cáncer. En el laboratorio, hoy en día también se puede volver a atrás en la diferenciación, es decir, reprogramar células diferenciadas, como en el caso de la CMPI.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 3: Embudo de potencial de diferenciación.

Células madre pluripotentes embrionarias de ratón

El establecimiento *in vitro* de la primer línea de células madre pluripotentes embrionarias de ratón (CMEm) fue logrado por primera vez en 1981[10,11]. Las mismas fueron derivadas del macizo celular interno de blastocistos de ratón y en trabajos posteriores a partir de blastocistos humanos[12]. El cultivo de CMEm desde el inicio presentó varios problemas, siendo el más importante la dificultad del mantenimiento de las células en su estado pluripotente o indiferenciado. Los primeros reportes indicaban que estas células mantenían sus características de proliferación y pluripotencia si eran cultivadas sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por su sigla en inglés) o en medio de cultivo condicionado de líneas de teratocarcinoma (tumor embrionario). En estas condiciones, las CMEm podían propagarse indefinidamente, manteniendo su capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares. Además, se encontró que podían contribuir a diferentes linajes celulares si eran inyectadas nuevamente en blastocistos de ratón, formando quimeras[13]. A partir de la necesidad de tener una capa de células MEF, las cuales mantenían las propiedades fundamentales de las CMEm, diferentes grupos comenzaron a investigar los componentes que esta capa de células proporcionaba al medio de cultivo. Se encontró que las MEF secretaban una molécula llamada *factor inhibidor de la leucemia* (LIF, por su sigla en inglés), cuya presencia en el medio era condición suficiente para inhibir la diferenciación espontanea de las CMEm[14,15]. Este descubrimiento determinó una mejora clave en el cultivo de las CMEm y a su vez, abrió la puerta de un largo camino para el estudio de las bases genéticas y moleculares del mantenimiento del estado pluripotente de CME, tema que abordaremos en la siguiente sección.

Aunque su cultivo no es sencillo, las CMEm son utilizadas ampliamente como sistema modelo para el estudio tanto del desarrollo embrionario de mamíferos, como de los procesos de diferenciación celular, la organogénesis, y para la evaluación de fármacos, entre otras aplicaciones. El gran potencial de este sistema es su futura aplicación en el área de la medicina regenerativa y el tratamiento de diferentes patologías que implican la necesidad de reemplazo de ciertos tejidos que se podrían obtener a partir de CMP[16]. El estudio de las bases moleculares que gobiernan tanto el estado indiferenciado como el proceso de diferenciación, como la mejora en las condiciones de cultivo en ambos estados, son de suma importancia para su futura aplicación. Por estos motivos, en el presente trabajo utilizamos CMEm como sistema de estudio.

Bases moleculares del mantenimiento de la pluripotencia

Dos décadas luego del primer reporte del cultivo exitoso *in vitro* de CMEm, se descubrió que el factor LIF, secretado por la capa de células soporte MEF, es esencial para el mantenimiento de las propiedades fundamentales en cultivo. Posteriormente se descubrió

que la proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4) también juega un papel crítico en el mantenimiento de la pluripotencia[17]. Originalmente, este factor era suplementado a través del suero fetal utilizado en el medio de cultivo, aunque se desconocía su presencia en él. Tanto la citoquina LIF como BMP4 son necesarios y suficientes para el cultivo indiferenciado de CMEm en medio de cultivo libre de suero. Estos factores actúan induciendo principalmente la activación de dos vías fundamentales, LIF activa la vía de STAT3[18] y BMP4 la de SMAD1[17]. Estos dos factores de transcripción (FT), una vez activados mediante fosforilación, se unen a las regiones promotoras de los genes Oct4, Sox2 y Nanog. Estos genes, cuyos productos también son FT, conforman el núcleo de una red regulatoria que modula la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación celular[19].

El factor de transcripción Oct4, codificado por el gen Pou5f1, es expresado tanto en células en estado totipotente, como en CME[20]. Este gen juega un papel crítico en el mantenimiento de la pluripotencia, y se demostró que embriones en los que ell gen Pou5f1 se encuentra *knockeado* no forman un macizo celular interno pluripotente, sino que las células solo se diferencian a trofoectodermo[21]. La disminución del ARN mensajero (ARNm) de Oct4 en un 50%, es suficiente para formar solo células del trofoectodermo, mientras que la sobreexpresión en un 50% promueve la diferenciación a endodermo y mesodermo[22].

Por otro lado, Sox2 es un factor de transcripción con sitio de unión al ADN del grupo de proteínas de *alta movilidad*[23]. Este gen es expresado en el macizo celular interno y en el ectodermo extraembrionario. De manera similar a lo que ocurre con Oct4, embriones con el gen Sox2 *knockeado* no son capaces de generar un macizo celular interno pluripotente y se diferencian principalmente a trofoectodermo[24]. Se cree que el fenotipo similar en los embriones Sox2 y Oct4 negativos se debe a la acción sinérgica en la regulación de la expresión de diferentes genes específicos de CMEm, incluido ellos mismos[25] (Figura 4).

Nanog, el tercer miembro de este núcleo de FT, fue descubierto por su capacidad de mantener la propiedad de auto-renovación de CMEm incluso en ausencia de LIF[26]. Si bien embriones con el gen de Nanog *knockeado* no puedan generar un macizo celular interno pluripotente, es posible mantener CMEm pluripotentes en cultivo si Nanog es anulado luego de generar la línea *in vitro*. Se cree que Nanog es necesario para la adquisición de pluripotencia, pero no es indispensable una vez que la pluripotencia es alcanzada[27].

Dada la importancia de este núcleo de regulación transcripcional en el establecimiento del destino de CMEm, se han mapeado sus sitios de unión al genoma y se encontraron tanto en sitios de transcripción activa, como silenciada[28]. Oct4, Sox2 y Nanog, mantienen las propiedades fundamentales de CM mediante la inducción de la expresión de otros genes asociados al estado pluripotente y a la proliferación, como también mediante la represión de genes de linajes celulares específicos. Por otro lado, activan su propia expresión génica mediante una red de interacción[29] mostrada en la Figura 4.

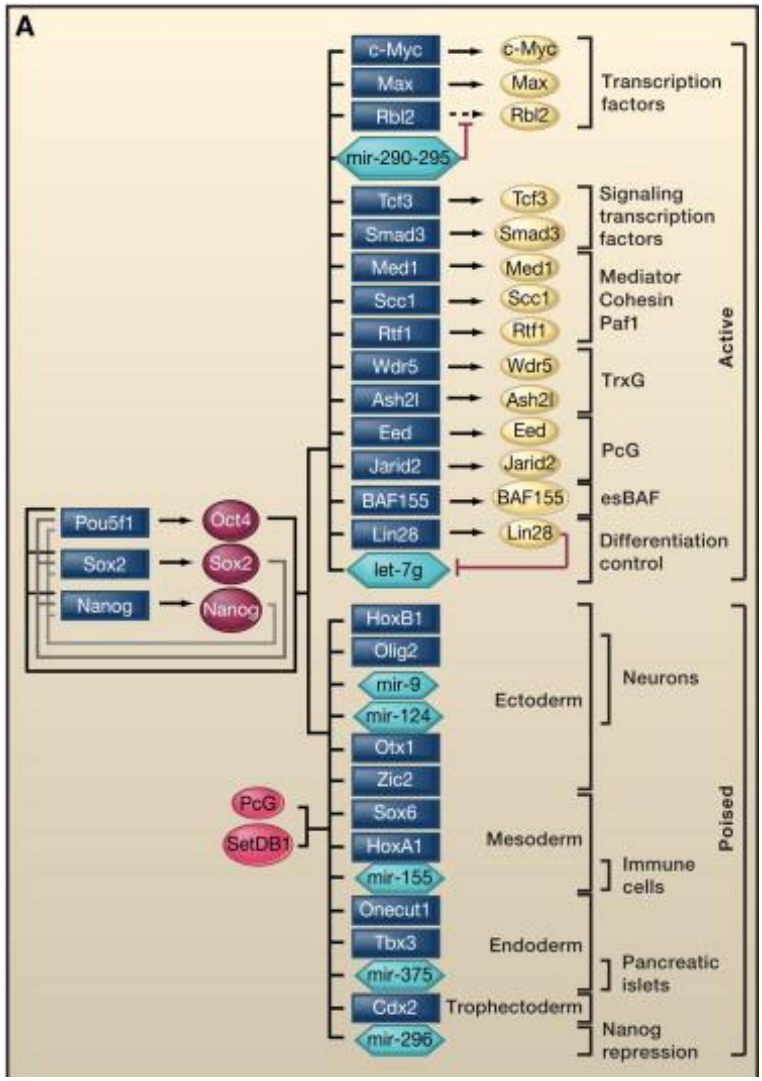


Figura 4: Red de regulación de la expresión génica de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog. Adaptado de Richard Young[30].

Señalización dependiente de BMP4

El factor BMP4 está implicado en la auto-renovación de CMEm en cultivo en conjunto con LIF[17]. La señal de BMP4 es mediada por los factores SMAD1, 5 y 8, los cuales terminan induciendo la expresión de los genes llamados Inhibidores de la diferenciación 1 y 3[31]. La sobreexpresión de estos genes, reemplazan en función a BMP4, pero no a LIF. Esto sugiere que las cascadas de señalización modulan la expresión génica de diferentes genes blanco. Por otro lado, la cascada de señalización de BMP4 reprime la actividad de ERK, lo que contribuye a mantener la auto-renovación de CMEm[32].

Señalización dependiente de LIF

El factor LIF, perteneciente a la familia de citoquinas IL-6, posee un receptor heterodimérico en CMEm. Este receptor está constituido por el receptor de LIF (LIFR) y la glicoproteína 130 (GP130), el cual es el transductor de la señal de la familia IL-6. A partir de la unión del LIF con su receptor, se activan específicamente tres vías de señalización[33]: la vía JAK/STAT3, la vía de SHP2/MAPK, y particularmente la vía de Pi3K/Akt, en la que nos centraremos en este trabajo.

La vía JAK/STAT3

La vía JAK (quinasa de Janus)/STAT3 (transductor de la señal y activador de la transcripción 3) es una de las vías de transducción de señales más estudiadas. Debido a que la activación de STAT3 es condición suficiente para mantener la auto-renovación en CMEm, su rol en este proceso es ampliamente aceptado[34].

La unión de LIF con su receptor LIFR produce el reclutamiento de GP130, la cual produce la activación mediante transfosforilación de JAK. Una vez activada, JAK fosforila a GP130, creando un sitio afín a STAT3. La interacción de STAT3 con GP130 fosforilada, induce la fosforilación de STAT3 por JAK en cuatro residuos tirosina, incluida la tirosina 705, lo que produce la homodimerización de STAT3. Este homodímero es capaz de ser translocado al núcleo, donde se une a su sitio consenso en las regiones regulatorias de sus genes blanco (Figura 5).

La activación de STAT3 es necesaria y suficiente para el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia en CMEm cultivadas con suero fetal bovino en ausencia de una capa soporte de células MEF[18].

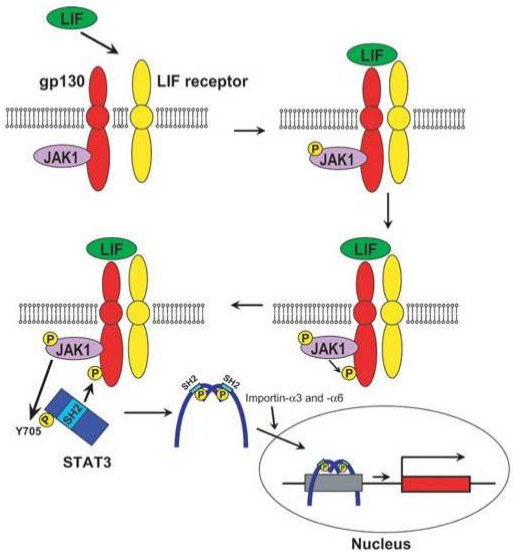


Figura 5: La vía de señalización LIF/JAK/STAT3. Extraído de Hirai et al[35].

La vía de SHP2/MAPK

La vía SHP2/MAPK es una de las vías dependientes de LIF menos estudiadas. Esta vía comienza con la transfosforilación de JAK seguido de la fosforilación de GP130, como la vía mencionada anteriormente. El factor SHP2 es recrutado y fosforilado por JAK, tal como sucede con STAT3. El complejo GRB2-SOS interactúa con SHP2 fosforilado y activa la vía de MAPK, involucrando la cascada de fosforilación de RAS/RAF/MEK/ERK[36] (Figura 6). Esta vía, a diferencia de las otras, promueve la diferenciación debido a que reprime la expresión de Nanog y Tbx3[37], un represor transcripcional involucrado en el mantenimiento del estado pluripotente. Se cree que mantener esta vía encendida facilita la salida del estado indiferenciado rápidamente en ausencia de LIF y por lo tanto, de las otras dos vías que mantienen el estado pluripotente más eficientemente[35].

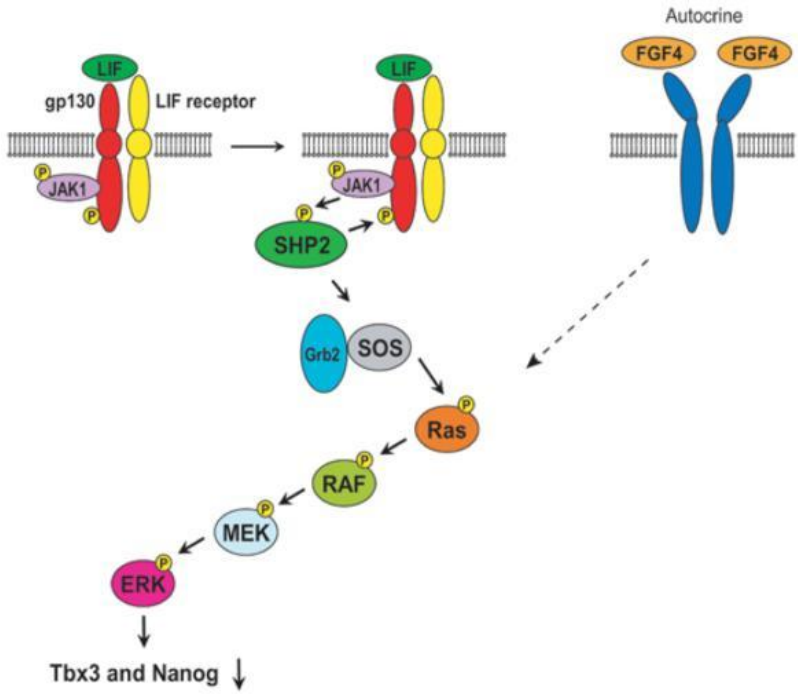


Figura 6: La vía de señalización LIF/SHP2/MAPK. Extraído de Hirai et al[35].

La vía Pi3K/Akt

Por último, como en las vías anteriores, JAK activa a PI3K vía fosforilación de su subunidad p85. Este evento termina activando a la quinasa de serinas/treoninas Akt[38]. Esta quinasa inhibe a la proteína GSK3ß por dos mecanismos diferentes, lo cual resulta en un aumento en los niveles de Nanog, Tbx3 y c-Myc[39], genes importantes en la auto-renovación de

CMEm. En primer lugar, Akt inactiva directamente a GSK3ß mediante fosforilación en su serina 9[40]. Por otro lado, Akt facilita la exportación del núcleo de GSK3ß independientemente de su fosforilación, evitando la interacción con sus proteínas blanco como c-Myc. GSK3ß promueve la degradación de c-Myc mediante su fosforilación y además inhibe la expresión de Nanog[41].

Esta vía, también induce la acetilación de ciertos residuos lisina de la proteína STAT3 mediante la acetiltransferasa p300/CBP o CREB, siendo este evento independiente de su fosforilación. Una vez acetilada, STAT3 forma dímeros más estables y transcribe genes de manera más activa sin la necesidad de la fosforilación en su tirosina 705[42]. Esto indica que LIF activa a STAT3 tanto mediante fosforilación, como por acetilación (Figura 7).

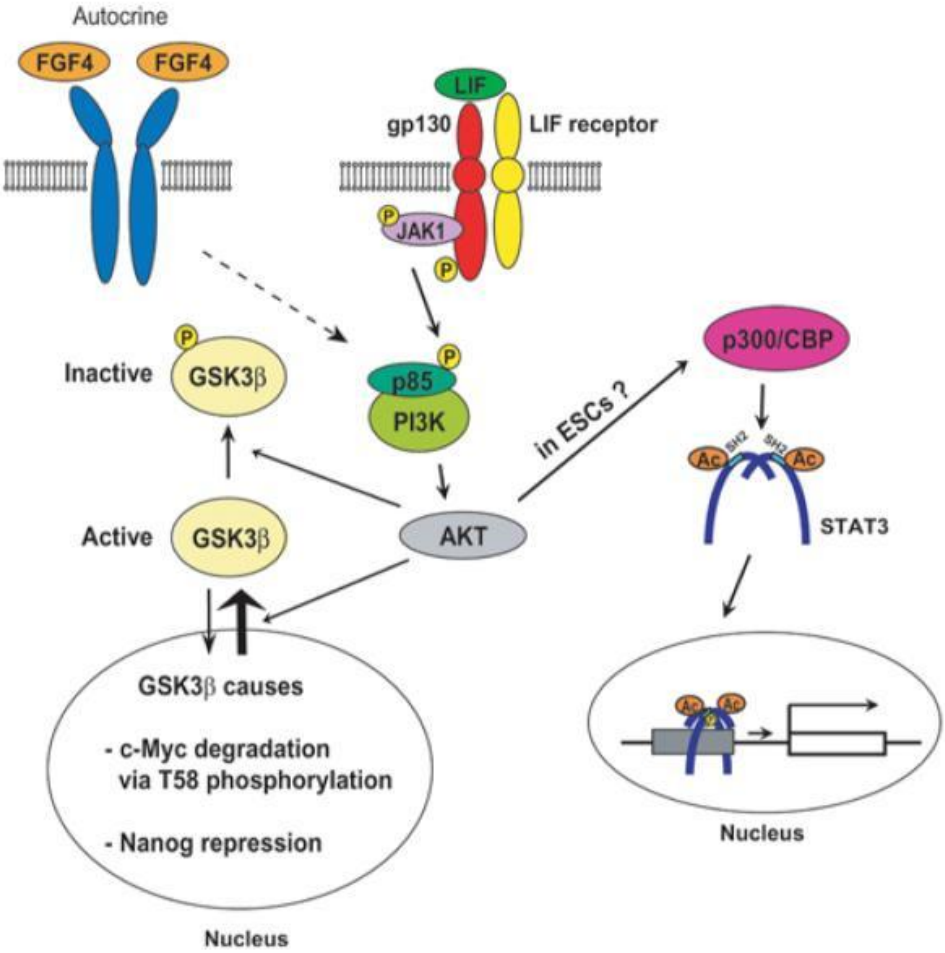


Figura 7: La vía de señalización LIF/PI3K/Akt. Extraído de Hirai et al[35].

En los últimos años, ha sido reportado que la activación de Akt, mediante la transfección con mutantes constitutivamente activas, es suficiente para el mantenimiento de las propiedades fundamentales en CMEm en ausencia de LIF[43]. Debido a la acetilación de STAT3 inducida por Akt, esta quinasa podría tener un papel importante en este proceso.

En CMEm, la vía PI3K/Akt a su vez puede ser activada por otros factores, como el FGF4, la insulina, IGF1, retinol, entre otros[35]. Si bien, estos factores pueden activar esta vía, no está demostrado que sean relevantes para la fosforilación de STAT3, y por ende, el mantenimiento de las propiedades fundamentales en CMEm[44].

A partir de estudios de inmunoprecipitación de la cromatina, se han encontrado los sitios de unión al genoma de STAT3 en CMEm. Se determinaron más de 2500 sitios, de los cuales más de 700 son compartidos con los FT fundamentales Oct4, Sox2 y Nanog[45]. Entre los genes blanco hallados, se encontraron tanto genes activos, como reprimidos, muchos de los cuales son marcadores de diferenciación a un linaje específico. Esto indica que STAT3 podría tener un papel en la prevención de la diferenciación, aunque su contribución no está del todo clara[17]. Entre estos sitios también se encuentran las regiones promotoras de Oct4 y Nanog, indicando que STAT3 está altamente integrado en la red que regula el estado pluripotente.

Mantenimiento de la pluripotencia *in vitro*

Hoy en día, las CMEm en cultivo son mantenidas en estado indiferenciado utilizando o una combinación de LIF en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino o una combinación de LIF en medio de cultivo libre de suero suplementado con BMP4 o BMP2[17]. Sin embargo, estos dos factores pueden ser reemplazados por inhibidores químicos de las vías de señalización de las que son parte en diferentes niveles. Como se muestra en la Figura 8, en la actualidad se usan combinaciones de tres o dos inhibidores, llamados *3i* y *2i* respectivamente.

La combinación 3i incluye a los inhibidores SU5402, inhibidor del receptor de FGF tirosin quinasa, PD184352, inhibidor de MEK, y CHIR99021, que inhibe GSK3. Esta combinación es suficiente para derivar y mantener CMEm en ausencia de LIF y suero[46]. Por otro lado, la combinación de inhibidores 2i, que incluye un inhibidor más potente de MEK, PD0325901, y de GSK3, CHIR99021, es suficiente para mantener la auto-renovación de CMEm[46]. Por un lado, los inhibidores de FGF y MEK bloquean la vía autócrina de FGF4, la cual promueve la diferenciación. A su vez, se cree que al inhibir GSK3, que es inhibidora de Nanog[41], factor cuya expresión aumentaría en estas condiciones, es suficiente para mantener la auto-renovación de CMEm en ausencia de LIF[26].

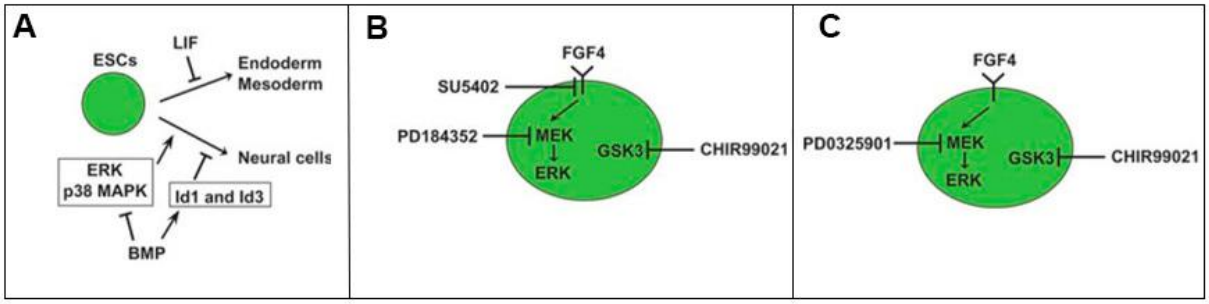


Figura 8: Mecanismos de acción de los inhibidores utilizados para el cultivo de CMEm. A) LIF + BMP/Suero. B) 3i. C) 2i.

Las CMEm cultivadas con LIF junto con los inhibidores 2i se encuentran en uno de los estados más tempranos del desarrollo que pueden alcanzar en cultivo *in vitro*, llamado estado *näive,* y es como en nuestro laboratorio las mantenemos en cultivo de rutina[47]. En este estado, no solo son capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares embrionarios, sino que además son capaces de contribuir a la formación de quimeras. Las CMEm cultivadas en medio de cultivo solo con LIF, se encuentran en un estado llamado *primed*, en el cual, si bien las células son pluripotentes y pueden diferenciarse a todos los tipos celulares, las mismas se encuentran un poco más comprometidas y tienen una capacidad casi nula de contribuir en la formación de ratones quimera[48].

La quinasa de serinas/treoninas Akt

La quinasa Akt, también conocida como quinasa de proteínas B (PKB), es una quinasa de serinas/treoninas ampliamente conservada desde *Escherichia coli* hasta el *Homo sapiens*. Esta quinasa ha sido extensamente estudiada en las últimas décadas debido a que está involucrada en diversos procesos celulares, como crecimiento celular, proliferación, apoptosis, metabolismo, angiogénesis, entre otros[49]. Sin embargo, hoy en día todavía siguen surgiendo diferentes trabajos, indicando la participación de Akt en nuevos procesos. Particularmente, en CMEm está implicada en las vías de señalización que mantienen las propiedades fundamentales[50], tal como lo mencionamos anteriormente. Se conocen múltiples patologías derivadas de la desregulación de las vías de Akt, tales como diabetes, hipertrofia cardíaca, cáncer, entre otros[49]. Esto produce que las vías reguladas por esta quinasa sean un blanco atractivo para nuevos abordajes terapéuticos.

Existen tres isoformas de Akt altamente homólogas entre sí, presentes en animales. Akt1 se expresa en todos los tejidos del organismo, mientras que Akt2 únicamente en tejidos que responden a la insulina y está involucrada en el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, Akt3 se expresa fundamentalmente en tejido nervioso y gónadas. Cada isoforma está codificada por un gen diferente y si bien, existe redundancia entre blancos de fosforilación entre las tres, también se encontraron vías de señalización específicas para cada isoforma[51].

La activación de Akt por diversos factores de crecimiento y de supervivencia celular, implican en primer lugar el reclutamiento de esta quinasa a la membrana plasmática debido a su afinidad al fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), generado por la quinasa PI3K (Figura 9). Por otro lado, ocurren dos eventos de fosforilación, uno de ellos (T308) mediado por la quinasa PDK1, que también es activada por PIP3, y el segundo (S473) por mTORC2. A su vez, también se conocen otros residuos que son fosforilados los cuales son importantes para su plegamiento y estabilidad[52]. Una vez en estado activo, las isoformas de Akt llevan a cabo la fosforilación de múltiples blancos en diferentes compartimentos subcelulares[53]. Por otro lado, la activación es regulada negativamente por fosfatasas. PHLPP y PP2 son las fosfatasas que remueven las fosforilaciones en S473 y T308 respectivamente, mientras que PTEN y SHIP1/2 remueven uno de los grupos fosfato de PIP3, produciendo PIP2[54].

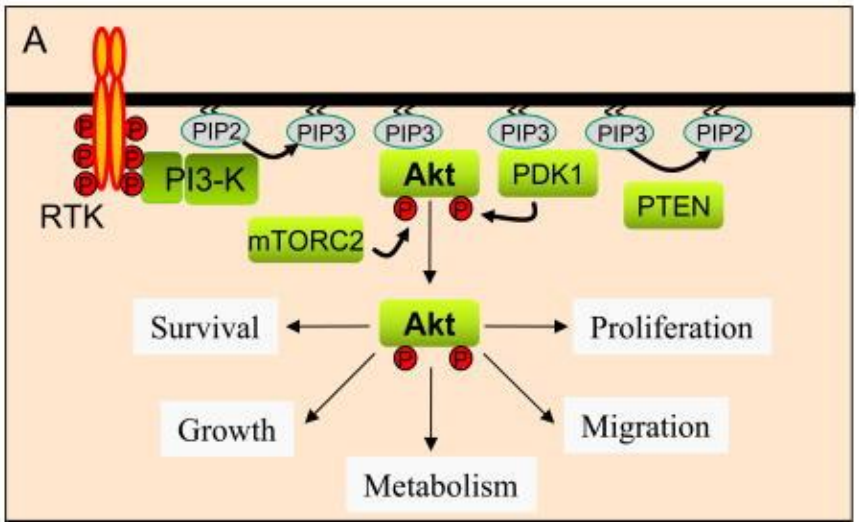


Figura 9: Activación de Akt. Gonzalez & McGraw [51].

A pesar de todo lo que se conoce sobre la regulación de la actividad de Akt mediante fosforilación, la información sobre la influencia de otras modificaciones post-traduccionales sobre la actividad de Akt es menos abundante[55]. Particularmente se ha descripto en los últimos años que la SUMOilación, que es la unión covalente de una pequeña cadena aminoacídica denominada SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), tiene un rol crítico en la regulación de la actividad quinasa de Akt1[56], y es independiente de otras MPT como fosforilación. La implicancia y los efectos de esta MPT de Akt en las propiedades de CMEm aún no se han reportado.

Conjugación a SUMO

La conjugación a SUMO, conocida como SUMOilación, es una modificación post-traduccional (MPT) transitoria y reversible que consiste en la adición covalente de este grupo aminoacídico a la proteína blanco[57]. La SUMOilación afecta la estructura, actividad, localización subcelular y las interacciones de las proteínas a las cuales modifica.

El grupo SUMO es una pequeña cadena polipeptídica, muy similar a la ubiquitina. Tiene aproximadamente 100 aminoácidos y un peso molecular de 12 kDa. Este grupo es unido a los residuos lisina de la secuencia consenso de SUMOilación en las diferentes proteínas blanco[58], mediante un proceso que consta de varios pasos[57], esquematizado en la Figura 10. El mismo comienza con el clivaje de la proteína SUMO por proteasas de la familia SENP. Estas proteasas clivan una porción de la proteína SUMO, dejando expuestos dos residuos glicina en su C-terminal, proceso conocido como maduración. Posteriormente, el grupo SUMO maduro es activado por la enzima específica E1 al unirse covalentemente a ella. Luego de la activación, se produce una reacción de trans-esterificación, provocando la transferencia del grupo SUMO

hacia la enzima E2, conocida como Ubc9 ligasa. Esta enzima es la responsable de la conjugación de SUMO con su sustrato final. Ubc9 cataliza la formación de la unión isopeptídica entre la glicina C-terminal de SUMO con el grupo amino de la lisina blanco en la proteína a modificar. Se demostró que, si bien la transferencia de este grupo puede producirse mediante la acción de las enzimas E1 y E2, tanto *in vitro* como *in vivo* esta transferencia es favorecida por la presencia de la enzima E3. La reversión de esta MPT es producida por enzimas de la familia SENP, liberando a SUMO de la proteína blanco por ruptura del enlace isopeptídico.

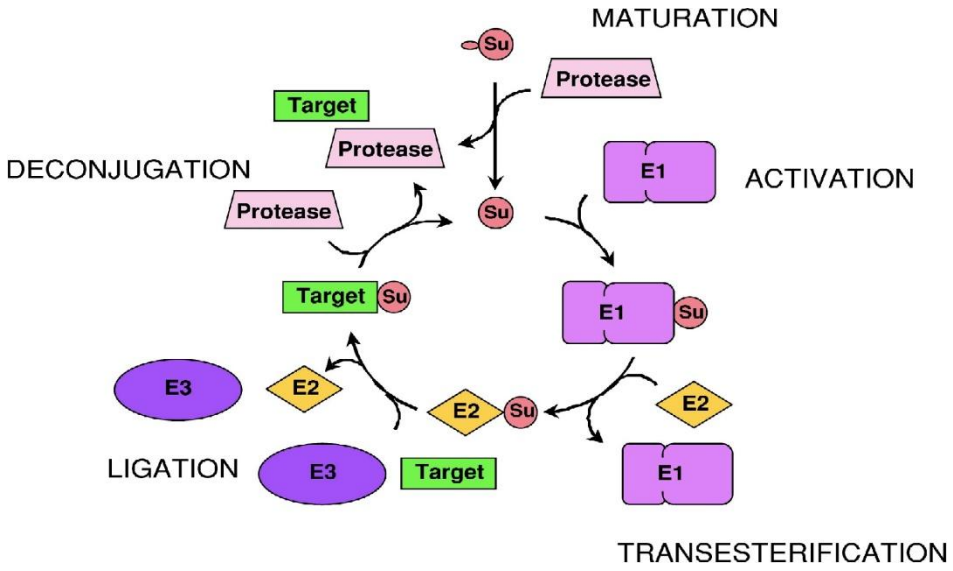


Figura 10: Proceso de SUMOilación de proteínas. Verger et al[58].

SUMOilación de Akt

Como mencionamos anteriormente, recientemente ha sido reportado que Akt es blanco de SUMOilación en diferentes residuos lisina[52,56]. El grupo de la Dra. Srebrow ha generado previamente distintos plásmidos para la sobreexpresión de diferentes mutantes de Akt con diferente capacidad de SUMOilación[52]. Mediante el uso de esta herramienta encontraron que la SUMOilación de Akt1 modifica el patrón de splicing alternativo, la proliferación y el ciclo celular en células de riñón embrionario humano[52]. Además, demostraron que esta MPT puede estimular la inclusión de un exón particular denominado Exón A en el mRNA de Fibronectina. Varios años antes, en un trabajo de nuestro grupo, reportamos que la isoforma de Fibronectina que incluye este exón, incrementa la tasa de proliferación de CMEm[59]. Por otro lado, respecto al cambio en el patrón de splicing, esta MPT también favoreció la inclusión del exón que determina que aumente la relación de la isoforma Bcl-xL respecto a Bcl-xS[52] del gen Bcl-x, clave en el proceso de apoptosis. Esto indicaría un posible efecto antiapoptótico, sobre el cual aún no hay reportes en CMEm. Asimismo, fue reportado que la enzima Ubc9 es crucial para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CMEm[60], aunque no hay reportes directos en la literatura que vinculen este efecto con la SUMOilación de Akt1 mediada por dicha enzima.

Por otra parte, en los últimos años se demostró que la sobreexpresión de mutantes constitutivamente activas de Akt1, es suficiente para el mantenimiento de la pluripotencia en CMEm, incluso en condiciones de diferenciación[43]. Durante el transcurso de este trabajo, fue reportado que una mutación en la secuencia de Akt1 que reemplaza el ácido glutámico 17 por una lisina, no solo aumenta su actividad quinasa, sino que también aumenta los niveles de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog en células madre tumorales de pulmón[61]. Esta mutación, como describiremos en las siguientes secciones, también fue reportada de manera independiente, como responsable del aumento de la conjugación a SUMO por parte de Akt1, aunque la relevancia de este proceso no se encuentra descripta en CME. Estos antecedentes nos llevaron a formular nuestra hipótesis de trabajo en la que proponemos que la SUMOilación de Akt1 podría estar altamente implicada en el mantenimiento de las propiedades fundamentales, en la supervivencia y en la proliferación de las CME.

Por otro lado, como ya mencionamos, se conoce que Akt1 es una enzima clave en la transducción de señales para la proliferación y supervivencia celular [62]. Diversos trabajos demuestran el rol antiapoptótico de Akt1. *Risso et al*[52] demostró que la SUMOilación de Akt1 tiene efectos protectores ante estímulos apoptóticos. Si bien la apoptosis juega un papel clave en el desarrollo, ya que a lo largo de la embriogénesis diferentes grupos de células activan este programa de muerte controlada fundamental para el desarrollo del nuevo organismo [63], aún no se conoce en profundidad la regulación de este proceso en CME. Asimismo, ante condiciones de cultivo que favorecen la diferenciación, hay una gran población de CME que activa el programa apoptótico [64]. En base a los antecedentes mencionados, proponemos que ante condiciones desfavorables, la SUMOilación de Akt1 podría proteger a las CME de desencadenar un proceso de muerte celular programada.

Hipótesis y objetivos

A partir de los antecedentes de la literatura, descriptos a lo largo de la introducción de esta tesis, postulamos que la SUMOilación de Akt, asociada a una mayor activación de dicha quinasa, podría estar involucrada en distintos procesos relevantes en CME. Por lo tanto, postulamos la siguiente hipótesis:

La SUMOilación de Akt es relevante para mantener las propiedades fundamentales de CME y está involucrada en su supervivencia y proliferación.

Para poner a prueba esta hipótesis, nos propusimos los siguientes objetivos:

Objetivo general

Estudiar el efecto de la SUMOilación de Akt sobre las propiedades fundamentales de CME, mediante sobreexpresión de variantes de Akt con diferente capacidad de ser SUMOiladas.

Objetivos específicos

I. Estudiar el efecto de las mencionadas mutantes de Akt sobre la expresión del factor fundamental de CME Nanog.
   - **a.** Mediante el estudio de la actividad del promotor utilizando una construcción reportera.
   - **b.** Analizando los niveles endógenos de Nanog mediante inmunofluorescencia.

II. Analizar diferentes condiciones para inducir apoptosis en CME y poner a punto la metodología para detectarla, con el propósito de poder estudiar a futuro el efecto de la SUMOilación de Akt sobre este proceso en CME.

Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea W4 de CME de ratón utilizada en el desarrollo de esta tesis fue obtenida de la Antibody and Bioresource Core Facility de la Universidad Rockefeller, EEUU[47].

Propagación y mantenimiento del stock celular

Para la propagación y el mantenimiento del stock celular, las células fueron cultivadas en placas de plástico para cultivo celular (Corning) previamente tratadas con gelatina de piel bovina (Sigma) 0.1% en PBS durante 15 minutos en estufa de cultivo (37°C y 5% CO2) para favorecer su adherencia al plástico. Se utilizó medio de propagación (MP) compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium alta glucosa (DMEM, Gibco) suplementado con l-alanil-l-glutamina (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), antibióticos penicilina y estreptomicina (Gibco), 2-β-mercaptoetanol y 15% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco), según lo requerido para el cultivo de esta línea celular[47]. Para el mantenimiento de las células en estado indiferenciado, fueron agregados al medio la citoquina LIF y los inhibidores de la quinasas MEK (PD 0325901 0,5 µM, Tocris) y GSK3 (CHIR 99021 3 µM, Tocris), estos últimos denominados en conjunto "2i"[46]. Para la obtención de LIF, se contó con la línea de células CHO (Chinese Hamster Ovary, por su sigla en inglés) modificada genéticamente para la sobreexpresión de esta citoquina y susecreción al medio de cultivo. El medio condicionado por estas células es utilizado para suplementar LIF al medio de cultivo de CME y así propagar las células de forma rutinaria[59]. Esta línea celular es ampliamente utilizada para este fin por la comunidad científica, disminuyendo notablemente los costos de cultivo. La composición detallada de los distintos medios y soluciones empleados en este trabajo se especifican en un apartado al final del capítulo.

Generalmente, para el mantenimiento del stock de CME, se utilizaron placas de 60mm de diámetro en las que las células se cultivaron en una densidad de 1,5 x 10^4 células/cm^2. Normalmente el pasaje de las células fue realizado cada 48 o 72 horas luego de la siembra, evitando que el cultivo llegara a máxima confluencia. Para esto, se aspira el medio de cultivo de la placa y luego es lavada con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) para terminar de quitar el medio remanente. Posteriormente se descarta el PBS, se agregan 0,5 ml de tripsina (Gibco) y se incuba a 37°C entre 3 y 5 minutos, agitando ocasionalmente las placas para favorecer el despegue y disgregación de las colonias de células. Transcurrido ese tiempo, se completa la disgregación de las colonias de forma mecánica con pipeta monitoreando el proceso mediante observación al microscopio. Para inactivar la tripsina se agrega igual volumen de medio conteniendo SFB y luego las células suspendidas son centrifugadas a 200 xg por 5 minutos en un eppendorf de 5 ml. Posteriormente, se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1ml de medio de propagación, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de tripsina posible del medio. Luego, se coloca el volumen de suspensión con la cantidad de células adecuadas,

calculado como se describe a continuación, en una nueva placa de cultivo previamente tratada con gelatina y con 3 ml de MP fresco.

Cálculo de células en cámara de Neubauer

Para determinar la concentración de células en suspensión, se las contó considerando además la viabilidad utilizando el método de exclusión con Azul de Tripán. Este colorante tiñe el interior celular solo en aquellas células cuya membrana se encuentra dañada y no así en aquellas con su membrana íntegra, por lo que las células no coloreadas son consideradas células viables. Para ello, se toman 10 µl de la suspensión celular y se mezclan con 10 µl de una solución 4% de Azul de Tripán. Para el recuento, se colocan 10 µl de dicha suspensión en una cámara de Neubauer y se cuentan las células no coloreadas en los cuatro campos de la cámara. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el cálculo, se realizan diluciones de la mezcla de células con el colorante utilizando PBS. Se estima el número de células por ml de suspensión promediando los valores de los cuatro cuadrantes contados y considerando la capacidad de la cámara (0,1 µl) y la dilución realizada con el colorante, utilizando la Ecuación 1.

$$\frac{N^{\underline{o}}\ de\ células}{1\ ml} = N\ x\ 10.000\ x\ d$$

Ecuación 1: Ecuación utilizada para estimar la concentración de células luego del recuento en cámara de Neubauer

En esta ecuación N es el promedio de número de células contadas en los cuadrantes, d es el factor de dilución realizado y el dígito 10.000 surge de considerar la capacidad de la cámara (0,1 µl) y su conversión de unidades a ml.

A partir del valor obtenido, se calcula el volumen en el cual se obtiene la cantidad de células requerida para el stock o para cada experimento. Se realiza la siembra por goteo de la suspensión celular de forma uniforme y luego se mezcla suavemente en todas las direcciones para distribuir las células sobre la superficie de la placa de forma homogénea. Las placas son incubadas en una estufa de cultivo verificando diariamente el estado de las células y cambiando el medio de cultivo en caso de ser necesario, generalmente cada dos días.

Congelamiento y descongelamiento de células

El stock de cada línea celular es conservado en N_2 líquido. Para ello, las células de una placa p60 son tratadas con tripsina como se explicó previamente. Luego de inactivar la tripsina, las células se centrifugan a 200 xg por 5 minutos en un tubo eppendorf de 5 ml. Las mismas son resuspendidas en 1 ml de MP con una concentración final de 25% SFB y 10% DMSO y son colocadas en un criotubo, siempre en frío. Rápidamente, las células son transportadasa un freezer a -80°C, colocando los criotubos en un recipiente que contiene isopropanol (Mr. Frosty Freezing Container, Nalgene) para lograr un enfriamiento gradual. Al día siguiente, los criotubos se almacenan en un termo que contiene N_2 líquido (-196 °C).

Para descongelar las células, se toma un criotubo del tanque de N_2 líquido y se calienta rápidamente en baño a 37°C hasta lograr el descongelamiento de la suspensión de células. Para remover el DMSO, que presenta una alta toxicidad celular, se trasvasa el contenido del criotubo a un tubo eppendorf de 5 ml con 4 ml de MP y es centrifugado a 200 xg por 5 minutos. Luego, el medio conteniendo DMSO es descartado y las células son resuspendidas en un volumen adecuado de MP. Una alícuota es tomadas para analizar la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con Azul de Tripán, como fue explicado anteriormente. Una vez verificado el estado de las células, se siembran en una placa con previo recubrimiento con gelatina y con la cantidad necesaria de MP.

Análisis de la expresión génica

Transfección transitoria con PEI

El método de transfección de células utilizando como agente Polietilenimina (PEI, Poliscience Inc.) se basa en la formación de complejos entre el ADN plasmídico y este compuesto polimérico que son endocitados por las células. Esto permite que las mismas incorporen de manera transitoria vectores de nuestro interés, los cuales serán detallados en cada experimento en particular. El día previo a transfectar, se siembra la cantidad de células necesarias según la superficie de la placa que utilicemos (Tabla 1) en MP normal. La relación ADN:PEI utilizado depende del tipo celular a ser transfectado (Tabla 1). La masa de ADN necesaria se diluye en medio OPTIMEM (Gibco) sin suero ni antibióticos. Se homogeniza la solución madre de PEI durante 15 segundos utilizando vortex, se agrega la cantidad necesaria de PEI a la mezcla de ADN ya diluida y se incuba a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos. Luego, se agrega la solución de complejos gota a gota a la placa correspondiente sobre el MP y se homogeniza. Las placas son incubadas posteriormente a 37°C con 5% de CO_2. A las 24 hs luego de la transfección, el MP es cambiado por MP fresco. Generalmente, luego de las 48 a 72hs post transfección, las células son cosechadas para analizar la expresión génica ya sea por RT-PCR, análisis de genes reporteros, Western Blot (WB), o bien son fijadas para su análisis por inmunofluorescencia.

Línea celular	Tipo de experimento	Tipo de Placa	Nº de células	Relación DNA:PEI
W4 (ESC)	Sin selección con antibiótico (para análisis de genes reporteros o microscopía)	60 mm (P60)	350,000	1:3
		6 Pocillos múltiples (MW6)	175,000	
		12 Pocillos múltiples (MW12)	90,000	
		24 Pocillos múltiples (MW24)	50,000	
	Con selección de antibiótico (para análisis de genes endógenos mediante RT-qPCR o Western blot)	60 mm (P60)	700,000	
HEK	Sin selección (Inmunofluorescencia)	12 Pocillos múltiples (MW12)	75000	1:5

Tabla 1: Cantidad de células utilizadas según el tipo de experimento y la superficie de la placa requerida.

Ensayo de actividad de Luciferasa

Para este ensayo, se transfectaron CME en placas de MW24, según lo indicado en la Tabla 1. Fue realizada una co-transfección de cada variante de Akt junto con el vector Nanog5P reporter (Addgene #16337) (Figura 11). Este vector contiene el gen de la Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) cuya expresión está regulada por la región promotora del factor de transcripción fundamental Nanog. A las 48 hs post-transfección se descarta el MP, se realiza un lavado con PBS y se prosigue a lisar las células utilizando 80 µl del Buffer de lisis específico en frío. El lisado es colectado y centrifugado por 2 minutos a 14000xg. Para medir la actividad de Luciferasa de *Photinus pyralis* se incuban 50 µl del sobrenadante con 55 µl de buffer de reacción de Luciferasa conteniendo el sustrato (luciferina) durante 3 minutos a temperatura ambiente (TA) y se realiza la lectura de la intensidad de luz de cada pocillo en el luminómetro Glomax Multi Detection System (Promega). Se realizan triplicados de cada condición ensayada en cada réplica biológica.

El valor de masa de proteínas totales en cada pocillo determinado por el método de Bradford es utilizado para normalizar los niveles de lectura. Los valores de actividad de Luciferasa de *Photinus pyralis* se expresan como la relación entre los valores medidos para la

actividad de esta enzima y los obtenidos para la masa de proteínas totales. A su vez, se encuentran relativizados a los resultados de la transfección realizada con el vector vacío pcDNA.

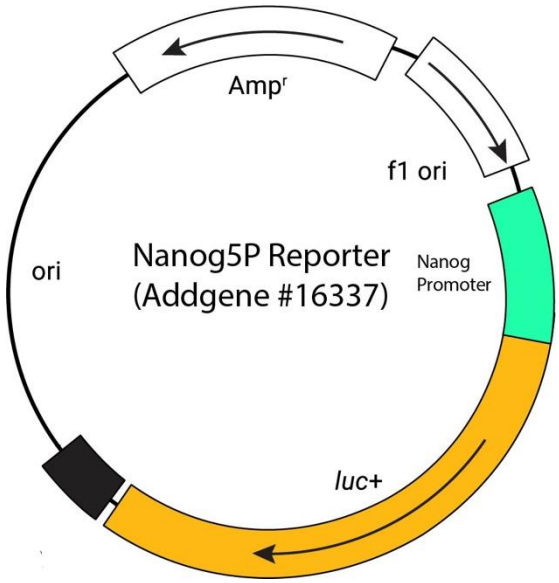


Figura 11: Mapa de vector reportero Nanog5P Reporter (Addgene #16337).

Curva de sensibilidad al antibiótico Blasticidina

Para estudiar la sensibilidad al antibiótico Blasticidina en la línea de CME W4, se realizó una curva de concentración utilizando placas de 96 pocillos múltiples (MW96). Antes del plaqueo de las células, cada pocillo fue recubierto con gelatina 0.1% como fue descripto anteriormente. Se plaquearon 10.000 células por pocillo, las cuales fueron incubadas por 24 horas para permitir su adherencia y proliferación en cada pocillo. Posteriormente, se agregó al MP el antibiótico Blasticidina en diferentes concentraciones por 48 horas. Al finalizar este periodo, se tomaron fotografías utilizando un microscopio de contraste de fase (40X) para estudiar la morfología celular y de la colonia, y además se analizó la viabilidad mediante la técnica de Cristal Violeta evaluando la masa celular remanente.

Supervivencia, Viabilidad celular y Apoptosis

Detección de fragmentación de ADN mediante electroforesis (Técnica de *DNA Ladder*)

Para la detección de la degradación del ADN por apoptosis, se utilizó la técnica de *DNA ladder*[65], según su nombre en inglés (escalera de ADN). Para ello, se cultivaron las células normalmente según las condiciones del experimento requerido. El día en el que se cosechan

las células, se colecta el medio de la placa, el cual contiene células muertas o en proceso apoptótico que se despegaron de la superficie de la placa, y se lava con PBS. Las células adheridas se tripsinizan normalmente según lo detallado anteriormente, frenando la reacción con el medio con SFB colectado previamente. Las suspensiones son centrifugadas a 110g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. Se añaden 100 µl de buffer de lisis para ADN ladder y se incuba por 10 minutos. Luego, se realiza una nueva centrifugación a 900 xg y se colecta el sobrenadante. Se añaden SDS 1% final y 6,3 µl de ARNasa 10 mg/ml, dejando incubar 2 horas a 37°C. Posteriormente, se añaden 18 µl de Proteinasa K 20 mg/ml y se incuba por 2 horas a 56°C. Se añade ½ volumen de acetato de amonio 10M y 2,5 volumen de etanol absoluto frio. Se incuba 1 hora a -80°C y se centrifuga a 14000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante y el pellet es lavado con etanol 80% frío, para luego dejar secar a TA por 10 minutos. Finalmente, se resuspende en buffer TE y se lo cuantifica (ver la sección Cuantificación de muestras de ADN). Para la detección de la escalera de ADN, se siembran 4 µg de ADN por muestra en un gel de agarosa 2% y se lo somete a 100V por 2 horas. Se revela con bromuro de etidio en transiluminador UV.

Ensayo de Cristal Violeta

La masa celular fue cuantificada mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. Brevemente, las células son lavadas con PBS frío y luego son fijadas con metanol por 10 minutos a -20°C. La tinción se lleva a cabo con Cristal Violeta 0,5% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realiza un lavado de las células con agua destilada (H_2O_d) y se deja secando ON a TA protegidas de la luz. Se solubiliza el Cristal Violeta que incorporaron las células con una solución ácido acético 10% durante 30 minutos a TA. El blanco se obtiene realizando el mismo tratamiento a un pocillo vacío. Se midió la $A_{595\ nm}$ utilizando el equipo Optima Fluostar (BGM Labtech). Se realizaron al menos 3 réplicas técnicas de cada condición.

Análisis de proteínas

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para obtener los extractos proteicos, se cultivaron las células en placas p60 según la Tabla 1. Al cabo del tiempo requerido según el experimento, las células fueron lisadas con 200 µl de buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). El lisado se completó con un *raspador* y una jeringa por la que se pasó la suspensión suavemente cada 10 minutos durante 30 minutos, tiempo que las muestras son mantenidas en frío. Posteriormente, se realiza una centrifugación a 14000 g por 20 minutos a 4ºC. Los sobrenadantes de cada muestra son guardados a -80°C hasta su uso.

Para el preparado de las proteínas se agregó Buffer de *Crackeo* 5X a cada muestra y fueron hervidas durante 5 minutos. Luego, fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE) en un gel 12 % de poliacrilamida, a voltaje constante (100 V), en buffer de corrida para WB.

El gel de poliacrilamida para electroforesis de proteínas consta de dos secciones, inferior (separador) y superior (concentrador). La composición de las mismas difiere en la concentración de poliacriacrilamida y composición del buffer. Para la preparación de los geles, se siguió la receta según Tabla 2:

	Separadora 12%	**Concentradora 4,5 %**
Reactivo	**Volumen**	
Acrilamida/Bis 30%	2025 µl	400 µl
Tris 1,5 M (pH 8,8)	850 µl	-
Tris 0,5 M (pH 6,8)	-	690 µl
SDS 1%	350 µl	270 µl
Glicerol	280 µl	-
TEMED	3 µl	3 µl
APS 10%	20 µl	20 µl
H2Od	1475 µl	1300 µl

Tabla 2: Mezcla de preparación para geles de poliacrilamida.

Ensayo de Western Blot

Luego de efectuada la electroforesis, se procedió a realizar la electrotransferencia húmeda de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham). La transferencia se realizó ubicando al gel y la membrana entre 2 papeles de filtro Whatmann 3MM de cada lado, sumergidos previamente en buffer de transferencia para WB (ídem buffer de corrida para WB pero con 20% de metanol). Esta preparación se montó en una cuba (Bio-Rad) y se aplicó voltaje constante de 120 V durante 1 hora en frío. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas, se realizó una tinción de la membrana con solución de Rojo Ponceau 0,1% en ácido acético 5% durante 5 minutos. Una vez verificada la transferencia, se decoloró con agua.

A continuación, la membrana se bloqueó con solución de bloqueo (1 % de leche descremada en polvo, en PBS-T), durante 1 hora a TA. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario en la dilución adecuada (Tabla 3) en solución de bloqueo fresca. Se dejó ON en cámara fría a 4 ºC con agitación permanente. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados a TA de 5 minutos cada uno con Tween-20 0,05 % en PBS. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario en la dilución adecuada (Tabla 3) con solución de bloqueo fresca, durante 90 minutos, a TA y con agitación constante. Luego de tres

lavados con PBS-Tween, se reveló la reacción de peroxidasa en oscuridad con la solución ECL, de acuerdo a instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Visualizamos los complejos inmunes por quimioluminiscencia, mediante el uso del equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Tipo de Anticuerpo	Descripción	Dilución
Primario	Anti etiqueta HA (Ratón) (IQUIBICEN, CONICET-UBA)	1:1000
Secundario	Anti IgG de ratón conjugado a HRP (Milipore, AP124P)	1:3000

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para Western Blot.

El anticuerpo que reconoce la etiqueta HA fue producido y gentilmente cedido por el Laboratorio de Oncología Molecular, dirigido por el Dr. Martín Monte (IQUIBICEN)

Inmunofluorescencia

Para realizar tinciones de inmunofluorescencia indirecta, se cultivaron las células sobre vidrios cubreobjetos dispuestos en las placas estándar de cultivo celular MW24 (ver Tabla 4), recubriendo previamente la superficie con gelatina 0.1% como fue descripto anteriormente. Pasadas 48hs luego de la transfección, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los vidrios con PBS. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos a TA, y luego de al menos 3 lavados de 5 minutos con PBS, fueron permeabilizadas con 0,1% PBS-Triton X-100. Posteriormente, se realizó un bloqueo con 10% de suero normal de burro (Sigma) en 0.05% PBS-Tween (PBST) durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios se incubaron en solución de bloqueo a TA durante 60 minutos y luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST. Los anticuerpos secundarios fueron incubados junto con DAPI 0,1 µg/ml en solución de bloqueo por 60 minutos a temperatura ambiente. Este compuesto es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, permitiendo detectar los núcleos de manera específica. Las diluciones de anticuerpos utilizadas se muestran en la Tabla 4. Las muestras fueron luego lavadas con PBST como se describió previamente, y fotografiadas en el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX71 (Olympus). Las imágenes fueron procesadas utilizando los programas Fiji[66] y Adobe Photoshop CS6.

Tipo de Anticuerpo	Descripción	Dilución
Primario	Anti etiqueta HA (Ratón) (IQUIBICEN, CONICET-UBA)	1:100
	Anti hNanog (Conejo) (Prepotech, 500-P236)	1:100
Secundario	Anti IgG de ratón conjugado a Cy3 (Cabra) (Chemicon, AP124C)	1:500
	Anti IgG de conejo conjugado a Cy2 (Cabra) (Chemicon, AP132J)	1:500

Tabla 4: Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

Técnicas microbiológicas

Transformación de bacterias: método de Golpe de calor

Para la amplificación de los vectores utilizados en esta tesis, se realizó la transformación de bacterias mediante la técnica de golpe de calor[67]. Se utilizaron bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH5α generadas previamente en el laboratorio mediante el método de Hannon[67]. Para ello, la suspensión de bacterias almacenada a -80 °C fue descongelada en hielo. Una vez descongeladas, se agregó la dilución de los plásmidos a transformar, utilizando aproximadamente 100 ng del mismo a 50 µl de suspensión en un tubo eppendorf estéril. Se incubó durante 20 a 30 minutos en hielo. Se realizó un control positivo transformando las bacterias con un plásmido de concentración conocida con resistencia al mismo antibiótico del plásmido de interés y un control negativo sin agregado de ADN como control de cepa y del antibiótico de selección. Una vez terminada la incubación en hielo, se colocaron los tubos en un baño a 42°C durante 90 segundos. Luego del golpe de calor, los tubos fueron colocados inmediatamente en un baño de agua-hielo durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se agregaron 0,5 ml de medio de cultivo LB a cada tubo y fueron incubados a 37°C durante 30 minutos. Luego de la incubación, las bacterias fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2700 x g. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en aproximadamente 100 µl de LB remanente y se siembró las bacterias en placas LB agar conteniendo el antibiótico correspondiente. Laresistencia al antibiótico se encuentra codificada en el plásmido a transformar, generalmente se utilizó ampicilina y en algunos casos kanamicina. Las placas se incubaron ON a 37°C y al día siguiente, se observó la presencia de colonias transformantes con el plásmido de interés.

Purificación de ADN plasmídico

Preparación en pequeña escala (Miniprep)

Con el objetivo de verificar la calidad e identidad de los plásmidos, se realizó la extracción plasmídica a pequeña escala mediante el protocolo de lisis alcalina[68]. El protocolo utilizado se basa en la lisis alcalina de las bacterias utilizando NaOH y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Se inocularon 2 ml de medio LB conteniendo el antibiótico correspondiente en un tubo cónico de 15 ml con una colonia de bacterias transformada realizando un control sin inocular para verificar la esterilidad del medio. Los cultivos fueron incubados a 37°C con agitación ON y al día siguiente se evaluó el crecimiento de los mismos por aparición de turbidez. Se transfierieron 1,5 ml de cada cultivo a un tubo eppendorf y se centrifugaron durante 5 minutos a 2700g. El sobrenadante se descartó y se colocaron 100 µl de Solución 1, resuspendiendo las células con vortex. Se agregaron 200 µl de Solución 2, se mezcló por inversión y se agregaron 150 µl de Solución 3 homogeneizando de la misma manera. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante, el cual contiene el ADN plasmídico, y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol o dos volúmenes de etanol absoluto frío. Los tubos fueron centrifugados a velocidad máxima durante 5 minutos, luego de los cuales pudimos ver la aparición de un pellet correspondiente al ADN plasmídico y al ARN co-purificado.

Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se lava el pellet con 100 µl de alcohol 70%. Se centrifugó a máxima velocidad nuevamente durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet a TA por 5 minutos antes de ser resuspendido en 30 µl de H_2O_{mQ}. Esta preparación de ADN plasmídico contiene además ARN y proteínas. En caso de ser necesaria su purificaciónpuede realizarse tratamiento con ARNasas y extracción con fenol, respectivamente. Para confirmar la identidad de los plásmidos, se realizó una digestión con enzima de restricción, verificando que al correr en un gel de agarosa 0.8% (100V, 1 hora aproximadamente) y revelando con luz UV, el mismo posea el tamaño adecuado. En caso positivo, se toma una alícuota del cultivo de bacterias del cual se partió para preparar un stock que se conserva en glicerol 15% a -80°C.

Preparación en mediana escala (Midiprep)

Se realizaron preparaciones con el método de lisis alcalina[68], tal como la preparación en pequeña escala, pero en escala de Midiprep. A diferencia de la miniprep, esta preparación no solo permite obtener mayor masa de ADN, sino que además, implica una mayor pureza del material, permitiendo ser usado para transfección de cultivos celulares. En esterilidad, se inocularon 200 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, con un stock o colonia de *E. coli* transformada con el plásmido de interés conservado en una solución 15% glicerol a -80°C, y se incubó a 37°C con agitación ON. Al día siguiente, los cultivos de bacterias se centrifugaron a 2700 xg durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se

resuspendió en 6 ml de Solución 1 al que se agregaron 6 ml de Solución 2. Se mezcló por inversión y se incubó durante 10 minutos. Luego, se agregó 6 ml de Solución 3, se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12800 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos de centrífuga, filtrándolo a través de una gasa para evitar el pasaje de restos de precipitado. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló con varilla y se incubó 5 minutos a TA. La preparación se centrifugó a 11.400xg por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante fue resuspendido en 2 ml de Buffer TE. Agregamos ARNasa en una concentración final de 100 µg/ml, incubando por 30 minutos a TA. Finalmente, se utilizaron las columnas del kit Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega) para purificar el ADN plasmídico, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico fue eluído de las columnas con 400 µl de Buffer TE precalentado a 65°C. La concentración de los plásmidos fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ver sección Cuantificación de muestras). A su vez, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (gel 0,8% de agarosa en buffer TAE a 100V, durante 1 hora aproximadamente) revelando con bromuro de etidio para verificar su calidad.

Cuantificación de muestras de ADN

Para realizar la cuantificación de muestras de ADN, fue utilizado el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), un espectrofotómetro de amplio espectro (190-840 nm) que mide 1 µl de muestra con alta eficiencia y reproducibilidad. Brevemente, se calibró al equipo con 1 µl agua estableciendo el blanco de medición y luego, se colocó 1 µl de cada muestra para realizar las mediciones. La concentración fue obtenida por la medición de $A_{260\ nm}$, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos. El equipo además mide la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y calcula la relación 260/280, que debe ser aproximadamente 1,8 para que la muestra de ADN sea considerada de una pureza aceptable.

Análisis Estadístico

Los resultados para los ensayos de Luciferasa, donde la variable fue intensidad de luz medida, fueron analizados mediante análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar con un mínimo de 4 réplicas. De esta misma forma, se analizaron los resultados de los ensayos del efecto de la SUMOilación de Akt en la expresión de Nanog en la línea de CME W4, en los que la variable fue nivel de expresión del promotor del gen en estudio. Para ellos aplicamos una transformación logarítmica a los datos. El supuesto de normalidad fue estudiado mediante un gráfico Q-Q Plot y la prueba de Shapiro-Wilkes, y el de homocedasticidad por la prueba de Levene. Las comparaciones entre tratamientos fueron analizadas utilizando la prueba de Tukey. Solo aquellas pruebas con $p < 0,05$ fueron consideradas significativas. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat (FCA, Universidad Nacional de Córdoba).

Soluciones y medios de cultivos utilizados

PBS 1x (1000ml)

KCl	200 mg
NaCl	8 mg
KH_2PO_4	200 mg
Na_2HPO_4	1,14 mg
H_2O_{mQ} estéril	c.s.p 1 litro

Medio de propagación (MP) para CME (50 ml)

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
$NaHCO_3$ 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 15%)	7,5 ml
Glutamax 200 mM (100x)	500 µl
Aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)	500 µl
Penicilina/Estreptomicina (100x)	500 µl
LIF 1000x	50 µl
PD0325901 (10.000x)	5 µl
CHIR99021 (1000x)	50 µl
2-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 µl
H2OmiliQ estéril	28,4 ml

Medio de propagación para HEK (50 ml)

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
$NaHCO_3$ 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 10%)	5 ml
Penicilina/Estreptomicina (100x)	500 µl
H2OmiliQ estéril	32 ml

Azul de Tripán 4% pH 7,4

Azul de Tripán	400 mg
NaCl	810 mg
K_2HPO_4	60 mg
Metil-p-hidroxibenzoato	50 mg
H2OmiliQ (mQ) estéril	c.s.p. 10ml

Medio LB

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
H2Odest	c.s.p 1000ml

Medio LB Agar

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Agar	15 gr
H2Odest	c.s.p 1000ml

Solución 1

Tris-HCl pH 7,5 1 M	2 ml
EDTA 0.5M	0,8 ml
H2Odest	37,2 ml

Solución 2

NaOH 1M	4 ml
SDS 10%	2 ml
H2Odest	14 ml

Solución 3

Ácido acético glacial 100%	5,75 ml
Acetato de potasio 5M	30ml
H2Odest	14,25 ml

Buffer TE

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Buffer de lisis para actividad de Luciferasa

Tritón X-100 10%	20 ml
K2HPO4 500 mM pH 7,8	200 µl
DTT 100 mM 1 ml	1 ml
H2O	c.s.p. 100 ml

Buffer de lisis para *DNA ladder*

NP-40 (1%)	50 µl
EDTA 0.5 M	205 µl
Tris-HCl 0.5 M	500 µl
H2OmQ	c.s.p. 5ml

Buffer de reacción para actividad de Luciferasa

	para 1 reacción
GGSM	31,2 µl
EGTA 100 mM	2,5 µl
Tritón X-100 10%	1,35 µl
K2HPO4 100 mM	7,5 µl
DTT 1M	0,07 µl
H2Od	14,7 µl
ATP 2,5 mM	4 µl
Luciferina 1mM	1,25 µl

* glicilglicina 25 mM, MgSO4 7,5 mM pH 7,8

Reactivo de Bradford

Azul Brillante de Coomasie G-250	100 mg
Etanol 95%	50 ml
Ácido fosfórico 85%	100 ml
H2O	c.s.p. 1000 ml

Buffer de *Crackeo* 5x

Tris-HCl 0,5M (pH 6.8)	1 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS 10%	1,6 ml
2-mercaptoetanol 12,5%	1,25 µl/ml
Azul de bromofenol 1%	0,4 ml
H2Odest	3,9 ml

Buffer RIPA

Tris-HCl 1M (pH 7.4)	25ml
NP-40 1%	5 ml
Desoxicolato de sodio 0,5%	2,5 g
SDS 0,1%	0,5 g
NaCl 5M	15 ml
EDTA 0,5M H2O	2 ml
NaF 50 mM	1,05 g
H2Odest	c.s.p. 500 ml

Buffer de corrida para WB

Tris Base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
H2Odest	c.s.p. 1000 ml

Resultados

Primera Parte:
Preparación de los vectores, detección de su expresión y diseño experimental

Para evaluar los efectos de la SUMOilación de Akt en CMEm, utilizamos plásmidos que codifican para distintas variantes de la isoforma Akt1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas, gentilmente cedidos por el grupo de la Dra. Srebrow (IFYBINE, CONICET-UBA). A continuación, detallamos las características de cada uno de ellos. Destacamos que, en base a los resultados del grupo que generó estas mutantes, se considera que éstas son dominantes frente a la quinasa endógena. Todas ellas se encuentran reguladas por un promotor constitutivo que permite su sobreexpresión mediante transfección transitoria y además, se encuentran marcadas con la etiqueta de hematoglutinina de gripe humana (HA) en su cadena polipeptídica. A su vez, estos plásmidos contienen el gen de resistencia al antibiótico Blasticidina, utilizado generalmente para la selección en células eucariotas. Los elementos de estas construcciones más importantes para este trabajo se pueden observar esquematizados en la Figura 12. Por un lado, contamos con el plásmido pcDNA6, vector de expresión donde fue clonado el ADN copia de Akt1 y del cual fueron derivadas las variantes que mencionaremos a continuación. La variante salvaje (*wild type*) de Akt1 es denominada **HA-Akt1-WT** y posee capacidad normal de SUMOilación. La mutante **HA-AKT1-E17K** posee una sustitución del ácido glutámico 17 por una lisina. Esta sustitución, encontrada en diferentes tipos de tumores de mamíferos, aumenta la interacción de Akt1 con la membrana plasmática, produciendo una mayor activación de esta quinasa[69]. A su vez, en esta mutante el nivel de SUMOilación de Akt1 también se encuentra aumentado considerablemente[52]. Por otro lado, la variante **HA-AKT1-2KR** posee dos de los sitios blanco de conjugación con SUMO, las lisinas 276 y 301, reemplazadas por argininas, presentando SUMOilación disminuida[52]. **HA-AKT1-E17K/2KR** es una variante que combina las mutaciones anteriores. La primera mutación favorecería el aumentode la SUMOilación, sin embargo, la presencia de la mutación en las lisinas produce una SUMOilación disminuida en esta mutante también[52]. A su vez, esta mutación en las lisinas también produce la pérdida de la hiperactividad característica de la mutante E17K. Si bien no está del todo claro, en estas últimas dos variantes, no se vería afectada la actividad quinasa de Akt1, pero se postula que esta MPT podría regular su interacción con sus blancos correspondientes.[52]

Con el propósito de realizar el presente proyecto, recibimos en nuestro laboratorio una alícuota de las construcciones mencionadas y del vector vacío para utilizar como control.

Preparación de los vectores de las diferentes variantes de Akt

Con el objetivo de generar nuestro stock de bacterias transformadas y amplificar los plásmidos, realizamos la transformación de bacterias con las mencionadas construcciones. El

vector en el que originalmente fue clonada la versión salvaje (wt) y en el que luego se generaron las diferentes mutantes es el pcDNA6, que posee el gen de resistencia al antibiótico Ampicilina. Utilizamos dicho antibiótico tanto para seleccionar las bacterias transformantes en medio LB sólido y generar colonias, como para realizar los cultivos en medio LB líquido con el fin de analizar los mismos mediante miniprep y amplificarlos por midiprep. Antes de utilizarlos, verificamos que tuviesen el tamaño correspondiente mediante digestión con la enzima BamHI seguida de electroforesis en gel de agarosa. Sabiendo que las construcciones tienen un único sitio de reconocimiento para esta enzima, esperábamos una única banda correspondiente a la forma lineal. Asimismo, mediante electroforesis de las preparaciones sin digerir analizamos la calidad de los plásmidos obtenidos, es decir que se encuentren íntegros y que no presenten contaminación con otros plásmidos, ADN genómico o ARN.

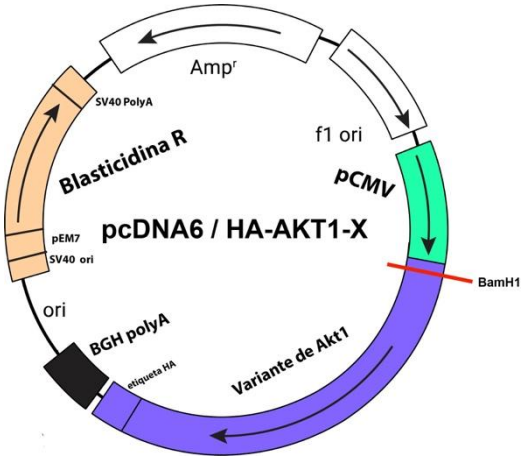


Figura 12: Mapa de las construcciones de las variantes de HA-Akt1 realizadas en el vector pcDNA6.

Detección de la expresión de las variantes de Akt1

Con los objetivos de verificar la correcta expresión de diferentes variantes de Akt1 y de poner a punto la técnica de inmunofluorescencia para reconocer las células transfectadas, realizamos una transfección transitoria de células de la línea de riñón embrionario humano, HEK. Elegimos esta línea celular debido a que posee una alta eficiencia de transfección, característica conveniente para esta parte del trabajo. Realizamos el cultivo de las células sobre vidrios cubreobjeto colocados en placas multipocillos, como se encuentra esquematizado en la Figura 13. Luego de 48 horas desde el momento de la transfección, fijamos las células que habían crecido sobre los vidrios. Dado que, como ya mencionamos, cada una de las variantes posee la etiqueta HA, visualizamos estas proteínas utilizando un anticuerpo primario que reconoce dicha etiqueta.

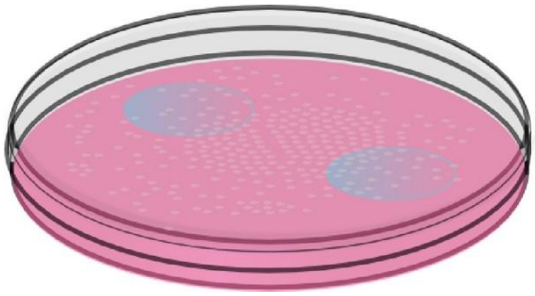


Figura 13: Esquema de cultivo de células sobre placas conteniendo vidrios cubreobjetos. Se plaquea la cantidad de células requeridas sobre una placa conteniendo vidrios cubreobjetos y medio de cultivo. Dependiendo la cantidad de células requeridas se utiliza habitualmente una placa p60 o pocillos de una placa multiwell MW6.

En la imagen de la Figura 14, muestra la presencia de HA-Akt1 WT en células HEK transfectadas, revelada por inmunofluorescencia. Este resultado no solo indica la correcta expresión de esta construcción, sino que también revela la puesta a punto satisfactoria de la técnica de inmunofluorescencia y de las condiciones de uso del anticuerpo para la detección de ésta y de las demás variantes con esta etiqueta.

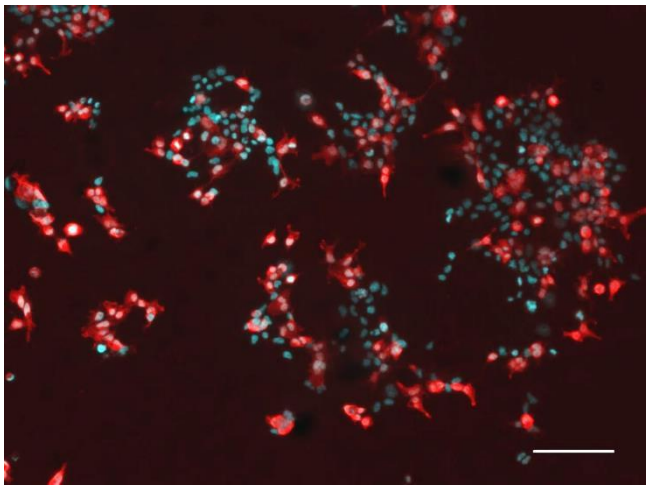


Figura 14: Detección de la expresión por inmunofluorescencia de la variante HA-Akt1 WT en células HEK transfectadas. Se realizó una inmunomarcación con anticuerpo primario contra la etiqueta HA, revelado con anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (Rojo) y la tinción de núcleos con DAPI (Cyan). La barra corresponde a 100 µm.

Posteriormente, para verificar la correcta expresión de los genes codificados en los vectores, pero ahora en nuestro sistema, realizamos una transfección de CME de la línea W4. Cultivamos las células en placas de 6 pocillos (MW6) a las que agregamos un vidrio cubreobjetos, del mismo modo que en la línea HEK (Figura 13), pero tratando previamente a los pocillos conteniendo los vidrios con una solución de gelatina como se describe en Materiales y Métodos. Luego de 48 horas desde el momento de la transfección, fijamos las células de los vidrios y por otra parte, cosechamos las proteínas totales del resto de la superficie de las placas transfectadas con cada variante. Visualizamos la expresión de cada una de ellas mediante las técnicas de inmunofluorescencia y Western blot.

En las Imágenes de la Figura 15A, se observa la correcta expresión en CME de las diferentes variantes de Akt1 reveladas por inmunofluorescencia con un anticuerpo primario contra la etiqueta HA. A su vez, en estas fotos se evidencia el bajo nivel de transfección que posee esta línea, de aproximadamente 5%, teniendo en cuenta también aquellas colonias que no presentan ninguna célula transfectada y que no se muestran en la figura. Esta baja eficiencia de transfección es una característica saliente de las CME, por lo que hay que tenerla en consideración para ciertos abordajes experimentales, como describiremos más adelante.

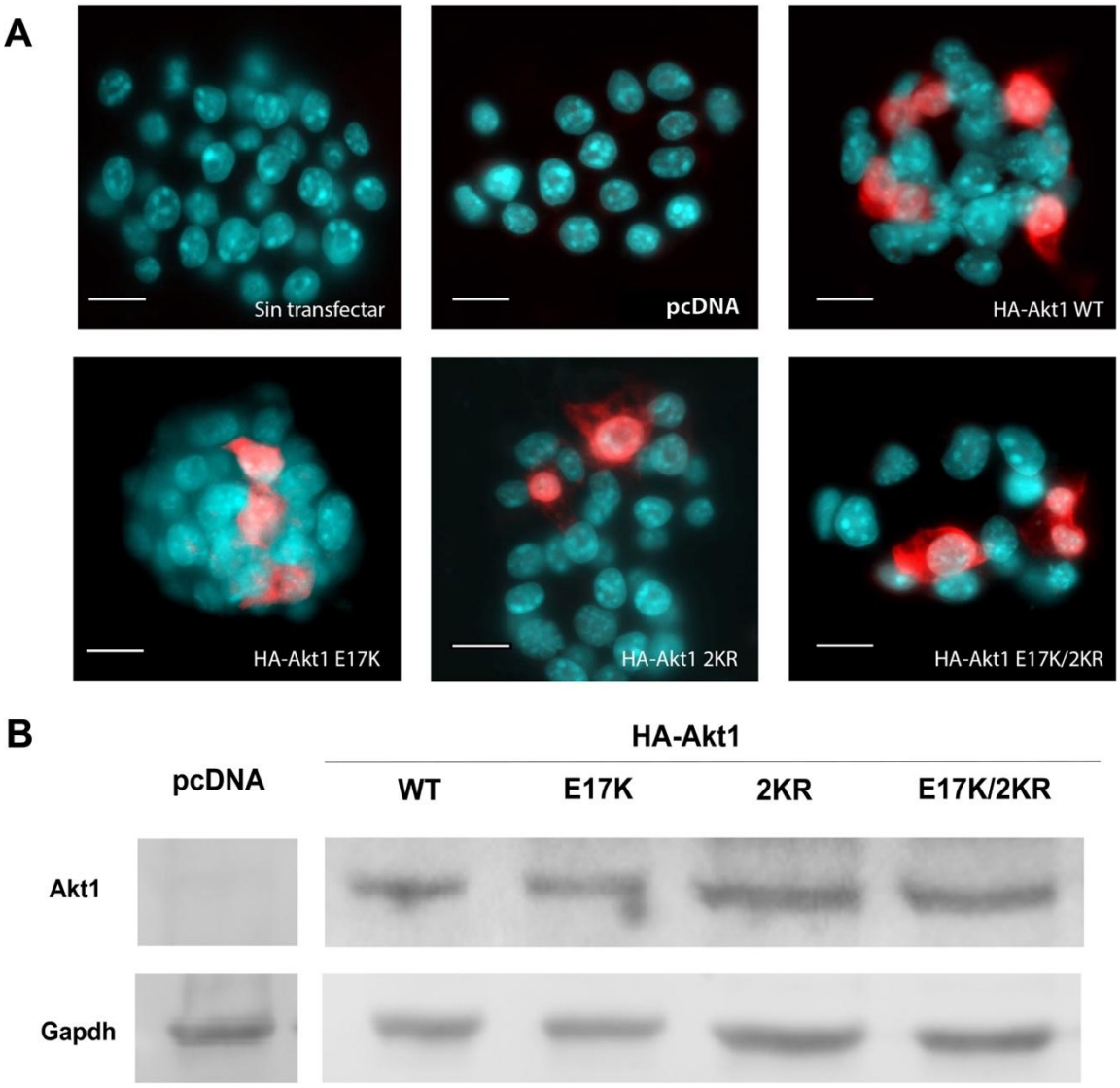


Figura 15: Detección de la expresión de las variantes de HA-Akt1 en CME transfectadas. A) Inmunofluorescencia. Las células fueron fijadas 48 horas luego de la transfección. Se realizó una inmunomarcación con anticuerpo primario contra la etiqueta HA, revelado con anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (Rojo) y la tinción de núcleos con DAPI (Cyan). La barra corresponde a 10 µm. B) Western Blot. Los extractos proteicos fueron corridos en un gel SDS-PAGE 12% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Para su revelado se utilizó un anticuerpo primario contra etiqueta HA y otro contra Gapdh y posteriormente, los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a HRP.

Por otro lado, a partir del extracto de proteínas totales, visualizamos la expresión y verificamos el peso molecular de las variantes de Akt1 etiquetadas con HA en nuestro sistema mediante la técnica Western Blot. Para ello, en primer lugar, realizamos la puesta a punto de las condiciones de uso del anticuerpo contra la etiqueta HA para esta técnica. Como se observa en la Figura 15B, detectamos la expresión de cada una de las variantes, distinguiendo una banda de aproximadamente 55kDa que corresponde a Akt1 etiquetada, en todos los extractos provenientes de células transfectadas, excepto en aquel que proviene de células transfectadas con el vector vacío, como esperábamos.

Con estos resultados en conjunto, concluimos que las diferentes variantes de Akt1 se expresan correctamente en CME, condición indispensable para estudiar su efecto, y que podemos detectar estas proteínas mediante Western blot e inmunofluorescencia. Asimismo, mediante esta última estrategia podemos además identificar las células transfectadas que, como describiremos más adelante, en algunos abordajes experimentales esto es de suma utilidad.

Diseño experimental para ensayos de expresión génica

Posteriormente, realizamos ensayos en donde evaluamos el efecto de las variantes de Akt1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas, sobre la expresión génica de CME. Particularmente, debido a la baja eficiencia de transfección de este tipo celular, en este trabajo fueron necesarios dos tipos de abordajes experimentales para este fin (Figura 16). El primero, al que denominamos *Sin Selección*, involucra experimentos en donde las células son transfectadas y, luego de 48 ó 72 horas, las mismas son cosechadas o fijadas según la técnica utilizada. Por otro lado, denominamos experimentos *Con Selección* a aquellos donde, a las 24 horas luego de la transfección, se realizó un tratamiento de las células por 48 horas, con medio de cultivo selectivo conteniendo antibiótico, antes de cosechar las células para su posterior análisis. El objetivo del mismo es el enriquecimiento de la población en células transfectadas.

Para las técnicas en las que empleamos sistemas reporteros utilizamos el abordaje *Sin Selección* (Figura 16A). En este trabajo medimos actividad Luciferasa con el propósito de estudiar la actividad del promotor de Nanog mediante una construcción reportera. Por otra parte, contamos con una herramienta para estudiar el splicing del gen BclX que consiste en un minigen reportero de splicing. Éste no está descripto en este trabajo, pero planeamos utilizarlo en el futuro cercano. Finalmente, en los casos en los que detectamos la presencia de las construcciones etiquetadas mediante Western blot e inmunofluorescencia, también utilizamos el abordaje sin selección. Si bien, como mostramos anteriormente, el nivel de transfección de CME es muy bajo, estas estrategias involucran la detección de un producto de fácil medición y que proviene únicamente del vector reportero transfectado. Por esta razón, las células no transfectadas no interfieren en la detección y cuantificación del mismo. Dado el tamaño similar de los vectores utilizados para cotransfectar, consideramos que cada célula que incorpora un plásmido, incorpora los demás y todos los genes codificados en ellos son capaces

de expresarse correctamente. Para el caso de la cuantificación por inmunofluorescencia también utilizamos este abordaje experimental. Si bien no empleamos un sistema reportero, el hecho de tener coexistiendo células transfectadas y no transfectadas y poder identificarlas, nos permitió comparar la expresión de los genes endógenos evaluados entre ambas poblaciones al mismo tiempo.

Por otro lado, utilizaremos el abordaje de experimentos *Con Selección* (Figura 16B) en el caso del análisis de los niveles de ARN mensajero de genes endógenos, abordaje que también puede utilizarse para analizar el efecto sobre la expresión a nivel proteína por Western blot. Debido al bajo nivel de transfección es necesario enriquecer la población en células transfectadas ya que, en este caso, la técnica no nos permite detectar sólo el producto de aquellas células transfectadas como en las técnicas mencionadas anteriormente. Para ello, seleccionaremos las células transfectadas utilizando un medio de cultivo selectivo conteniendo Blasticidina, ya que los vectores de expresión de las variantes de Akt1 contienen el gen de resistencia al mismo. De esta manera evitamos una dilución del efecto sobre la expresión génica que pueda tener la sobreexpresión de las variantes, y la interferencia que producirían el ARN y las proteínas provenientes de las células sin transfectar.

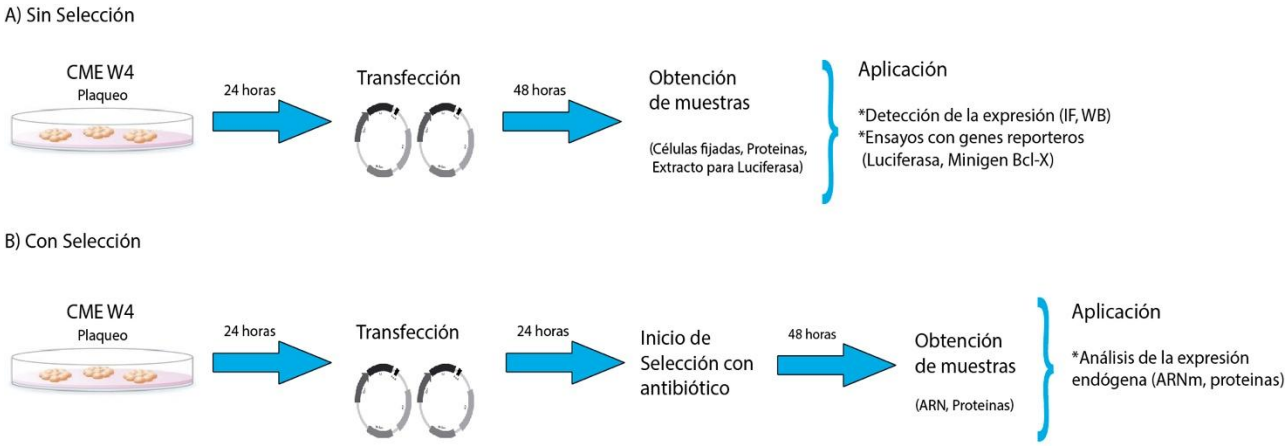


Figura 16: Abordaje experimental para análisis de la expresión génica. Las células son transfectadas luego de 24 horas del plaqueo. A) *Sin selección*. Las muestras se obtienen 48 horas luego de la transfección. B) *Con selección*. Luego de la transfección, las células son sometidas a tratamiento con antibiótico con el propósito de seleccionar las células transfectadas. Las muestras se obtienen 48 horas luego del inicio de la selección.

Segunda Parte:
Efecto de la SUMOilación de Akt1 sobre el factor de transcripción fundamental Nanog

Efecto sobre el promotor de Nanog

Sabiendo que la quinasa Akt es clave en el mantenimiento de la expresión de la red de regulación génica que mantiene la pluripotencia en CME[38,43,61,70], en especial los factores Oct4, Sox2 y Nanog, decidimos comenzar analizando el efecto de la SUMOilación diferencial de las variantes de Akt1 sobre uno de ellos. Para este trabajo hicimos foco sobre el efecto en la expresión sobre el gen Nanog. Para ello, utilizamos un vector reportero que contiene al gen de la enzima Luciferasa de *Photinus pyralis*, regulado por la región promotora del gen de Nanog de ratón, por lo que esta construcción es utilizada habitualmente como reportera de la expresión de este factor de transcripción. Realizamos una co-transfección de cada una de las variantes de Akt1 junto con este vector reportero y, pasadas 48hs, realizamos la lisis de las células obteniendo un extracto proteico a partir del cual determinamos la actividad del gen reprotero. Normalizamos los valores obtenidos con la masa de proteínas totales del extracto celular y relativizamos los resultados al valor de luminiscencia del extracto correspondiente a las células transfectadas con el vector vacío. En este ensayo debimos utilizar el valor de proteínas totales como normalizador en lugar de otro gen reportero que contemple además las posibles diferencias en los niveles de transfección. Esto se debió a que detectamos que los promotores de los vectores que teníamos a disposición, codificantes para otros genes reporteros, entre ellos el de la Luciferasa de *Renilla reniformis,* también eran regulados por Akt1. Aun así, para evaluar cualitativamente los niveles de transfección de cada variante y verificar que la misma sea homogénea en todos los casos, realizamos en paralelo la transfección de células cultivadas sobre cubreobjetos a fin de analizar mediante inmunofluorescencia la proporción de células transfectadas en cada caso. Los resultados de este ensayo pueden observarse en la Figura 17.

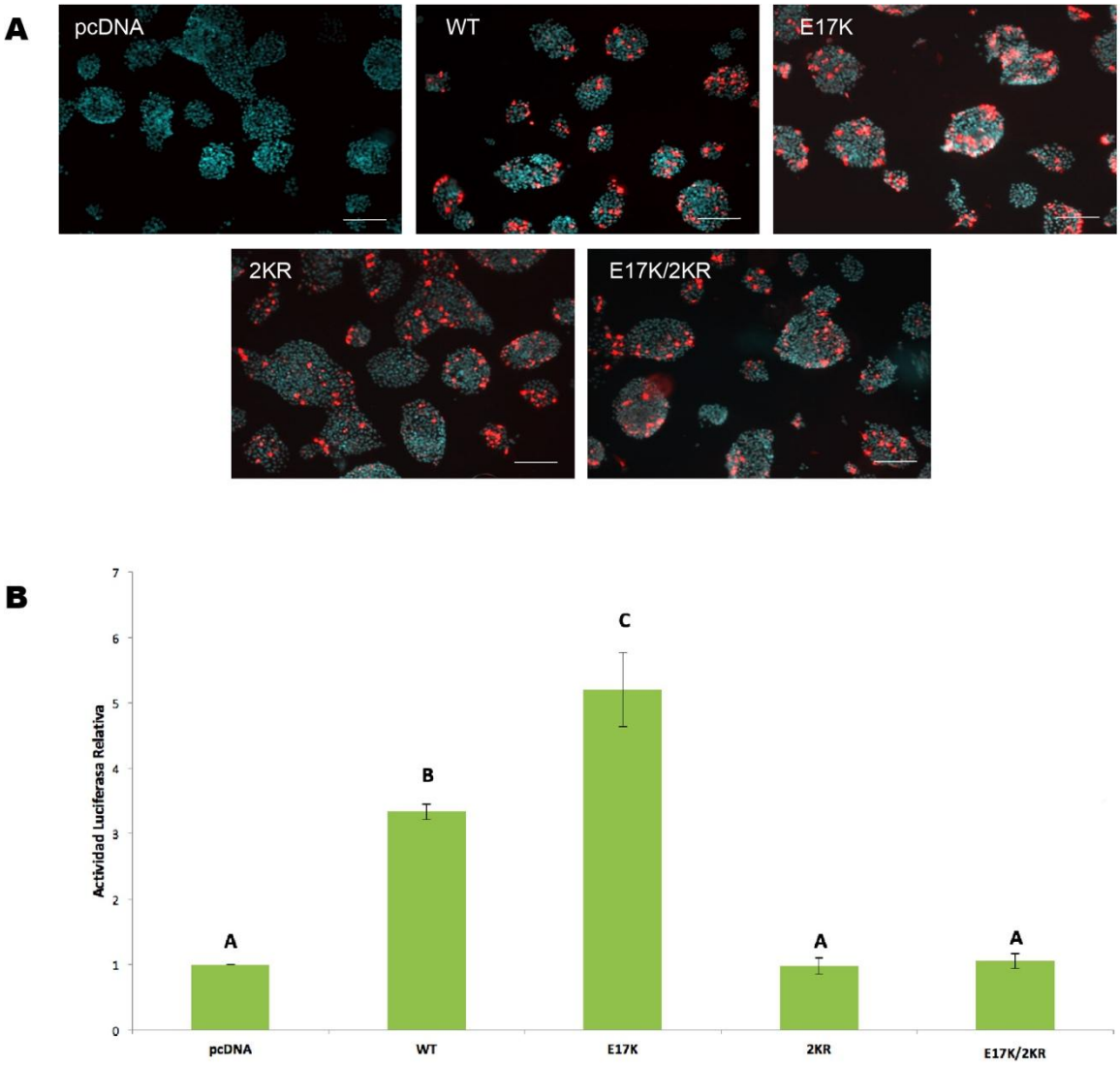


Figura 17: Efecto de las diferentes variantes de Akt1 sobre el promotor de Nanog y niveles de transfección. A) Inmunofluorescencia. Se realizó una inmunomarcación con anticuerpo primario contra la etiqueta HA, revelado con anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (Rojo) y la tinción de núcleos con DAPI (Cyan). La barra corresponde a 100µm. B) Se midió la actividad de Luciferasa de *Photinus pyralis* del vector Nanog5P reporter co-transfectado con las diferentes variantes de Akt1 en la línea de CME W4. La actividad de Luciferasa fue normalizada a la masa de proteínas totales. El resultado se muestra como la media ± SEM de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre experimentos ($p<0.05$).

En primer lugar, como se observa en la Figura 17A, verificamos que los niveles de transfección fueron homogéneos entre todas las variantes, corroborando que los efectos que podamos observar sobre el sistema reportero no se deban a una eficiencia de transfección diferencial de estas mutantes, sino a su actividad quinasa. Habiendo confirmado que los niveles de transfección fueron similares para las diferentes variantes de Akt1, analizamos su efecto sobre la actividad del promotor de Nanog. Como se muestra en la Figura 17B, observamos que la sobreexpresión de Akt1 en su versión salvaje (wt) aumentó

significativamente la actividad del promotor de Nanog en la construcción reportera con respecto al vector vacío (pcDNA). Estos resultados son consistentes con lo reportado previamente, donde fue demostrado que la activación de la vía Pi3K/Akt induce el aumento de la expresión endógena del ARNm y de la proteína de Nanog en células madre tumorales de pulmón[41]. Sorprendentemente, la sobreexpresión de la mutante E17K, cuya SUMOilación se encuentra aumentada y por lo tanto también su actividad quinasa[52,56], incrementó significativamente la actividad Luciferasa con respecto al vector vacío. A su vez, este incremento resultó significativamente mayor que los valores obtenidos en la wt, indicando que la SUMOilación de Akt1 aumentaría la actividad del promotor de Nanog. Contrariamente, las variantes 2KR y E17K/2KR, mutantes cuyas lisinas blanco de SUMOilación están sustituidas por argininas, por lo que no pueden SUMOilarse en dichos residuos, no observamos diferencias significativas con respecto al vector vacío. Esto es sumamente interesante, debido a que, si bien Akt1 está siendo sobreexpresada y aunque su SUMOilación se encuentra disminuida, su actividad quinasa no disminuiría según lo reportado[52]. En el caso de que la actividad de Akt sobre el promotor de Nanog fuese independiente de la SUMOilación en presencia de las mutantes 2KR y E17K/2KR, hubiésemos esperado obtener valores similares a los de las células transfectadas con la wt y no con el vector vacío. Contrariamente, la pérdida de inducción encontrada en estos casos sugiere que la SUMOilación de esta quinasa podría ser necesaria para modular la expresión del FT fundamental Nanog.

Efecto sobre los niveles endógenos de proteína de Nanog

A partir de los resultados anteriores, donde evaluamos los efectos de las variantes de Akt1 sobre la actividad del promotor de Nanog mediante un sistema reportero, continuamos con la evaluación de los efectos de estas variantes, pero ahora sobre los niveles endógenos de la proteína codificada por este gen. Para este fin, decidimos utilizar en primer lugar, la técnica de inmunofluorescencia para visualizar la proteína Nanog. Esta estrategia posee la ventaja de poder diferenciar las células transfectadas de las que no lo están, mediante inmunomarcación de la etiqueta HA que se encuentra sólo en las células transfectadas. A su vez, la proteína Nanog se visualiza en todas las células. De esta manera, es posible analizar los niveles de Nanog en ambas poblaciones por separado, dentro del mismo preparado. Por estas razones, decidimos utilizar en principio la técnica de inmunofluorescencia para este experimento. No descartamos la posibilidad de realizar Western blot en el futuro para complementar este abordaje experimental, utilizando una mayor cantidad de células y seleccionando las células transfectadas con antibiótico.

Como mencionamos anteriormente, las variantes de Akt1 se encuentran marcadas con la etiqueta HA. La expresión de las variantes etiquetadas en células transfectadas es fácilmente detectable utilizando un anticuerpo específico para dicha etiqueta como lo demostramos en la Figura 15. Para este experimento, realizamos la transfección de células de línea de CME, W4, con las diferentes variantes de Akt1. Para ello, las células fueron plaqueadas sobre vidrios cubreobjetos dispuestos en las placas donde normalmente son cultivadas. El vidrio, como el

resto de la placa, es recubierto con gelatina donde se dispone la cantidad de células requerida según la superficie. El día posterior al plaqueo se realiza la transfección de las células con las variantes de Akt1. Dos días luego de transfección, las células son fijadas y los vidrios son procesados según el protocolo de inmunofluorescencia. Para este experimento, utilizamos dos anticuerpos primarios en simultaneo. El primero de ellos, el anticuerpo contra la etiqueta HA, marca aquellas células fijadas sobre el vidrio que incorporaron y expresaron la variante de Akt1 transfectada. El segundo anticuerpo, contra la proteína de Nanog, marca todas las células debido a que este gen es expresado en CME. A su vez, los núcleos celulares son teñidos con el agente DAPI. Cada uno de los anticuerpos es revelado con anticuerpos secundarios acoplados a diferentes fluoróforos, lo que permite revelar y fotografiar cada uno por separado en el mismo vidrio, simplemente irradiando la muestra con luz de diferente longitud de onda y colectando la luz de la longitud de onda correspondiente para cada fluoróforo. Mediante el uso de herramientas informáticas que mencionaremos más adelante, se puede diferenciar por un lado aquellas células transfectadas de las que no, y por otro, cuantificar los niveles de Nanog en cada célula midiendo la intensidad de fluorescencia de cada una de ellas.

Una vez procesados los vidrios, los mismos se fotografían en un microscopio de epifluorescencia. Se elige y se enfoca un campo observando los núcleos celulares irradiando la muestra con luz de longitud de onda donde se excita el compuesto DAPI. A diferencia de un microscopio confocal, el microscopio de epifluorescencia convencional colecta fotones provenientes más allá del plano focal. Por esta razón, dado que se obtiene una imagen bidimensional de fotones que provienen de tres dimensiones, tratamos de elegir los campos en donde las células se encuentren lo más separadas y en monocapa posible, para que no interfieran entre ellas en las mediciones. Luego de fotografiar los núcleos celulares, se tomaron fotografías excitando la muestra con las demás longitudes de onda que excitan los fluoróforos acoplados a los anticuerpos secundarios para revelarlos, manteniendo la misma configuración de iluminación y adquisición de imágenes para cada fluoróforo en todas las muestras. Como resultado, se obtuvieron tres imágenes de cada campo que corresponden a los tres canales fotografiados. En la Figura 18 se muestran resultados preliminares de este experimento. Las imágenes corresponden a campos representativos de vidrios con células fijadas previamente transfectadas con las diferentes variantes de Akt1 o con el vector vacío. En el canal rojo, correspondiente a la señal de la etiqueta HA, se observan aquellas células transfectadas. Por otro lado, en el canal verde se observa la señal correspondiente a la proteína de Nanog endógena, presente en todas las células, transfectadas o no.

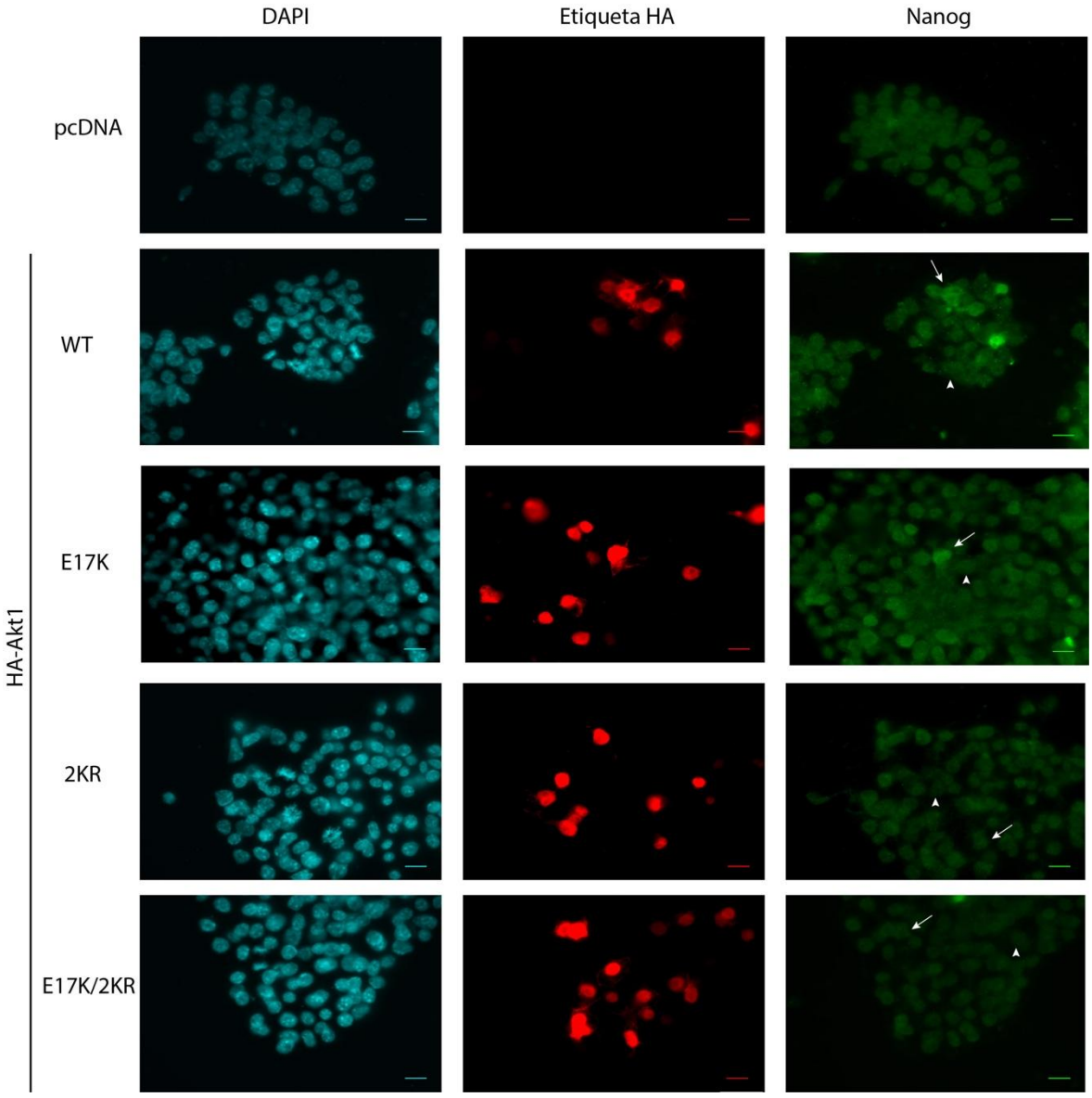


Figura 18: Expresión de Nanog en células transfectadas con las variantes de Akt1. CME de la línea W4 fueron plaqueadas sobre vidrios cubreobjetos y transfectadas con los vectores de expresión de las diferentes variantes de Akt. Se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos contra Nanog (verde) y contra la etiqueta HA (rojo), esto último para identificar las células transfectadas en cada caso. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas indican una célula transfectada y las puntas de flecha indican células sin transfectar como ejemplos en cada caso. La barra de escala corresponde a 10 µm.

En primer lugar, en aquellas células transfectadas con en el vector vacío, se observa una expresión de Nanog homogénea en todas las células de la misma colonia. Debido a que en este caso, las células transfectadas no expresan la etiqueta HA, no se pueden distinguir las células transfectadas de las que no lo están en una misma colonia. Sin embargo, el hecho de no tener variabilidad en los niveles de esta proteína indica que el proceso de transfección no tiene un efecto *per se* sobre los mismos. Por otro lado, tanto en las células transfectadas con HA-Akt1 wt como con E17K, variantes cuya SUMOilación es normal o aumentada respectivamente, se observa un aumento en la intensidad de la señal de Nanog en ambos

casos. En el caso de las células transfectadas con las variantes 2KR y E17K/2KR, cuya SUMOilación se encuentra disminuida, no se observa este aumento como en los casos anteriores, sino que se observa una expresión homogénea en todo el campo, como en el caso de las células transfectadas con el vector vacío.

Durante el análisis de las imágenes obtenidas en este experimento advertimos la presencia de células con diferente intensidad en la señal de HA. Asimismo, notamos un correlato entre ésta y la señal de Nanog. Es decir, notamos que no solo existe una diferencia en la intensidad de la señal de Nanog de las células transfectadas con las variantes wt y E17K en comparación con las células de la misma colonia que no fueron transfectadas, sino que además, en algunos casos vemos que existen diferencias entre las células transfectadas. Esta observación se ejemplifica en la Figura 19. Observamos que en estos casos, los niveles de Nanog parecen estar relacionados con la intensidad de la señal de HA, sugiriendo que el efecto observado podría responder a la cantidad de Akt expresada, tanto wt como E17K. Si bien en este primer análisis no consideramos esas diferencias y analizamos en conjunto la población de células transfectadas, planeamos estudiarlas en el futuro, mediante cuantificación de ambas señales en cada célula de manera individual en lugar de realizar un promedio de intensidad por célula, como lo hicimos en este trabajo, como describiremos más adelante.

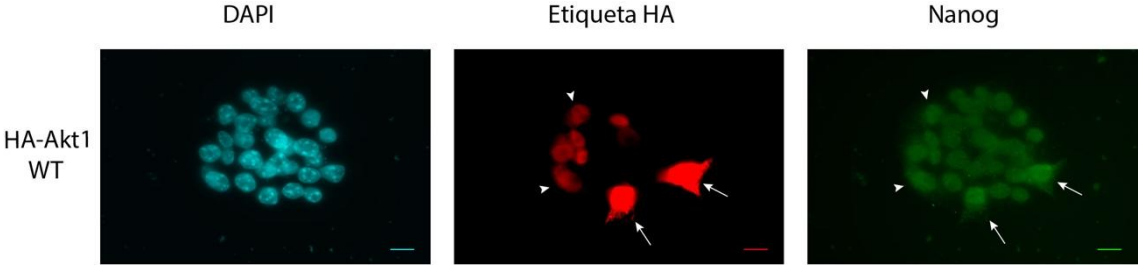


Figura 19: Expresión de Nanog en células con diferentes niveles de transfección de HA-Akt1-WT. CME de la línea W4 fueron procesadas de la misma manera indicada en la figura anterior. En los paneles central y derecho (rojo: etiqueta HA y verde: Nanog), las flechas indican células transfectadas con alto nivel de expresión de HA-Akt1-WT y las puntas de flecha indican células con bajo nivel de expresión de la misma como ejemplos de ambos casos, a modo comparativo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala corresponde a 10 µm.

A partir de estos resultados cualitativos que acabamos de describir, decimos realizar un abordaje cuantitativo de las imágenes obtenidas. Las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando el programa FIJI. Este análisis se realiza asegurándose de que todas las imágenes sean procesadas de la misma manera. Como se observa esquemáticamente en la Figura 20, a partir de las imágenes originales se derivaron máscaras binarias, es decir, imágenes que contienen solo dos valores, blanco o negro. Sobre estas máscaras se realizaron operaciones aritméticas de adición o sustracción entre ellas y se obtuvieron dos máscaras finales que corresponden a células transfectadas y a células sin transfectar. El objetivo de la creación de estas máscaras es poder determinar la región de interés de cada fotografía a cuantificar. La máscara de células transfectadas corresponde a las células en la colonia marcadas con el anticuerpo HA, indicando la expresión de los vectores de las variantes de Akt1. Utilizando esta máscara, estimamos en estas células la cantidad de Nanog mediante

cuantificación de la intensidad de fluorescencia en la foto original. Por otro lado, la máscara de células sin transfectar corresponde a células que no fueron marcadas con el anticuerpo de HA y por lo tanto, consideramos que no fueron transfectadas porque no expresan la proteína Akt exógena. En este caso, la presencia de células transfectadas y no transfectadas en la misma colonia, es de utilidad para poder comparar la cantidad de Nanog entre estas poblaciones celulares.

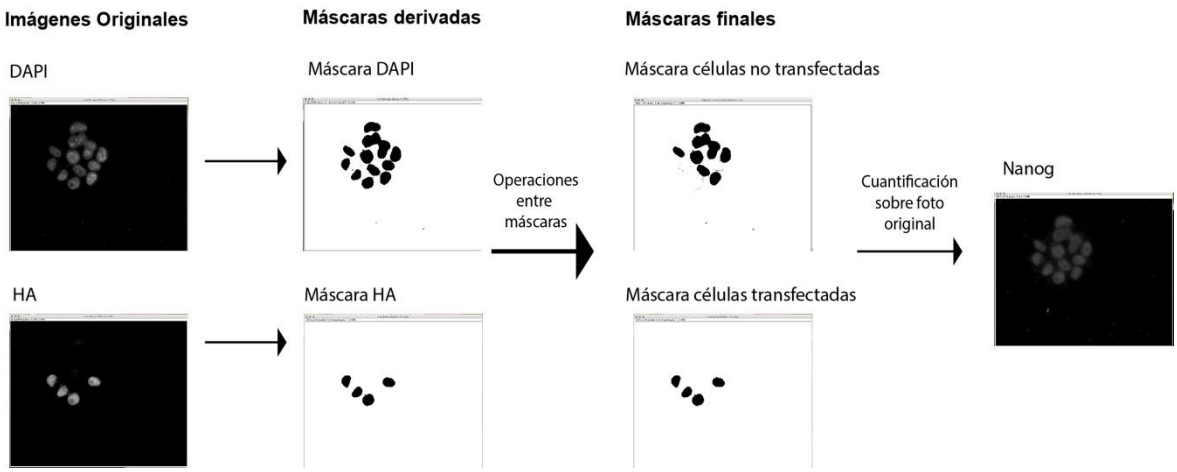


Figura 20: Esquema de procesamiento de imágenes en FIJI. A partir de las imágenes originales se crean máscaras de la señal proveniente de los núcleos celulares (DAPI), las células transfectadas (HA) y la señal de Nanog. A partir de operaciones aritméticas entre estas máscaras, se obtienen las máscaras finales de células transfectadas o no, para luego cuantificar sobre la imagen original la señal de Nanog.

En este experimento, cuantificamos la intensidad de fluorescencia tanto de las células transfectadas con cada una de las variantes, como de las células sin transfectar en cada muestra. En esta primera réplica del experimento cuantificamos aproximadamente 200 células por condición y calculamos la media aritmética de los valores de intensidad por célula en cada caso. Realizamos el cociente entre ambos valores, obteniendo resultados relativizados a células no transfectadas dentro de la misma condición experimental. El efecto de cada una de las variantes de Akt1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas sobre la expresión endógena de la proteína Nanog, se muestra en la Figura 21.

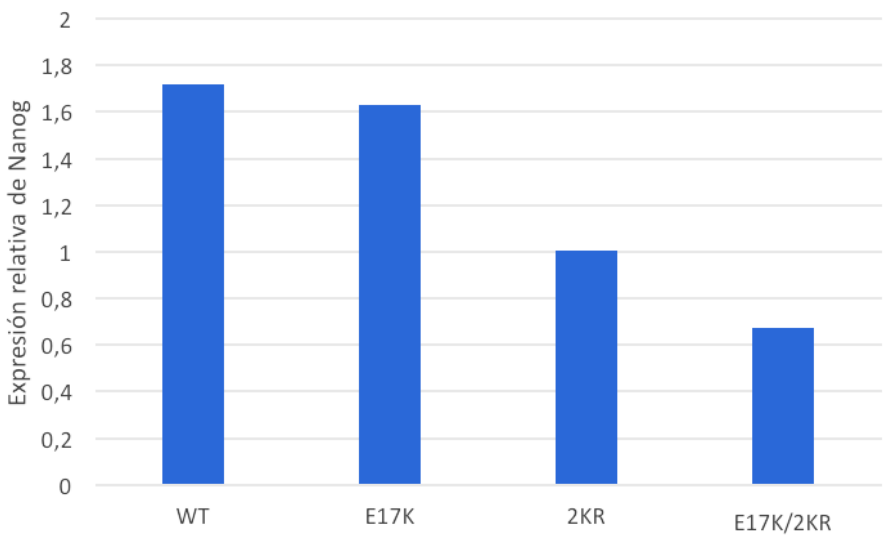


Figura 21: Expresión relativa de Nanog en células transfectadas con las variantes de Akt1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas. Células de la línea W4 fueron plaqueadas sobre vidrios cubreobjetos y transfectadas con los vectores de expresión de las diferentes variantes de Akt1. La expresión de Nanog fue medida por inmunofluorescencia y relativizada a los niveles observados en las células sin transfectar de cada condición. Se muestra el resultado de un experimento en el que se cuantificó la fluorescencia de al menos 200 células/campo de al menos 5 campos para cada condición.

Los resultados preliminares de este abordaje experimental son compatibles con las conclusiones obtenidas a partir de la evaluación de la actividad del promotor de este gen. Como se observa en la Figura 21, en las células transfectadas con la versión wt de Akt1 observamos un aumento de la expresión de Nanog con respecto a las células sin transfectar. Notoriamente, este aumento no se observa en las células transfectadas tanto con la variante 2KR como la E17K/2KR, variantes cuya SUMOilación se encuentra disminuida. Dado que en estos casos los niveles de expresión de Nanog son similares a los de las células sin transfectar, esto indicaría que la SUMOilación de Akt es necesaria para producir la inducción de este factor de transcripción. Por otra parte, en las células que fueron transfectadas con la variante E17K, cuya SUMOilación y actividad se encuentran aumentadas, encontramos un aumento en los niveles de Nanog similar al obtenido en las células transfectadas con la versión wt. De acuerdo a lo reportado[61] sobre la variante E17K en células madre tumorales y a nuestros resultados obtenidos en el ensayo de la actividad del promotor, esperábamos mayor inducción de Nanog con esta variante respecto a la wt. Es posible que la sobreexpresión de la variante wt sea suficiente para alcanzar el nivel máximo de inducción posible para este gen a nivel endógeno en nuestro sistema con respecto al basal. Especulamos que el aumento de la expresión de Nanog por parte de la sobreexpresión de la variante E17K se encontraría afectado por limitaciones endógenas debido a que en las CME la expresión de este factor de transcripción es elevada *per se*. Por estos motivos, es probable que una mayor SUMOilación de Akt1 no pueda producir una mayor inducción de Nanog en nuestro sistema, de todos modos, nuestros resultados preliminares sugieren que esta modificación post-traduccional es necesaria para producir este efecto. Por último, destacamos que en la condición en la cual las células fueron transfectadas con el vector vacío observamos una expresión de Nanog homogénea. Si bien en

este caso no podemos identificar cuáles son las células transfectadas, por lo cual no podemos cuantificar la expresión de Nanog relativa a células sin transfectar como lo hicimos para los demás casos, una expresión de Nanog homogénea indica que la transfección con el vector vacío no modifica la expresión de Nanog, por lo cual, las diferencias que detectamos con las diferentes variantes de Akt1 se deben a la sobreexpresión de las mismas y no al proceso de transfección *per se*. Estas conclusiones son sustentadas además por los resultados obtenidos con las variantes 2KR y 2KR/E17K, donde la disminución en la SUMOilación determinó pérdida del efecto de inducción de Nanog.

Si bien se requieren más réplicas de este ensayo para poder obtener conclusiones, es interesante observar estos resultados, que como mencionamos presentan una tendencia que va en el mismo sentido que nuestros resultados previos. Tal como lo mencionamos anteriormente, esto indicaría que el efecto de la sobreexpresión de Akt1 sobre los niveles de proteína de Nanog en nuestro sistema, dependerían de la SUMOilación de esta quinasa.

Efecto sobre los niveles endógenos del ARN mensajero de Nanog

Posteriormente, a partir de los resultados anteriores, nos propusimos evaluar los efectos de la SUMOilación diferencial de Akt1 sobre el FT fundamental de CMP Nanog a nivel transcripcional. Debido a que esto implica analizar los niveles endógenos de ARN mensajeros, decidimos utilizar el abordaje experimental *Con Selección*, descripto anteriormente en la Figura 16B. Este abordaje nos permitió enriquecer la población de células a analizar en aquellas células transfectadas, evitando así la interferencia y la posible dilución del efecto sobre la expresión génica que puedan tener las variantes de Akt sobre la expresión de Nanog, debido a la presencia de ARN mensajero proveniente de las células que no fueron transfectadas.

Como fue descripto anteriormente, el ADN copia de Akt1 en su versión wt, fue clonado originalmente en el vector pcDNA6, el cual, a su vez contiene el gen de resistencia al antibiótico Blasticidina de expresión constitutiva. Debido a que todas las variantes utilizadas en este trabajo fueron hechas sobre este clon original, las mismas poseen el gen de selección mencionado. Esto nos permitió diseñar el abordaje *Con selección* para este experimento, utilizando al antibiótico Blasticidina como agente de selección.

Comenzamos por establecer las condiciones de selección con Blasticidina en la línea de CME W4. El rango de uso de este agente varía según el tipo celular utilizado y el objetivo de la selección, ya que puede ser una selección corta para evaluar la expresión en el contexto de una transfección transitoria, como en nuestro caso, o prolongada para generar líneas estables. No encontramos antecedentes del uso de este antibiótico para selección de CME de ratón a corto plazo. Debido a que solo hallamos un reporte del uso de este antibiótico en CME humanas en el que los autores utilizaron una concentración de Blasticidina de 400 µg/ml[71], decidimos realizar un primer ensayo con dicha concentración. Para ello, tratamos durante 48

hs a células transfectadas con uno de los vectores de las variantes de Akt, específicamente con la variante wt, y como control, también tratamos a células sin transfectar.

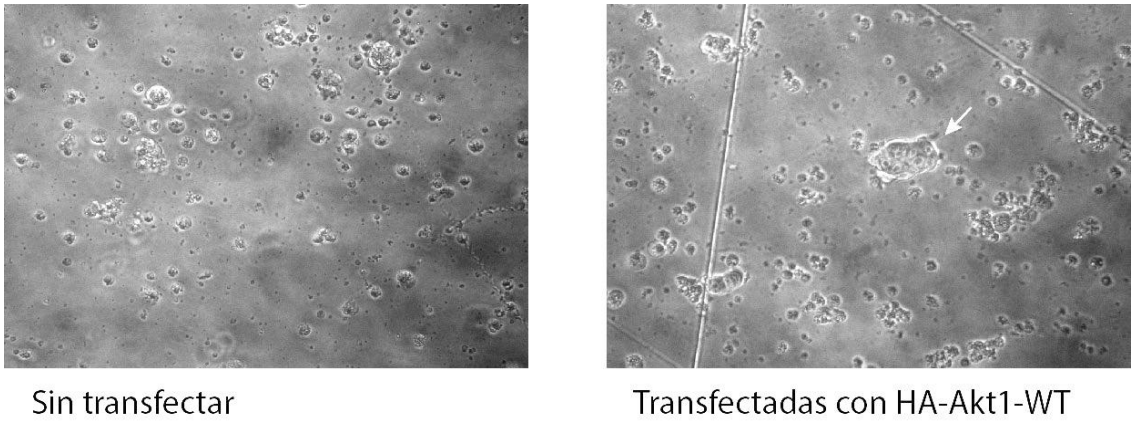


Figura 22: Ensayo de selección y resistencia de las células transfectadas con el vector HA-Akt1-WT al antibiótico Blasticidina. Luego de 24 horas del plaqueo de las células, las mismas fueron transfectadas o no, según lo indicado. Al siguiente día, fueron expuestas a medio de propagación conteniendo Blasticidina con una concentración de 400 µg/ml por 48 horas. Imágenes de microscopía de contraste de fase obtenidas con objetivo de 100x. La flecha señala una colonia de CME que sobrevivió al tratamiento con blasticidina.

Como se observa en la Figura 22, 48 horas luego del inicio de la exposición al antibiótico Blasticidina a una concentración de 400 µg/ml se produjo la muerte de la totalidad de las células sin transfectar, evidenciando la efectividad del antibiótico. Contrariamente, en el panel derecho, correspondiente a las células transfectadas con el vector HA-Akt1-WT, se visualizan colonias resistentes a dicho antibiótico. Estos resultados evidencian la expresión del gen de resistencia codificada en dicho vector. Este primer ensayo estableció las bases para continuar con la puesta a punto del protocolo del modelo experimental *Con Selección*.

Posteriormente, con el objetivo de identificar la mínima concentración de antibiótico necesaria para realizar la selección de las células transfectadas en el tiempo necesario para nuestro diseño experimental, realizamos una curva de sensibilidad a diferentes concentraciones de dicho antibiótico. Empezamos evaluando la sensibilidad de las células a un rango de concentraciones entre 100 y 400 µg/ml de Blasticidina durante 48 horas. Analizamos la muerte celular tanto por el análisis de la morfología mediante microscopía óptica como por cuantificación de la masa celular remanente mediante tinción con Cristal violeta.

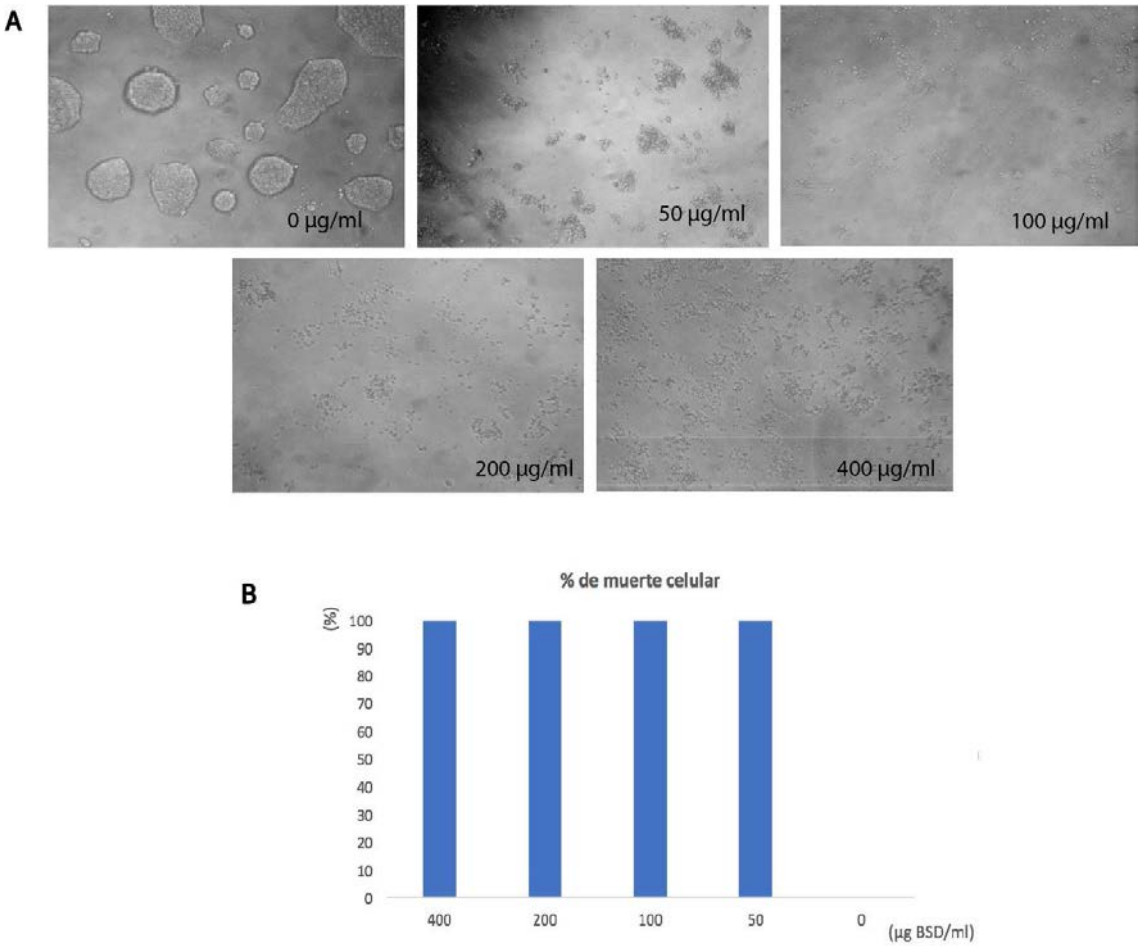


Figura 23: Curva de sensibilidad al antibiótico Blasticidina de la línea de CME W4 (0 a 400 µg/ml). Luego de 24 horas del plaqueo de las células, las mismas fueron expuestas a medio de propagación conteniendo Blasticidina en la concentración indicada, por 48 horas. A) Imágenes de microscopía de contraste de fase obtenidas con objetivo de 400x. B) Tinción con Cristal violeta. Se muestra un gráfico de barras representando el porcentaje (%) de muerte celular. El mismo fue calculado con el promedio del valor de A_{595nm} de 4 réplicas técnicas de un experimento correspondientes a las células tratadas con cada concentración de Blasticidina, al que se le restó el valor del blanco y luego se lo relativizó a la condición control sin tratar con antibiótico (0 µg/ml, considerado 0% de muerte celular).

Como se observa en la Figura 23, todas las concentraciones utilizadas produjeron la muerte celular del 100% de las células plaqueadas. Esto se evidencia tanto por la observación mediante microscopía (Figura 23A), como por la tinción con Cristal Violeta (Figura 23B). Se observa que la mínima concentración utilizada en esta curva, 50 µg/ml, fue suficiente para alcanzar el 100% de muerte celular en las células plaqueadas. Debido a que esta concentración fue el punto más bajo de nuestra curva, no podemos asegurar que ésta sea la mínima concentración de antibiótico en la que se alcance la muerte del total de la población celular no resistente. Por este motivo, decidimos realizar una segunda curva con concentraciones más bajas que las utilizadas anteriormente. En este caso, utilizamos 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml de antibiótico (Figura 24).

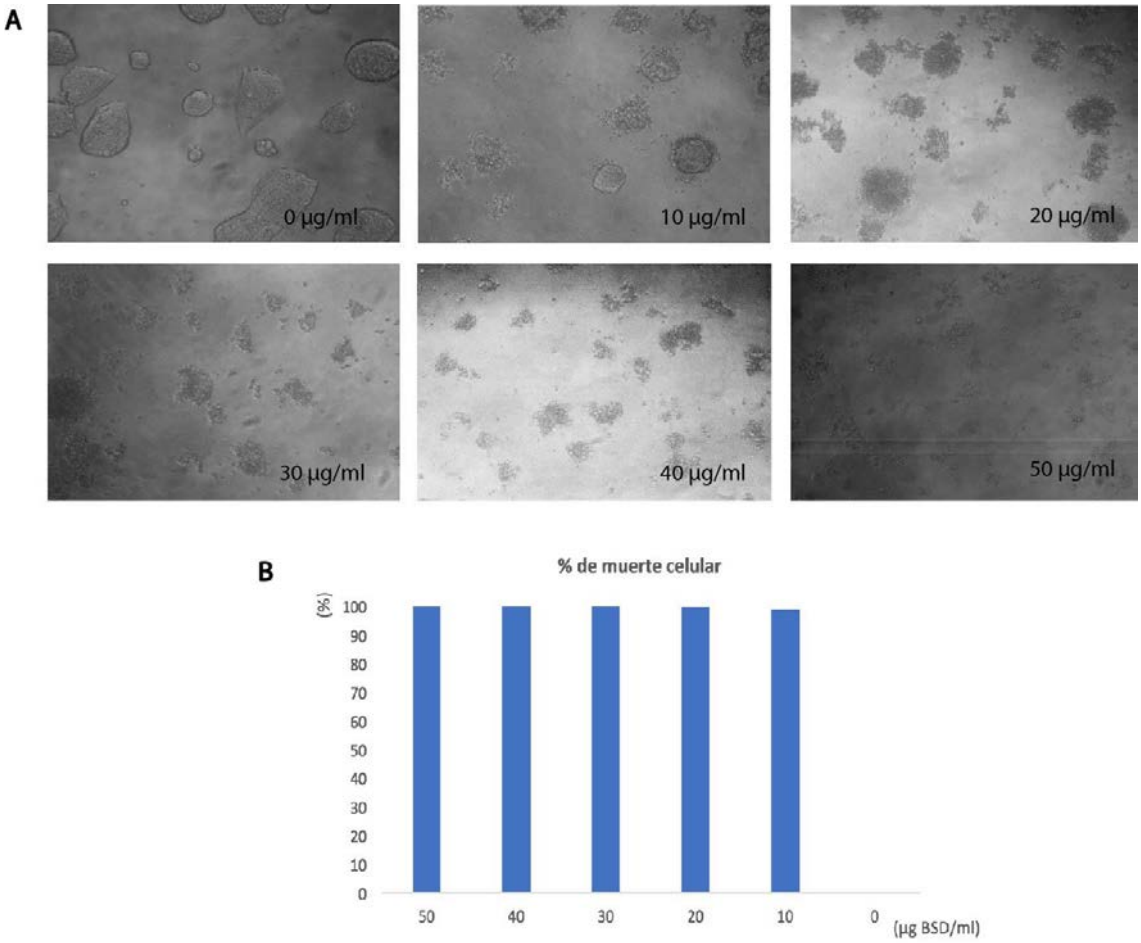


Figura 24: Curva de sensibilidad al antibiótico Blasticidina de la línea de CME W4 (0 a 50 µg/ml). Luego de 24 horas del plaqueo de las células, las mismas fueron expuestas a medio de propagación conteniendo Blasticidina en la concentración indicada, por 48 horas. A) Imágenes de microscopía de contraste de fase obtenidas con objetivo de 400x. B) Tinción con Cristal violeta. Se muestra un gráfico de barras del porcentaje (%) de muerte celular. El mismo fue calculado con el promedio del valor de A_{595nm} de 4 réplicas técnicas de un experimento correspondientes a las células tratadas con cada concentración de Blasticidina, al que se le restó el valor del blanco y luego se lo relativizó a la condición control sin tratar con antibiótico (0 µg/ml, considerado 0% de muerte celular).

Como se observa en las imágenes de la Figura 24A, en las concentraciones más altas evaluadas (30, 40 y 50 µg/ml) se evidencia la muerte de la totalidad de las células plaqueadas. Sin embargo, en las concentraciones más bajas (10 y 20 µg/ml) debido a la morfología de los restos de colonias, no resulta claro el efecto por lo que podrían quedar células vivas. Para analizar esto, cuantificamos la masa celular remanente mediante tinción con Cristal violeta (Figura 24B). Estos resultados indican que todas las concentraciones del antibiótico utilizadas en esta determinación, al igual que lo ocurrido con las concentraciones evaluadas anteriormente, resultaron letales en 48 horas para esta línea celular. Si bien la morfología de los restos es similar a una colonia de CME viva, los sucesivos lavados con PBS los terminan de desprender de la placa, indicando que lo que se observa en las fotos son solo restos de células muertas pegadas en la superficie de la placa. Nuevamente, debido a que esta concentración fue el punto más bajo de nuestra curva, no podemos asegurar que sea la mínima

concentración de antibiótico en la que se alcance la muerte del total de la población celular. Por este motivo, decidimos realizar una tercera curva con concentraciones aún más bajas que las utilizadas anteriormente. En este caso, realizamos una curva con concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 µg/ml de Blasticidina (Figura 25).

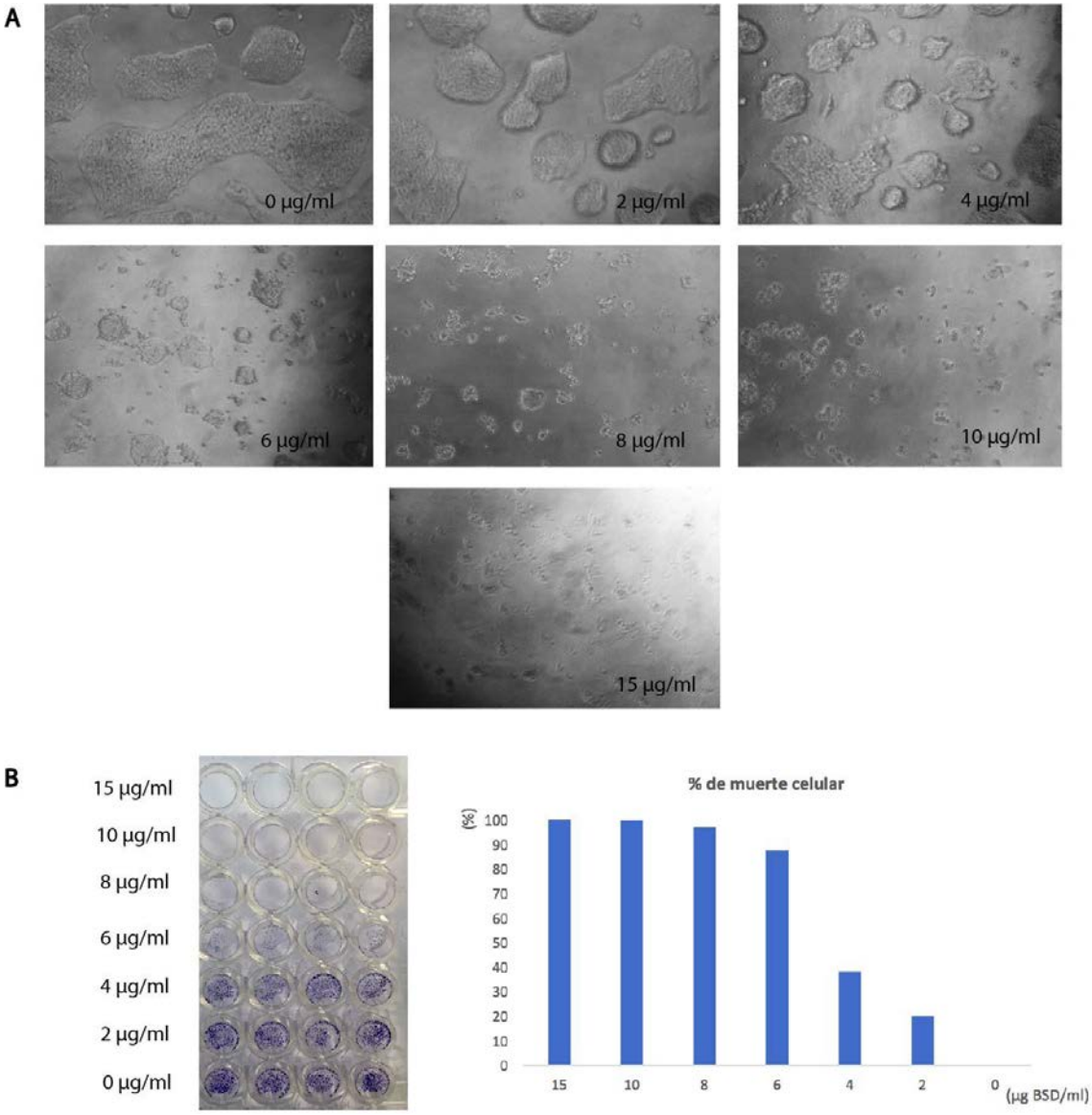


Figura 25: Curva de sensibilidad al antibiótico Blasticidina de la línea de CME W4 (0 a 15 µg/ml). Luego de 24 horas del plaqueo de las células, las mismas fueron expuestas a medio de propagación conteniendo Blasticidina en la concentración indicada, por 48 horas. A) Imágenes de microscopía de contraste de fase obtenidas con objetivo de 400x. B) Tinción con Cristal violeta. En el panel de la izquierda se muestra la placa luego de la tinción. En el panel de la derecha se muestra un gráfico de barras del porcentaje (%) de muerte celular. El mismo fue calculado con el promedio del valor de A_{595nm} de 4 réplicas técnicas de un experimento correspondientes a las células tratadas con cada concentración de Blasticidina, al que se le restó el valor del blanco y luego se lo relativizó a la condición control sin tratar con antibiótico (0 µg/ml, considerado 0% de muerte celular).

Como se observa en las Imágenes de la Figura 25A, a bajas concentraciones este antibiótico no alcanzó a producir la muerte de la totalidad de las células en la placa a las 48

horas. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de antibiótico también aumenta el porcentaje de células muertas. Para confirmar lo observado por microscopia y estimar el porcentaje de muerte celular obtenido en cada caso, nuevamente realizamos la tinción con cristal violeta, con la que obtuvimos esta vez una curva gradual de respuesta a las diferentes concentraciones utilizadas. Determinamos que con 10 µg/ml de Blasticidina las células plaqueadas alcanzan el 100% de muerte celular, determinando así la concentración más baja de este antibiótico en la cual se produce la muerte del total de células sensibles en 48 horas.

El rango de concentraciones utilizadas en esta última curva coincide con el rango recomendado para realizar líneas estables en otros tipos celulares a largo plazo[72], pero no para realizar una selección rápida en 48 horas. Encontramos interesante el hecho de que en nuestro sistema en solo 48 horas lleguemos a un porcentaje de muerte celular que en otra línea celular llevaría semanas.

En esta etapa establecimos las condiciones para llevar a cabo el diseño experimental *Con selección*. Planeamos utilizar este abordaje en el futuro para el estudio del efecto de la SUMOilación de Akt sobre los niveles endógenos de ARNm y de proteínas, tanto de Nanog como de otros genes de interés.

Tercera parte:
Inducción y detección del proceso de apoptosis en CME

La quinasa Akt es una enzima clave en la transducción de señales para la proliferación y supervivencia celular. Diversos trabajos demuestran el rol antiapoptótico de Akt1, y a su vez señalan que su modificación mediante SUMOilación es relevante para la protección de ciertos tipos celulares ante determinados estímulos apoptóticos. Como mencionamos, la apoptosis juega un papel clave en el desarrollo, ya que a lo largo de la embriogénesis diferentes grupos de células activan este programa de muerte controlada fundamental para el desarrollo del nuevo organismo, sin embargo, aún no se conoce en profundidad la regulación de este proceso en CME.

Nuestra hipótesis señala que la SUMOilación de Akt1 podría estar implicada en el mantenimiento de las propiedades fundamentales, en la supervivencia y en la proliferación de las CME. Proponemos que, ante condiciones desfavorables, esta modificación post-traduccional de Akt1 podría ser necesaria para proteger a las CME de desencadenar un proceso de muerte celular programada.

Para comenzar a evaluar el efecto de la SUMOilación de Akt1 en CME sobre este proceso, nos propusimos como primer objetivo establecer un estímulo inductor de apoptosis en nuestro sistema. A su vez, para poder detectar este efecto, el estímulo elegido no debe ser demasiado fuerte, de manera tal que el proceso de apoptosis inducido pueda ser revertido o bloqueado. Se encuentran descriptos, aunque escasamente, diferentes estímulos que pueden llegar a desencadenar el proceso de apoptosis en CME. Particularmente, se ha reportado que el cultivo de CME en medio de propagación libre de interleuquina LIF, es suficiente para desencadenar este proceso de muerte celular programada en un gran porcentaje de la población celular[64]. En nuestro laboratorio realizamos de rutina diferentes protocolos, particularmente para experimentos que implican la diferenciación celular, que involucran el cultivo de CME sin LIF. Debido a que en estos experimentos es común que inicialmente se produzca la muerte de una gran parte de la población celular, y dado que nuestras observaciones coincidían con lo reportado, decidimos estudiar el proceso desencadenado por este estímulo. Deseamos mencionar que previamente ensayamos otros estímulos para la inducción de apoptosis en nuestro sistema, como cultivar las células en suspensión sobre placas no adherentes o tratarlas con PBS[73]. Sin embargo, estos protocolos ensayados produjeron la muerte de la totalidad de las células tratadas, por lo que no resultaron de utilidad para nuestro objetivo.

Para la preservación de un estado naive de pluripotencia cultivamos a las CME en medio de propagación con LIF y los inhibidores *2i.* Comenzamos por evaluar cualitativamente mediante microscopía los niveles de muerte de células que, 24 horas luego de ser plaqueadas, fueron expuestas a medio de cultivo en ausencia de LIF y de 2i (-LIF-2i), y mantenidas en cultivo hasta 4 días en esas condiciones.

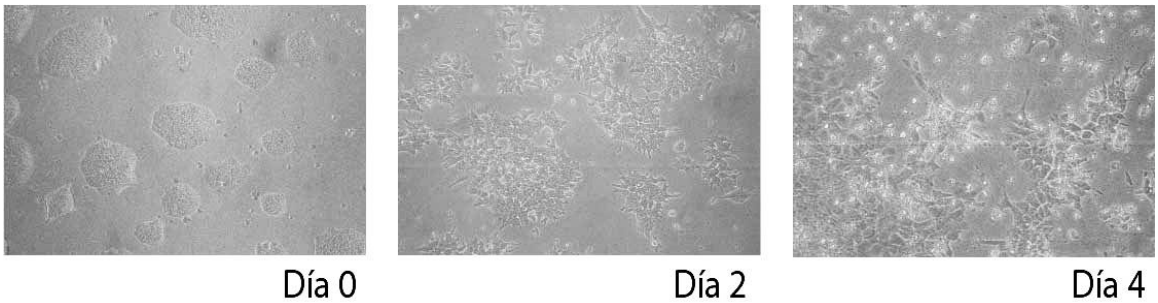


Figura 26: Proceso de muerte celular en cultivo de CME en medio de propagación -LIF-2i. A las 24 horas posteriores al plaqueo de las células sobre placas recubiertas con gelatina, el medio de propagación fue cambiado por medio sin LIF y 2i. Las fotografías fueron tomadas a los 0, 2 y 4 días posteriores a este evento utilizando un microscopio de contraste de fase con el objetivo de 100X.

Como se observa en la Figura 26, conforme pasan los días en cultivo en medio -LIF-2i, se evidencia un mayor número de células despegadas flotando en el medio de cultivo, indicando que las mismas se encuentran en proceso de muerte celular. Por otro lado, el cambio de morfología que se observa, se debe a que en estas condiciones se induce un proceso de diferenciación no dirigido.

Para continuar con el estudio del proceso de muerte celular en nuestro sistema, decidimos expandir el análisis sobre otros marcadores de este evento. En primer lugar, pusimos a punto en nuestro laboratorio el protocolo de detección de fragmentación del ADN, conocido como protocolo de *DNA ladder*. Éste se basa en la detección de la fragmentación internucleosomal del ADN genómico, utilizada como marcador de apoptosis tardía. Para ello, realizamos un nuevo cultivo de células en las condiciones inductoras de apoptosis descriptas y tomamos muestras tanto para extracción de ADN para análisis de fragmentación, como para extracción de proteínas, para análisis mediante Western blot que describiremos a continuación.

Como se observa en la Figura 27, mediante la técnica de DNA ladder podemos observar la aparición de fragmentos de DNA indicadores del proceso de apoptosis en las muestras obtenidas a día 4 del estímulo apoptótico, mientras que no detectamos estos fragmentos en la condición control (día 0), ni tampoco a día 2.

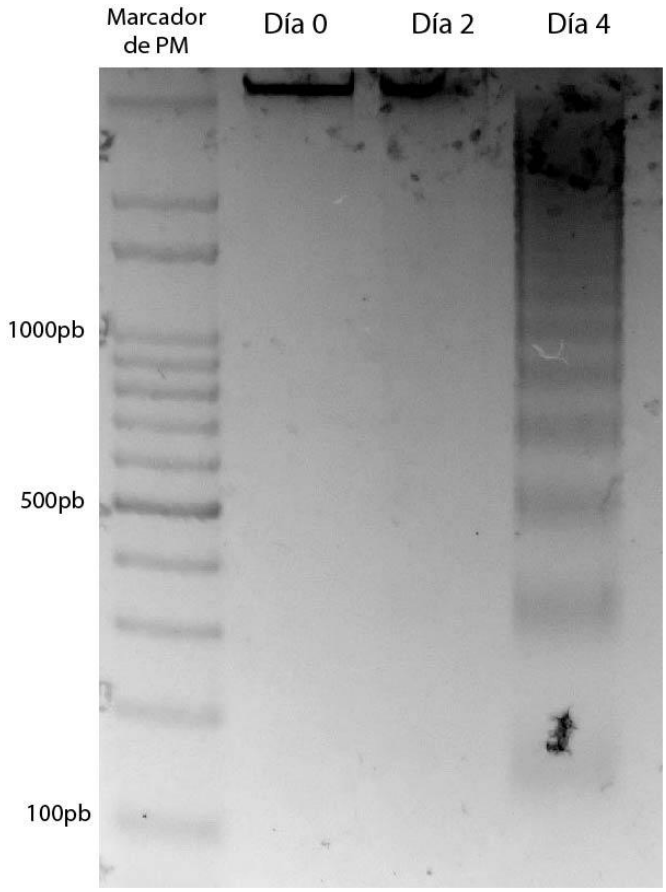


Figura 27: Detección de fragmentación de DNA, marcadora de apoptosis, mediante el protocolo de DNA ladder de CME en medio de cultivo -LIF-2i en gel de agarosa 2%. A las 24 horas posteriores al plaqueo de las CME W4 sobre placas recubiertas con gelatina, el medio de propagación fue cambiado por medio sin LIF y sin 2i. Se tomaron muestras tanto de las células como de los sobrenadantes para purificación del ADN en los tiempos indicados.

Por otro lado, decidimos analizar otros marcadores del proceso de apoptosis mediante análisis del clivaje de las proteínas Caspasa3 y PARP-1 por Western blot. Las muestras de proteínas fueron obtenidas de las mismas placas de las que se separó una parte para analizar la fragmentación del ADN y otra para extracción de proteínas. La proteína Caspasa 3 es una proteasa cuya forma activa se alcanza luego del clivaje de su zimógeno. El aumento de la forma clivada de Caspasa 3 es signo de la activación del proceso apoptótico, siendo estos fragmentos de aproximadamente 12 y 17 kDa. Por otra parte, la proteína PARP-1, enzima importante para la reparación del DNA en condiciones normales, es uno de los principales sustratos de la enzima Caspasa 3. Si bien PARP-1 puede ser clivada por diferentes proteasas resultando en fragmentos de diferentes tamaños, durante el proceso apoptótico los productos del clivaje por Caspasa 3 son de 89 y 24 kDa. A su vez, estos fragmentos actúan como inhibidores de la forma activa de PARP-1 durante el proceso de apoptosis, inhibiendo la reparación del ADN.

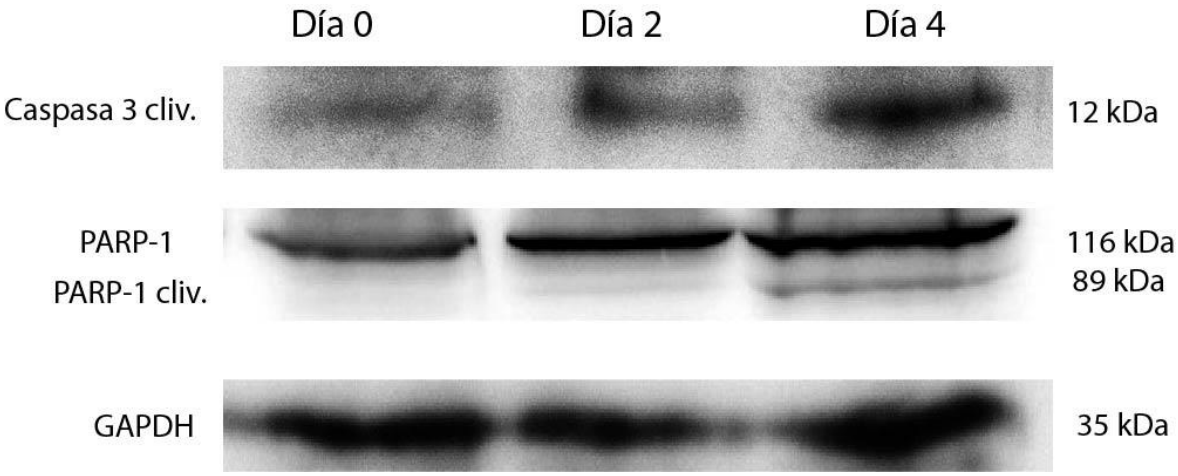


Figura 28: Detección de clivaje de PARP-1 y Caspasa 3 mediante Western blot de extractos proteicos de CME cultivadas en medio -LIF-2i. A las 24 horas posteriores al plaqueo de las CME W4 sobre placas recubiertas con gelatina, el medio de propagación fue cambiado por medio sin LIF y sin 2i. Se obtuvieron extractos proteicos en los tiempos indicados.

Como se observa en la Figura 28, a día 4 de cultivo de CME en medio -LIF-2i estimamos que una gran parte de la población entra en proceso de apoptosis. Esto se evidencia tanto por aumento de la forma clivada de la proteína Caspasa 3 (panel superior), como por la aparición de la forma clivada de la proteína PARP-1 (panel central). Además, las intensidades de las bandas correspondientes al control de carga, el gen *housekeeping* GAPDH, son similares, lo que indica que las variaciones observadas en las intensidades de las proteínas clivadas se deben al mismo clivaje y no a una mayor masa proteica sembrada.

En esta tercera parte del trabajo de tesis, nos centramos en establecer un estímulo que induzca el proceso de apoptosis en nuestro sistema. Somos conscientes de que el protocolo que utilizamos en esta parte, no solo genera la apoptosis de una gran parte de la población celular, sino que además, induce la diferenciación del resto. Por lo tanto, si bien la utilización de este estímulo apoptótico nos permitió poner a punto la detección de este proceso mediante diferentes abordajes, planeamos explorar otras opciones. Esto se debe a que, como ya mencionamos, este estímulo genera dos procesos celulares simultáneamente, apoptosis y diferenciación. Dado que nuestro propósito es estudiar el efecto de la SUMOilación de Akt en ambos procesos, debemos encontrar las condiciones que nos permitan estudiarlos individualmente. Destacamos que en esta etapa avanzamos con el establecimiento del modelo, requisito necesario para poder comenzar con el estudio de los efectos de la SUMOilación de Akt1 en CME en el futuro cercano.

Discusión

En los últimos años, las células madre han estado en el foco de las investigaciones científicas debido a su gran potencial en el área de la biomedicina. Estas células tienen la capacidad de propagarse ilimitadamente en las condiciones adecuadas de cultivo y además pueden ser diferenciadas con protocolos específicos a diferentes tipos celulares. Esto posibilita tener una fuente ilimitada de células, no solo para la investigación, sino también para su potencial uso clínico. Se espera que estas células tengan gran protagonismo en la medicina regenerativa, área que en los últimos años tuvo importantes avances, incluyendo la generación de las células madre pluripotentes inducidas[8], la formulación de nuevos protocolos de diferenciación dirigidos[74] e incluso inicio de ensayos clínicos de trasplantes de tejidos diferenciados y derivados a partir de estas células[75], entre otros. Todos estos descubrimientos y sus aplicaciones actuales, como así también las potenciales aplicaciones futuras, no pudieron ni podrán alcanzarse sin el estudio profundo, principalmente, de la bioquímica y la biología molecular de este sistema tan particular. Conocer y entender los procesos básicos que ocurren dentro de la célula, y en especial en las células madre, es de suma importancia para poder concretar su uso en la clínica de manera segura.

En este trabajo nos propusimos comenzar a estudiar un proceso cuya relevancia en células madre embrionarias no se conoce hasta el día de la fecha. Iniciamos esta línea de investigación en el laboratorio a partir de antecedentes que nos indicaban que la SUMOilación de Akt podría ser importante en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CME. La intención de este proyecto a largo plazo es estudiar la relevancia de esta modificación post-traduccional de esta quinasa, tanto en el mantenimiento de la pluripotencia, como en la proliferación y en la supervivencia de CME. Para esta tesis de licenciatura, establecimos como principales objetivos la puesta a punto del modelo experimental de esta nueva línea de investigación, lo que implicó tanto el entrenamiento en las diversas técnicas de laboratorio utilizadas, como el estudio profundo de un nuevo tema para delinear y la puesta a punto de un nuevo diseño experimental.

En primer lugar, realizamos la preparación a mediana escala de los vectores que expresan las diferentes variantes de Akt1 para su uso en transfección de cultivo celular. Una vez que los obtuvimos y controlamos su calidad, verificamos que los mismos se expresaran en nuestro sistema. Para ello, debido a que las CME son células cuyo nivel de transfección es relativamente bajo en comparación con otras líneas celulares, en primer lugar, utilizamos células HEK, ampliamente empleadas por su alta eficiencia de transfección. Estas primeras pruebas nos permitieron poner a punto la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo contra la etiqueta HA, lo que nos permitiría luego analizar la transfección en las CME. A su vez, también realizamos la puesta a punto de la detección de las variantes de HA-Akt1 mediante la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo anti HA mencionado, con resultados satisfactorios.

A continuación, verificamos que las variantes se expresaran correctamente en nuestro sistema, y además, que era posible identificar las células transfectadas. A partir de ese momento, comenzamos con los experimentos para comprobar nuestra hipótesis. Nuestro primer objetivo fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de las variantes de Akt1 sobre la

expresión de los factores de transcripción (FT) fundamentales en CME. Como mencionamos, los FT Oct4, Sox2 y Nanog conforman el núcleo de una red regulatoria modulando la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación. Para este trabajo de tesis, acotamos nuestro objetivo a determinar el efecto de la SUMOilación de Akt1 sobre la expresión de uno de ellos, Nanog. De todos modos, dejamos establecidas las condiciones para en un futuro estudiar el efecto sobre el resto de ellos. Elegimos Nanog, porque como ya mencionamos, la vía de señalización de Pi3k/Akt, en la que Akt1 se encuentra involucrada, es crucial para la expresión de Nanog [41]. Asimismo, este gen es el primero en disminuir su expresión al inicio de la diferenciación.

Como un primer abordaje experimental, comenzamos con el estudio del efecto de las variantes de Akt sobre la actividad del promotor de Nanog. Para ello, utilizamos un vector reportero del sistema Luciferasa de *Photinus pyralis*, cuya expresión se encuentra bajo el control de la región promotora de Nanog. Realizamos experimentos de co-transfección de este vector junto con los vectores de expresión de cada una de las variantes. En este caso, no incluimos el vector de expresión de Luciferasa de *Renilla reniformis,* el cual es comúnmente usado como normalizador de la transfección. Esto fue debido a que, en los primeros ensayos, detectamos que la expresión del gen de Luciferasa de los vectores normalizadores que teníamos a disposición también eran inducidos por la sobreexpresión de las variantes de Akt1. Esto no es una novedad, ya que previamente fue reportado que el promotor que dirige la expresión del gen normalizador codificado por este vector puede ser modulado por múltiples vías de señalización, conduciendo a resultados erroneos[76]. Por este motivo, decidimos utilizar al valor de proteínas totales, medidas por el método de Bradford, de cada uno de los extractos en los que medimos la actividad de Luciferasa, como valor normalizador. Teniendo en cuenta que este parámetro no es suficiente para la correcta normalización debido a que no se ve afectado por los niveles de transfección, compensamos esta falencia mediante dos abordajes. Uno de ellos fue realizar gran número de réplicas independientes de manera de disminuir la probabilidad de que los resultados se encuentren afectados por niveles diferentes de transfección entre las distintas condiciones experimentales. Por otra parte, en paralelo verificamos por inmunofluorescencia los niveles de transfección de cada una de las mutantes, encontrando que los mismos fueron homogéneos en todos los casos. Acerca del efecto de las variantes sobre la expresión del promotor de Nanog, encontramos que la sobreexpresión de la variante HA-Akt1-WT aumentó significativamente su expresión con respecto a la condición basal, en nuestro caso transfectada con el vector vacío. Este resultado es consistente con los antecedentes reportados que describen la inducción de Nanog por Akt[33]. Por otro lado, la variante HA-Akt1-E17K, cuya actividad y SUMOilación se encuentran aumentadas, aumentó significativamente la expresión del reportero, no solo con respecto al basal, sino que también comparado con su contraparte wt. Este resultado coincide con lo reportado recientemente durante la realización de este trabajo, en donde los autores encontraron que esta mutación induce la expresión de Nanog en células madre tumorales[61]. Sin embargo, en ese trabajo, aunque el vínculo entre la SUMOilación de Akt y la inducción de Nanog no se encuentra estudiado. Contrariamente, las variantes HA-Akt1-2KR y HA-Akt1-E17K/2KR, cuyas lisinas blanco de SUMOilación se encuentran sustituidas por argininas, no produjeron diferencias

significativas con respecto al basal. Este resultado es sumamente interesante, debido a que si bien la SUMOilación de éstas está disminuida, ambas mutantes están siendo sobreexpresadas y su actividad quinasa según lo reportado, no se encontraría disminuida. Si el efecto dependiese de la actividad quinasa, hubiésemos esperado obtener resultados similares a los obtenidos con la versión wt y no al vector vacío como obtuvimos. Esto sugiere que la SUMOilación podría tener un efecto modulador de la actividad de Akt1 de manera independiente de su actividad quinasa. Si bien, el mecanismo involucrado aún debe ser estudiado en profundidad, estos resultados abren nuevas perspectivas que sugieren por primera vez, que la SUMOilación de Akt1 podría tener un rol regulatorio en la expresión de un FT fundamental en CMEm.

Continuando con el análisis sobre la expresión de Nanog, decidimos estudiar el efecto de las variantes sobre los niveles endógenos de la proteína codificada por este gen. Para ello, transfectamos las células con cada una de las variantes y utilizando la técnica de inmunofluorescencia, realizamos una co-inmunomarcación con anticuerpos contra HA y Nanog simultáneamente. Cada uno de estos anticuerpos, a su vez, es revelado con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a un fluoróforo fluorescente que emite a longitudes de onda diferentes, pudiendo detectar ambas marcaciones por separado. En este caso, cuantificamos los niveles de proteína Nanog, tanto en células transfectadas, es decir, células que poseían la marca de HA, como aquellas sin transfectar. Los resultados preliminares de este ensayo indican que la SUMOilación de Akt1 sería necesaria para aumentar los niveles de Nanog. Encontramos que las variantes wt y E17K, las cuales poseen capacidad normal y aumentada de SUMOilación respectivamente, aumentaron la expresión endógena de dicho factor de transcripción. Por otro lado, la sobreexpresión de las variantes 2KR y E17K/2KR no parecieron aumentar la expresión de dicho factor, dado que en las células transfectadas con dichas variantes los niveles de Nanog fueron similares a los de las células sin transfectar. Esto es sumamente interesante, debido a que estos resultados son consistentes con los obtenidos en el estudio de la actividad del promotor de Nanog en presencia de estas variantes de Akt1. Si bien no obtuvimos un mayor nivel de expresión de la proteína Nanog en las células transfectadas con la variante E17K, según lo esperado por los resultados obtenidos en el ensayo anterior, y por lo reportado en células madre tumorales, creemos que es posible que una mayor SUMOilación de Akt1 no pueda producir una mayor inducción de Nanog debido a que en las CME la expresión de este factor de transcripción es elevada *per se*.

En las imágenes obtenidas en este experimento, observamos además que los niveles de Nanog parecen estar relacionados con la intensidad de la señal de HA, en los casos de las células transformadas con las variantes wt y E17K, sugiriendo que el efecto observado podría responder a la cantidad de Akt. Especulamos que es posible que en determinado rango de niveles de sobreexpresión de Akt, la intensidad de Nanog en las células transfectadas podría estar relacionada directamente con la intensidad de la señal de HA. Por este motivo, planeamos estudiar en el futuro esta relación, mediante la cuantificación de ambas señales a nivel de célula individual. Este análisis nos permitirá determinar en qué medida, la sobreexpresión de las variantes y su SUMOilación afectan la expresión de este gen.

En esta primera parte del trabajo, encontramos evidencias que sugieren que la SUMOilación de Akt1 es necesaria para la inducción de la expresión de un factor de transcripción fundamental de CME. Sin embargo, aún desconocemos en detalle el mecanismo molecular subyacente involucrado en los efectos reportados, por lo que surgen nuevas preguntas que nos proponemos investigar.

Para complementar el estudio de la expresión de Nanog, nos propusimos estudiar el efecto de las variantes de Akt sobre los niveles endógenos de ARNm de este gen. Para ello, delineamos un diseño experimental que involucra la selección de las células transfectadas con el antibiótico Blasticidina, cuyo gen de resistencia se encuentra codificado en el vector en el fueron realizadas las variantes de Akt1. Dado que no encontramos reportes sobre el uso de este antibiótico en CMEm en un diseño experimental similar al nuestro que requiera una selección a tiempos cortos, decidimos realizar una curva de sensibilidad de dicho antibiótico en la línea celular W4. Esto nos permitió encontrar la mínima concentración efectiva de antibiótico que causa la muerte del 100% de las células de esta línea. Realizamos una transfección para verificar la resistencia a dicho antibiótico, otorgando resultados satisfactorios incluso en concentraciones aún más elevadas que las determinadas en la curva. Si bien no llegamos a concluir este experimento propuesto, las condiciones del mismo se encuentran delineadas para llevarlo a cabo en el futuro. Este diseño experimental no solo podrá ser utilizado para el estudio del efecto de la SUMOilación de Akt sobre la expresión de Nanog, sino que además nos abre la puerta para el estudio de los niveles endógenos de ARNm y proteínas de otros genes importantes tanto, de marcadores de pluripotencia como de procesos celulares relevantes como discutiremos a continuación.

Por último, otro de los ejes importantes de nuestra hipótesis se basa en el conocido rol promotor de supervivencia, inductor de la proliferación e inhibidor de la apoptosis de la quinasa Akt. A su vez, este último proceso, clave en el moldeado a un organismo en desarrollo, ha sido poco estudiado en CME. Diversos antecedentes nos llevaron a postular que la SUMOilación de Akt podría ser importante para este proceso. Para estudiar el efecto de las variantes de Akt en primer lugar necesitamos una condición en la cual podamos inducir la apoptosis en nuestro sistema. Para esta segunda parte del trabajo, nos propusimos como objetivo poner a punto un estímulo apoptótico suficiente como para inducir este proceso de muerte celular, pero que a su vez, no sea demasiado fuerte de manera tal que el proceso de apoptosis inducido pueda ser revertido o bloqueado. Para ello evaluamos diversos estímulos como el cultivo de las células en suspensión y la incubación con PBS, los cuales han sido reportados como inductores de apoptosis en CME[73]. Sin embargo, estos tratamientos produjeron la muerte de la totalidad de las células plaqueadas, por lo que no resultaron convenientes para nuestro propósito. Dado que se encuentra reportado que cultivar las células sin el agregado de LIF y de los inhibidores 2i, no solo induce la diferenciación celular no dirigida, sino que, además hay un gran porcentaje de células que entran en proceso de apoptosis[64], decidimos evaluar este estímulo en nuestro modelo. Encontramos que el cultivo de las células hasta 4 días en estas condiciones indujo apreciablemente la muerte celular en

nuestro sistema. Para revelar el proceso de muerte celular programada, pusimos a punto la técnica de *DNA ladder*, la cual revela la fragmentación internucleosomal del ADN genómico, marcador ampliamente utilizado para monitorear el proceso apoptótico[77]. Observamos un aumento considerable de muerte celular, no solo revelado a partir de las imágenes de campo claro y mediante visualización de la fragmentación del ADN, sino además por evaluación del clivaje de las proteínas Caspasa 3 y PARP-1 mediante Western blot. Como mencionamos, el cultivo de CME en estas condiciones genera dos procesos celulares simultáneamente, apoptosis y diferenciación. Por lo tanto, dado que nuestro propósito es estudiar el efecto de la SUMOilación de Akt en ambos procesos, debemos encontrar las condiciones que nos permitan estudiarlos individualmente. Esto implica continuar evaluando otros posibles estímulos capaces de inducir apoptosis en nuestro sistema. Si bien aún no estudiamos el posible efecto de la SUMOilación de Akt en la supervivencia y proliferación de CME, en este trabajo establecimos condiciones que nos permitieron la puesta a punto de la metodología para su detección en nuestro sistema. Estas son bases importantes para los futuros experimentos planeados.

En síntesis, los resultados de esta tesis permitieron el inicio de una nueva línea de investigación en el laboratorio. No sólo encontramos un efecto sobre la regulación de un factor de transcripción fundamental en células madre pluripotentes, sino que además logramos establecer un modelo experimental para continuar este proyecto.

En el futuro, planeamos realizar los estudios cuyos diseños experimentales fueron puestos a punto en este trabajo. Además, nos proponemos expandir el estudio de los efectos de las variantes de Akt sobre otros procesos cruciales en CME, como lo es por ejemplo la elongación telomérica mediante la actividad de la enzima telomerasa. Para ello, planeamos generar líneas estables que sean capaces de expresar las variantes de Akt1 de manera inducible y que nos permitan estudiar su relevancia en procesos que requieran un análisis a largo plazo. Esto nos permitirá realizar un estudio más profundo de la implicancia de esta modificación post-traduccional de esta quinasa, no solo sobre el estado indiferenciado, sino también a lo largo del proceso de diferenciación celular.

Referencias bibliográficas

1. Daley, G. Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370,** 20140376 (2015).
2. Gilbert, S. Developmental Biology. *Dev. Biol.* **311,** 691 (2007).
3. Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W. & Józkowicz, A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim. Pol.* **62,** 329–337 (2015).
4. Condic, M. L. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev.* **23,** 796–812 (2014).
5. Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int. Suppl.* **1,** 63–67 (2011).
6. Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14,** 741–8 (2002).
7. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292,** 154–6 (1981).
8. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126,** 663–676 (2006).
9. Yu, J. & Thomson, J. A. Embryonic Stem Cells | stemcells.nih.gov. Available at: https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006Chapter1.htm. (Accessed: 5th October 2017)
10. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292,** 154–6 (1981).
11. Martin, G. R. 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,** 7634–8 (1981).
12. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282,** 1145–7 (1998).
13. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309,** 255–6
14. Williams, R. L. *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336,** 684–687 (1988).
15. Smith, A. G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336,** 688–690 (1988).
16. Wobus, A. M. & Boheler, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* **85,** 635–78 (2005).
17. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115,** 281–92 (2003).
18. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* **12,** 2048–60 (1998).
19. Yeo, J.-C. & Ng, H.-H. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res.* **23,** 20–32 (2013).
20. Rosner, M. H. *et al.* A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345,** 686–692 (1990).
21. Nichols, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95,** 379–91 (1998).
22. Niwa, H., Smith, A. G. & Miyazaki, J. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* **24,** 372–376 (2000).
23. Malarkey, C. S. & Churchill, M. E. A. The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell. *Trends Biochem. Sci.* **37,** 553–62 (2012).
24. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on

SOX2 function. *Genes Dev.* **17,** 126–140 (2003).
25. Chew, J.-L. *et al.* Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 6031–6046 (2005).
26. Mitsui, K. *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113,** 631–42 (2003).
27. Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450,** 1230–1234 (2007).
28. Loh, Y.-H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **38,** 431–440 (2006).
29. Rizzino, A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **1,** 228–36 (2009).
30. Young, R. A. Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell* **144,** 940–954 (2011).
31. Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Rüther, U. & Nordheim, A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **274,** 19838–45 (1999).
32. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Dev. Biol.* **210,** 30–43 (1999).
33. Hiroyuki Hirai, Peter Karian, and N. K. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. **76,** 211–220 (2012).
34. Murray, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* **178,** 2623–9 (2007).
35. Hirai, H., Karian, P. & Kikyo, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem. J.* **438,** 11–23 (2011).
36. Schiemann, W. P., Bartoe, J. L. & Nathanson, N. M. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J. Biol. Chem.* **272,** 16631–6 (1997).
37. Hamazaki, T., Kehoe, S. M., Nakano, T. & Terada, N. The Grb2/Mek Pathway Represses Nanog in Murine Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 7539–7549 (2006).
38. Paling, N. R. D., Wheadon, H., Bone, H. K. & Welham, M. J. Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling. *J. Biol. Chem.* **279,** 48063–48070 (2004).
39. Bechard, M. & Dalton, S. Subcellular Localization of Glycogen Synthase Kinase 3 Controls Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Mol. Cell. Biol.* **29,** 2092–2104 (2009).
40. Doble, B. W. & Woodgett, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **116,** 1175–86 (2003).
41. Storm, M. P. *et al.* Regulation of Nanog Expression by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling in Murine Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* **282,** 6265–6273 (2007).
42. Braunstein, J., Brutsaert, S., Olson, R. & Schindler, C. STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278,** 34133–34140 (2003).
43. Watanabe, S. *et al.* Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25,** 2697–2707 (2006).
44. Chen, L. & Khillan, J. S. A Novel Signaling by Vitamin A/Retinol Promotes Self Renewal of Mouse ES Cells by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway Via IGF-1 Receptor. *Stem Cells* **28,** N/A-N/A (2009).
45. Chen, X. *et al.* Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* **133,** 1106–1117 (2008).

46. Ying, Q.-L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453,** 519–523 (2008).
47. Waisman, A. *et al.* Inhibition of Cell Division and DNA Replication Impair Mouse-Naïve Pluripotency Exit. *J. Mol. Biol.* **429,** 2802–2815 (2017).
48. Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4,** 487–92 (2009).
49. Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* **23,** 1515–1527 (2011).
50. Yeo, J.-C. & Ng, H.-H. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res.* **23,** 20–32 (2013).
51. Gonzalez, E. & McGraw, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8,** 2502–8 (2009).
52. Risso, G. *et al.* Modification of Akt by SUMO conjugation regulates alternative splicing and cell cycle. *Cell Cycle* **12,** 3165–3174 (2013).
53. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129,** 1261–1274 (2007).
54. O'Neill, A. K., Niederst, M. J. & Newton, A. C. Suppression of survival signalling pathways by the phosphatase PHLPP. *FEBS J.* **280,** 572–83 (2013).
55. Chan, C.-H. *et al.* Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci.* **4,** 59 (2014).
56. de la Cruz-Herrera, C. F. *et al.* SUMOylation regulates AKT1 activity. *Oncogene* 1–9 (2014). doi:10.1038/onc.2014.48
57. Hay, R. T. SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* **18,** 1–12 (2005).
58. Verger, A., Perdomo, J. & Crossley, M. Modification with SUMO A role in transcriptional regulation. *EMBO reports VOL EMBO reports* **4,** 137–142 (2003).
59. Losino, N. *et al.* EDA-containing fibronectin increases proliferation of embryonic stem cells. *PLoS One* **8,** 1–12 (2013).
60. Tahmasebi, S., Ghorbani, M., Savage, P., Gocevski, G. & Yang, X. J. The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is required for inducing and maintaining stem cell pluripotency. *Stem Cells* **32,** 1012–1020 (2014).
61. Malanga, D. *et al.* The Akt1/IL-6/STAT3 pathway regulates growth of lung tumor initiating cells. *Oncotarget* **6,** 42667–86 (2015).
62. Liu, X. *et al.* Quantitative analysis of anti-apoptotic function of Akt in Akt1 and Akt2 double knock-out mouse embryonic fibroblast cells under normal and stressed conditions. *J. Biol. Chem.* **281,** 31380–31388 (2006).
63. Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H. & Toder, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J. Assist. Reprod. Genet.* **16,** 512–9 (1999).
64. Duval, D. *et al.* Apoptosis and differentiation commitment: novel insights revealed by gene profiling studies in mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* **13,** 564–75 (2006).
65. Rahbar Saadat, Y., Saeidi, N., Zununi Vahed, S., Barzegari, A. & Barar, J. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *Bioimpacts* **5,** 25–8 (2015).
66. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9,** 676–682 (2012).
67. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204,** 63–113 (1991).
68. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7,** 1513–23 (1979).
69. Carpten, J. D. *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448,** 439–444 (2007).

70. Armstrong, L. *et al.* The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFκβ signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum. Mol. Genet.* **15,** 1894–1913 (2006).
71. Blüguermann, C. Estudio de la participación de la citoquina LIF en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias humanas a cardiomiocitos. (2015).
72. ThermoFisher Scientific. Suggested Blasticidin Concentrations. Available at: https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/blasticidin.html. (Accessed: 3rd November 2017)
73. Koyanagi-Katsuta, R., Akimitsu, N., Arimitsu, N., Hatano, T. & Sekimizu, K. Apoptosis of mouse embryonic stem cells induced by single cell suspension. *Tissue Cell* **32,** 66–70 (2000).
74. Yoshida, Y. & Yamanaka, S. IPS cells: A source of cardiac regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **50,** 327–332 (2011).
75. Sugita, S. [Retinal regeneration with iPS cells – Clinical trials for retinal degenerative disorders]. *Nihon Rinshō Men'eki Gakkai kaishi = Japanese J. Clin. Immunol.* **38,** 79–85 (2015).
76. Ho, C. K. *et al.* Activation of the control reporter plasmids pRL-TK and pRL-SV40 by multiple GATA transcription factors can lead to aberrant normalization of transfection efficiency. *BMC Biotechnol.* **4,** 10 (2004).
77. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407,** 770–6 (2000).