

Tesis Doctoral

Estudio de la regulación de la expresión y de la relevancia de la metiltransferasa PRMT8 en células madre pluripotentes

Luzzani, Carlos Daniel

2013-03-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Luzzani, Carlos Daniel. (2013-03-26). Estudio de la regulación de la expresión y de la relevancia de la metiltransferasa PRMT8 en células madre pluripotentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Luzzani, Carlos Daniel. "Estudio de la regulación de la expresión y de la relevancia de la metiltransferasa PRMT8 en células madre pluripotentes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Estudio de la regulación de la expresión y de la
relevancia de la metiltransferasa PRMT8 en células
madre pluripotentes**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Carlos Daniel Luzzani

Director de tesis: Dra. Alejandra Sonia Guberman

Consejero de Estudios: Dra. Adali Pecci

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre
Buenos Aires, 2013

Estudio de la regulación de la expresión y de la relevancia de la metiltransferasa PRMT8 en células madre pluripotentes

Resumen

Las células madre embrionarias (ESCs) son células derivadas del macizo celular interno (ICM) del blastocisto. Poseen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente en cultivo y de dar origen a células 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. Estudios de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) han revelado que estos factores ocupan al mismo tiempo las regiones promotoras de diversos genes a lo largo de todo el genoma, sugiriendo que estos factores actúan como el núcleo de una red regulatoria que modula la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular. Mientras que *in vitro* las ESCs pueden ser mantenidas indefinidamente en estado indiferenciado, *in vivo*, conforme progresa el desarrollo, las células del ICM abandonan su estado pluripotente para seguir diversos programas de diferenciación. El inicio de dichos programas depende, en gran medida, de la regulación de la expresión de genes tejido-específicos. Sin embargo, entender cuáles son estos genes y cómo son regulados no es suficiente para explicar el comienzo del proceso de diferenciación celular. Existen además, cambios en la organización de la cromatina a nivel global y de loci específicos, registrándose múltiples evidencias que relacionan la estructura de la cromatina de los genes marcadores de estadio indiferenciado con el mantenimiento de la pluripotencia.

Nuestra hipótesis postula que existiría una relación bidireccional entre los niveles y la actividad de proteínas que remodelan la cromatina y de los factores de transcripción críticos en el mantenimiento de las propiedades de las células pluripotentes. El objetivo general de este trabajo es contribuir al esclarecimiento de la regulación epigenética que ocurre en las ESCs durante la diferenciación y el estado epigenético de éstas cuando son mantenidas en estado indiferenciado. Para ello, nos propusimos, en primer lugar analizar el patrón de expresión de proteínas

modificadoras de la cromatina en ESCs indiferenciadas y en distintos estadios de diferenciación. Luego, una vez detectados genes de interés, evaluar el efecto de la modificación de sus niveles de expresión sobre el mantenimiento del estado indiferenciado y en la diferenciación de las ESCs. Por último, nos propusimos estudiar si los factores de transcripción relevantes en la preservación de la pluripotencia regulan la expresión los genes en estudio.

Para nuestro primer objetivo, analizamos la expresión de enzimas relacionadas con el remodelado de la cromatina mediante RT-qPCR en ESCs indiferenciadas y las comparamos con la de células terminalmente diferenciadas. Posteriormente, diferenciamos ESCs mediante un protocolo no dirigido y analizamos la expresión de estos genes lo largo del proceso de diferenciación. Esta búsqueda arrojó una serie de genes candidato que podrían tener un rol en el mantenimiento de las propiedades básicas de las ESCs. Posteriormente, elegimos uno de estos genes, la metiltransferasa Prmt8, para continuar nuestros estudios. Los otros genes que surgieron de este análisis forman parte de otros proyectos de tesis. Utilizando tanto un protocolo de diferenciación no dirigido como uno dirigido hacia linaje neural, comprobamos que el gen de Prmt8 se regula negativamente durante el proceso de diferenciación. Por otra parte, construimos una línea estable de mESCs que contiene en su genoma un shRNA inducible contra Prmt8. Probamos que al inducir este shRNA los niveles de mensajero de esta enzima disminuyen, y que esto en un principio no afecta la capacidad de auto-renovación de las células. Mediante análisis de inmunofluorescencia estudiamos la presencia y localización de marcadores del estado indiferenciado. No encontramos diferencias sustanciales en los marcadores analizados al comparar las células cultivadas en presencia del inductor del shRNA con las células control. Por otro lado, diferenciamos la línea que sub-expresa Prmt8 y encontramos que estas células parecen diferenciarse de forma diferente al control. Por último, analizamos si la expresión forzada de los factores de transcripción de pluripotencia modula la expresión de Prmt8 en un sistema heterólogo.

En conjunto los datos sugieren que Prmt8 es regulado positivamente por los factores de transcripción de pluripotencia, y modulado durante la diferenciación, hecho que podría ser clave en la determinación del tipo celular de destino. En el futuro planeamos realizar estudios de inmunoprecipitación de la cromatina para estudiar la

interacción de estos factores con el promotor de Prmt8. Por otra parte, nos interesa estudiar con mayor profundidad si la presencia de esta metiltransferasa es vital para la diferenciación hacia algún tipo celular en particular.

Creemos que los conocimientos generados en el campo de la epigenética de células madre pueden contribuir a plantear estrategias que ayuden, en un futuro, a diseñar nuevas terapias celulares.

Palabras Clave:

Células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, auto-renovación, pluripotencia, arginina metiltransferasas, epigenética

Regulation of the expression and relevance of the arginine methyltransferase Prmt8

Summary

Embryonic stem cells (ESCs) are cells derived from the inner cell mass (ICM) of the blastocyst. They have the ability to self-renew indefinitely in culture and to give rise to cells of all three germ layers, property known as pluripotency. There are three basic transcription factors that regulate gene pluripotent stem cells, Oct4, Sox2 and Nanog. Studies using chromatin immunoprecipitation (ChIP) have shown that these factors are simultaneously recruited to promoter regions of various genes throughout the genome, suggesting that these factors act as a core regulatory network that modulates the expression of genes involved in cell differentiation. While ESCs can be maintained *in vitro* in the undifferentiated state indefinitely, *in vivo*, as development progresses, ICM cells leave their pluripotent state to follow various programs of differentiation. The beginning of such programs depends largely on the regulation of expression of tissue-specific genes. However, understanding who these genes are and how they are regulated is not enough to explain the beginning of the process of cell differentiation. There also changes in global chromatin organization and in specific loci, registering evidence that link the chromatin structure of marker genes of the undifferentiated stage with the maintenance of pluripotency.

Our hypothesis is that there is a bidirectional connection between the levels and the activity of chromatin remodeling proteins and transcription factors that are critical for the maintenance of pluripotent cell properties. The overall objective of this work is to contribute to the elucidation of epigenetic regulation that occurs in ESCs during differentiation and the epigenetic state of these when maintained in an undifferentiated state. For this purpose, we sought, first to analyze the expression pattern of chromatin modifying proteins in undifferentiated ESCs and at different stages of differentiation. Then, once detected genes of interest, we will assess the effect of changing their expression levels on the maintenance of the undifferentiated state and in the differentiation of ESCs. Finally, we decided to study whether the relevant pluripotency core transcription factors regulate the expression of the studied genes.

For our first objective, we analyzed the expression of the enzymes involved in chromatin remodeling by RT-qPCR in undifferentiated ESCs and compared it with that of

terminally differentiated cells. Subsequently, using the hanging drop differentiation protocol we analyzed the expression of these genes during the differentiation process. This search yielded a number of candidate genes that may play a role in maintaining the basic properties of ESCs. Then, we chose one of these genes, the methyltransferase Prmt8 to continue our studies. The other genes that emerged from this analysis are part of other thesis projects. Utilizing both an undirected differentiation protocol as well as one directed towards neural lineage, we found that the Prmt8 gene is negatively regulated during the differentiation process. Furthermore, we constructed a mESCs stable line containing in its genome an inducible shRNA against Prmt8. We prove that this shRNA inducing messenger levels of this enzyme decreases, and this does not affect the ability of self-renewing cells. By immunofluorescence analysis we studied the presence and location of the undifferentiated state markers. No substantial differences were found when comparing the analyzed markers cells cultured in the presence of inducer of control cells shRNA. Furthermore, differentiate the sub-express line Prmt8 and found that these cells appear to differ from the control differently. Finally, we examined whether forced expression of transcription factors modulates expression of pluripotency Prmt8 in a heterologous system.

Taken together these data suggest that Prmt8 is positively regulated by the transcription factors of pluripotency, and modulated during differentiation, which could play a key role in determining the target cell type. In the future we plan to study the interaction of these factors with the promoter Prmt8. Moreover, we want to explore further whether the presence of this methyltransferase is vital for differentiation into a particular cell type. We believe that the knowledge generated in the field of stem cell epigenetics can help create strategies that help in the future, to design new cell therapies

Keywords:

Embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, self-renewal, pluripotency, arginine methyltransferases, epigenetics

Parte de los resultados presentados en este trabajo forman parte de la siguiente publicación:

- *Carlos Luzzani; Claudia Solari; Noelia Losino; Ariel Waisman; Leonardo Romorini; Carolina Blugermann; Gustavo Sevlever; Lino Barañao; Santiago Miriuka; Alejandra Guberman. **Modulation of chromatin modifying factors' gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011 Jul 15; 410 (4): 816-22. Epub 2011 Jun 15. ISSN: 0006-291X*

Agradecimientos:

A toda mi familia, especialmente mi mamá Stella y mi papá Daniel que me aguantaron siempre mis aventuras. A mis hermanas Gaby y Lucía por ser mis compañeras, mis confidentes y mis amigas. A Dani, reciente incorporación a la familia, pero que en poco tiempo paso a ser una persona muy importante para mí. A los que se fueron yendo, porque me hicieron quien soy y porque me siguen enseñando.

A Ale, por enseñarme una infinidad de cosas dentro y fuera del laboratorio. Por ser mi guía y mi amiga. Por confiar tanto en mí. Por perdonarme todo, por alentarme y por insistirme siempre en que tengo que perseguir mis sueños.

A mi familia del labo: Noe, Clau y Ari. Porque cuando estoy complicado dejan todo para ayudarme. Porque me bancan todos los días, por las charlas y más charlas entre mates, por los viajes. Por ser mis compañeros, psicólogos y amigos. Sobre todo este último tiempo, me han ayudado a sacar adelante esta tesis y en definitiva son tan autores como yo.

A los grupos de investigación cercanos que siempre están dispuestos a darme una mano. El grupo de Martín Monte, de Adalí Pecci, de Elba Vasquez y Adriana De Siervi, de Eduardo Cánepa, de Federico Coluccio, el de Diego Laderach y Daniel Compagno, el de Susana Correa y Mariana Bermudez. Muchas gracias.

También quiero agradecer a Santiago Miriuka y a todo su equipo por colaborar y enseñarme como trabajar con las hESC. Especialmente a Santiago, por guiarme siempre y tener el entusiasmo para discutir experimentos y resultados.

A los chicos. Nombrarlos a todos es imposible, pero está claro que sin ustedes no soy nadie. Son mi familia elegida y no verlos una semana es extrañarlos infinito.

Estos agradecimientos son cortitos y poco detallados, pero salen del corazón. Aunque las palabras no me ayuden, y todo lo que pongo tiene gusto a poco, al

escribirlos me acordé de mil anécdotas y situaciones. Y de pronto me vino un aluvión de sentimientos por todos ustedes. Mis agradecimientos acá son formales. Los pongo porque no pueden dejar de estar. Pero los verdaderos espero poder dárselos personalmente a todos y cada uno. Me acompañan todos los días en este viaje. Y ahora me doy cuenta que Ustedes Son el Viaje.

Por último quiero agradecer al Conicet por financiar mi Beca Doctoral. A las instituciones que financian nuestro trabajo diario: ANPCyT, UBA, CONICET y Biosidus.

Quiero agradecer también a todos los profesores que tuve durante el transcurso de mi vida. Desde pre-escolar hasta hoy.

Muy especialmente, gracias a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por ser el lugar donde me formé, mi segundo hogar, y donde se me dio un espacio para realizar esta tesis. Por ser una de las mejores universidades que hay. Por ser pública, laica, de alta calidad y gratuita, que es un derecho que todos tenemos que defender para que cada vez pueda llegar a más gente.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción	3
Generalidades	4
¿Qué son las células madre?	6
Células madre embrionarias	7
Bases moleculares del mantenimiento del estado indiferenciado y la pluripotencia	9
¿Cómo se evalúa la pluripotencia y la auto-renovación?	13
Células Madre Pluripotentes Inducidas	15
Epigenética de las Células Madre Pluripotentes	16
La Proteína Metiltransferasa de Argininas 8 (PRMT8)	24
Hipotesis y objetivos	27
Materiales y métodos	30
Cultivo celular	31
Extracción de ADN genómico para la detección de Mycoplasma por PCR	33
Congelamiento y descongelamiento de células	34
Diferenciación celular	35
Método de <i>Hanging drop</i>	35
Diferenciación dirigida a progenitores neurales	37
Extracción de RNA y cuantificación	38
Retrotranscripción	39
PCR a punto final y qPCR en Tiempo Real	40
PCR a punto final	40
PCR cuantitativa en tiempo real	41
Inmunofluorescencia	44
Transfección	47

Purificación de DNA por Maxiprep	47
Silenciamiento génico mediante RNAi	49
Construcción de los vectores pLKO-Tet-On shPrmt8	50
Descripción del vector pLKO-Tet-On	50
Obtención del vector pLKO-Tet-On shPrmt8	53
Elección de shRNAs	55
Hibridización de los oligonucleótidos	56
Ligación de los oligonucleótidos doble cadena en el vector pLKO-Tet-On	58
Traduccioness virales	59
Soluciones y medios de cultivo utilizados	60
Resultados	64
Estudio de la expresión de remodeladores de la cromatina en células madre pluripotentes	65
Análisis de la expresión de la metiltransferasa de argininas Prmt8 en células madre pluripotentes	76
Estudio de la relevancia de Prmt8 en células madre pluripotentes	81
Generación de una línea estable que sub-expresa Prmt8 de manera inducible	81
Rol de Prmt8 sobre la auto-renovación de ESCs	85
Rol de Prmt8 sobre la pluripotencia de ESCs	91
Regulación de la expresión de Prmt8 por los factores de pluripotencia	95
Discusión	100
Bibliografía	110

Abreviaturas

AFP	Alfafetoproteína
AML	Actina de Músculo Liso
BMP	Proteína Morfogénica del Hueso
BSA	Seroalbúmina Bovina
cDNA	ADN Complementario
CDS	Secuencia Codificante
CE	Cuerpos Embrioides
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina
ChIP-seq	ChIP seguido de secuenciación
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CM	Células Madre
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNasa	Desoxiribonucleasa
DNMTs	Metiltransferasa de ADN
dNTP	Nucleótido de ADN
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESC	Células Madre Embrionarias
FD	Factor de Dilución
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GSK3	Glucógeno-Sintetasa Quinasa 3
H ₂ O _{dest}	Agua destilada
H ₂ O _{mq}	Agua Milli Q
HC11	Línea Celular Murina Epitelial Mamaria
hESC	ESC Humanas
iPSC	Células Madre Pluripotentes Inducidas
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
LIFR	Receptor de LIF

MCI	Macizo Celular Interno
MD	Medio de Diferenciación
MEF	Fibroblastos Embrionarios Murinos
mESC	ESC de ratón
MP	Medio de Propagación
mRNA	ARN mensajero
NuRD	<i>Nucleosome Remodelling and histone Deacetylation</i>
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCAF	Factor asociado a P300/CBP
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PRC-2	Complejo Represor Polycomb 2
Prmt	Proteína Metiltransferasa de Argininas
qPCR	Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	ARN de interferencia
RNAsa	Ribonucleasa
RT-MMLV	Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Maloney
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
shRNA	ARN Cortos en Horquilla
siRNA	ARN pequeños interferentes
TERT	Telomerasa Transcriptasa Reversa
TetR	Proteína Represora de Tetraciclina
TRE	Elemento Respondedor a Tetraciclina
β III-T	β III Tubulina
3' UTR	Región 3' No Traducible
5' UTR	Región 5' No Traducible

Introducción

El desarrollo de los mamíferos comienza con la unión entre el oocito y el espermatozoide en el oviducto materno. La célula formada, el cigoto, dará origen tanto al embrión como a todas las membranas extraembrionarias necesarias para su correcto desarrollo. Luego de la fecundación, el desarrollo de un organismo multicelular continúa mediante un proceso denominado segmentación. Ésta consiste en una serie de divisiones mitóticas por medio de las cuales el enorme volumen del citoplasma del cigoto es dividido en numerosas células nucleadas pequeñas, denominadas blastómeros. Así, el cigoto es dividido primero a la mitad, luego en cuartos, en octavos y así sucesivamente hasta formar una masa compacta de células denominada mórula (Figura 1.1A). Posteriormente, la mórula da origen al siguiente estadio, el blastocisto, que consiste en una capa exterior de células llamada trofoblasto y una capa interna de células denominada macizo celular interno (MCI) (Figura 1.1A y B). La descendencia de esta última población homogénea de células debe generar los más de doscientos tipos celulares que constituyen el individuo adulto.

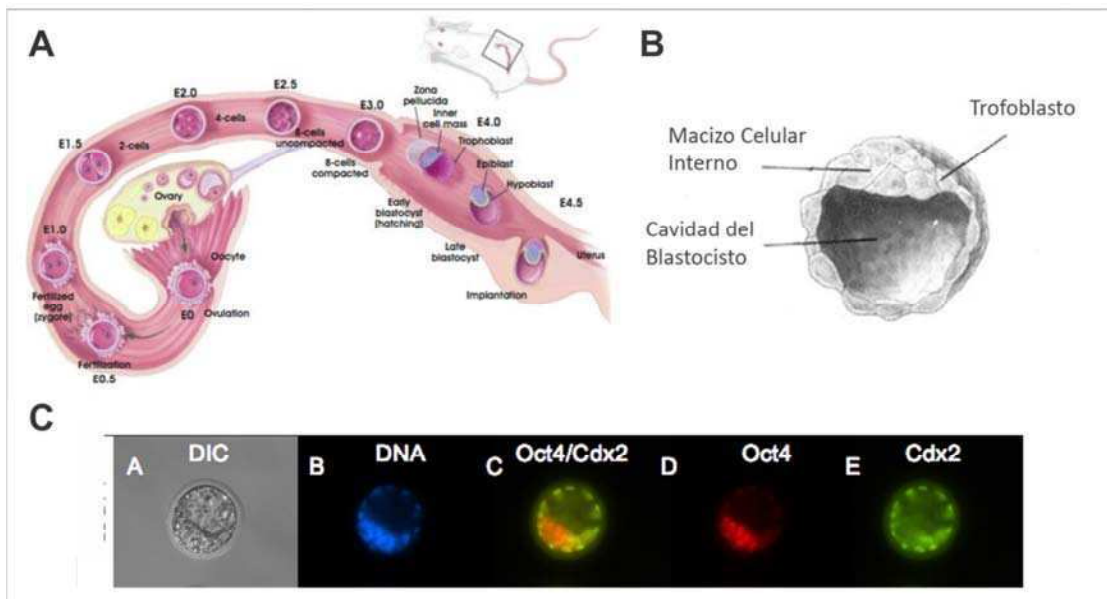


Figura 1: A) Desarrollo del blastocisto preimplantatorio. Extraído de Regenerative Medicine. Department of Health and Human Services. August 2006. B) Esquema de blastocisto de mamíferos, corte transversal. C) Inmunofluorescencia de un blastocisto de ratón. La proteína Oct4 marca el MCI mientras que Cdx2 es un marcador de células del trofoectodermo (Maserati et al., 2011)

Durante el desarrollo, sólo las células presentes en el óvulo fertilizado o en el cigoto hasta el estadio de ocho células, tienen el potencial de generar un organismo

completo. Esta capacidad de formar un organismo con todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios que se requieren se conoce como totipotencia. Las células en el MCI de un embrión peri-implantatorio ya no se consideran totipotentes sino pluripotentes, debido a que no pueden originar un individuo pero sí todos los tipos celulares presentes en él. Conforme progresa el desarrollo y las células continúan diferenciándose y comprometiéndose con un linaje celular particular, este potencial para diferenciarse a otros tipos celulares disminuye.

El proceso de diferenciación celular y compromiso hacia un determinado linaje clásicamente se divide en dos etapas. La primera es una fase débil denominada especificación o compromiso, en la que el tipo celular todavía no se encuentra determinado y cualquier inclinación hacia un destino en particular puede ser revertida o transformada. En este momento, la diferenciación es reversible. La segunda etapa es la determinación, en la cual el destino de la célula no puede ser revertido ni transformado. En general, esto significa que si una célula está determinada a diferenciarse en una neurona, por ejemplo, no puede desarrollar una célula de la piel. La determinación está seguida por la diferenciación. La diferenciación celular involucra tanto cambios en la bioquímica y estructura como en la función de la célula, dando como resultado tipos celulares específicos. Las células terminalmente diferenciadas presentes en los tejidos adultos tienen, generalmente, un tiempo de vida relativamente corto y deben ser reemplazadas continuamente por nuevas células del mismo tipo. Dichas células son generadas a partir de progenitores y células multipotentes. Estas células se clasifican como multipotentes porque ya se encuentran comprometidas con cierto linaje y pueden dar origen solamente a un número limitado de tipos celulares.

Como dijimos anteriormente, cuanto más diferenciada se encuentra una célula, menor es su potencial para dar origen a otros tipos celulares. Todo el proceso del desarrollo de un individuo está determinado por células totipotentes con el potencial para producir cualquier tejido. En el otro extremo, un organismo adulto estará compuesto por miles de tipos celulares distintos, altamente especializados para cumplir funciones sumamente definidas. Pero, aun así, entre todas estas células especializadas es necesario conservar una pequeña población que sea capaz de repoblar los tejidos, reemplazando las células que continuamente mueren.

Totipotencia, pluripotencia, multipotencia y unipotencia, son términos acuñados para definir el potencial de diferenciación de las células que durante el desarrollo y la vida adulta originarán el resto de las células necesarias para la vida: las células madre.

¿Qué son las células madre?

Las células madre tienen dos propiedades fundamentales que la definen: pueden autorenovarse y son capaces de diferenciarse. El término “autorenovación” hace referencia al proceso mediante el cual una célula puede dividirse por mitosis para dar lugar a dos células hijas idénticas entre sí e iguales a la que les dieron origen. En el caso de las células madre este proceso es, además, virtualmente infinito dado que pueden proliferar casi indefinidamente.

Como ya vimos, existen distintos tipos de células madre que pueden clasificarse según su potencial de diferenciación. Esta capacidad abarca desde aquellas con el mayor potencial, las totipotentes, hasta las células progenitoras, que sólo se diferencian a un tipo celular específico y están ampliamente distribuidas en el tejido adulto (Figura 1.2). Presentando potencial intermedio se encuentran las células madre pluripotentes y las células madre adultas. Entre estas últimas se encuentran las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales de la médula ósea, por ejemplo. Las células madre de individuos adultos, como las células precursoras de los linajes hematopoyéticos (Robb, 2007) o precursores neurales del hipocampo, tienen la capacidad de diferenciarse a un repertorio limitado de linajes celulares. Por ejemplo los precursores neurales pueden diferenciarse hacia un linaje neuronal o glial (Martino & Pluchino, 2007). Por este motivo es que se las considera multipotentes. Las células madre pluripotentes, en cambio, pueden diferenciarse a células de las tres capas germinales del embrión, el endodermo, mesodermo y ectodermo. Esta capacidad, como mencionamos anteriormente, les permite dar origen a cualquier tipo celular del individuo adulto lo cual las hace sumamente atractivas como fuente de células para terapias regenerativas. Están representadas por las células madre embrionarias (ESC, su sigla en inglés), las células epiblasticas, las células germinales y las células madre

pluripotentes inducidas (iPSC, su sigla en inglés), las cuales fueron desarrolladas en los últimos años.

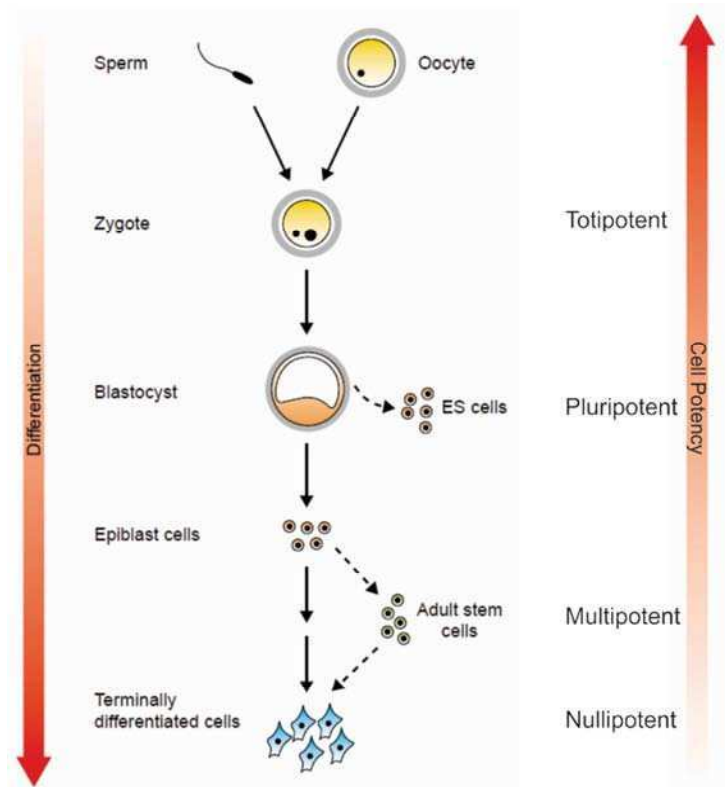


Figura I.2: Estadios de la diferenciación celular *versus* el potencial para diferenciarse. Adaptado de (Hochedlinger & Jaenisch, 2002)

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias fueron derivadas por primera vez en 1981 a partir del MCI de blastocistos de ratón por dos grupos de investigación de manera independiente (M. K. M. Evans, 1981; Martin, 1981). Estas líneas se derivaron tomando células del MCI y cultivándolas sobre una capa de células nutricias o *feeder layer* de fibroblastos embrionarios de ratón (o MEFs, su sigla en inglés). La presencia de MEFs en estos experimentos fue crucial, dado que aún no se conocían las vías de señalización y mecanismos por los cuales se puede mantener las propiedades de estas células *in vitro*. Una vez establecidas, se observó que las líneas de ESC de ratón podían

cultivarse continuamente sin alteraciones de su cariotipo y presentaban una alta tasa de proliferación con un ciclo celular de aproximadamente 15 horas. Estas células presentan, además, alta expresión de telomerasa (Hiyama & Hiyama, 2007) lo que permite su cultivo por períodos virtualmente indefinidos de tiempo. Ante la diferenciación, este fenotipo inmortal se pierde y las células son susceptibles a mecanismos de envejecimiento celular como cualquier célula diferenciada no inmortalizada. Por otro lado, estas células retienen una capacidad enorme de diferenciarse, de forma similar a lo que ocurre con las células del MCI dando origen a células provenientes de las tres capas germinales.

Llamativamente, el primer cultivo de células madre embrionarias humanas (hESCs) *in vitro* fue establecido diecisiete años después que el de mESC, pese a que las técnicas para su derivación son comparables y varias de las herramientas moleculares necesarias para identificarlas y caracterizarlas ya habían sido desarrolladas (Thomson, 1998). Esto se debe principalmente a dos motivos. El primero, es que el material embrionario no era el adecuado y, segundo, a la reticencia inicial de los investigadores de trabajar en un campo que posee complicaciones morales, legales y políticas. El aporte de embriones humanos generados bajo altos niveles de calidad en clínicas de fertilización *in vitro* y la decisión política de apoyar estudios posibilitaron la generación de las primeras líneas de hESC, abriendo un campo de investigación que luego avanzó a una velocidad enorme. Las hESC resultantes, tenían algunas características en común con sus contrapartes murinas como la expresión de ciertos marcadores moleculares, alta actividad de telomerasa y la capacidad de formar de teratomas diferenciados *in vivo* (Richards, Fong, Chan, Wong, & Bongso, 2002; Thomson, 1998). Para 2001 ya se habían derivado más de setenta líneas utilizando MEFs como *feeder layer*. Sin embargo, estas líneas presentan la desventaja de haber sido establecidas y mantenidas en cultivos con componentes animales lo que las hace inviables para utilizar en terapias. Más aún, las líneas cultivadas durante largos períodos en condiciones *feeder free* presentan una gran heterogeneidad en la expresión de ciertos marcadores moleculares y una gran inestabilidad cariotípica (Rosler et al., 2004).

Bases moleculares del mantenimiento del estado indiferenciado y la pluripotencia

Como mencionamos anteriormente, las primeras mESC fueron derivadas y mantenidas sobre una capa de MEFs. Posteriormente, se descubrió que el medio condicionado de MEFs era capaz de mantener la autorenovación y pluripotencia de las mESC, eliminando la necesidad de utilizar una *feeder layer*. Para fines de los años 80, resultaba claro que estos fibroblastos secretaban algún factor capaz de mantener las ESCs en estado indiferenciado. Fue en el año 1988 que dos grupos demostraron que las MEFs inhibían la diferenciación de ESCs vía la producción de la citoquina de la familia de IL-6, el factor inhibidor de leucemia (LIF, por su sigla en inglés) (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Más aun, al agregar LIF recombinante al medio de cultivo las mESC pueden ser cultivadas en ausencia de MEFs o su medio condicionado por largos períodos de tiempo. Esta citoquina se une a un receptor heterodimérico compuesto por el Receptor de LIF β (LIFR) y gp130. La unión de LIF a su receptor resulta en la activación de la vía de transducción de señales Jak/STAT. Jak fosforila residuos tirosina tanto en gp130 como en LIFR los cuales, a su vez, reclutan y fosforilan a STAT3, activándolo. Está propuesto que la activación de STAT3 es necesaria y suficiente para mantener la pluripotencia de las mESC cuando son cultivadas en presencia de suero fetal bovino (SFB) (Figura I.3A).

Una segunda vía implicada en la autorenovación de las mESC involucra la señalización por proteínas morfogénicas del hueso (BMP, por su sigla en inglés), en particular BMP4. Si bien BMP4 generalmente no se agrega como factor recombinante, la presencia de éste en el SFB que contiene el medio en el cual se cultivan las mESC parece tener efectos importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado. BMP4 actúa promoviendo la expresión de los genes *Id1* e *Id3*, los cuales inhiben la diferenciación neural. Ying y colaboradores lograron mantener mESC en condiciones libres de SFB con el agregado simultáneo de LIF y BMP4 recombinante (Q. L. Ying, Nichols, Chambers, & Smith, 2003). Este trabajo fue el primero en remarcar que la autorenovación de las ESCs tiene que deberse a una serie de eventos coordinados que implican simultáneamente el mantenimiento del estado indiferenciado y el bloqueo de la diferenciación. De esta forma, la presencia de BMP4 inhibe la diferenciación hacia

ectodermo neural, mientras que LIF actuaría inhibiendo la diferenciación hacia los linajes endodermo y mesodermo.

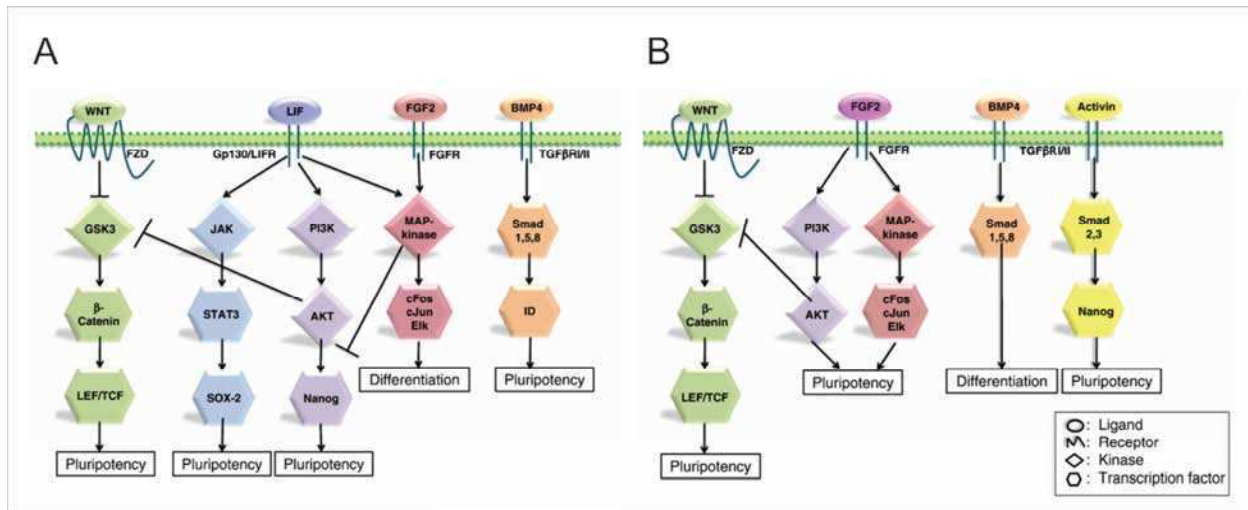


Figura 1.3: Vías de transducción de señales implicadas en el mantenimiento de las propiedades básicas de ESCs de A) ratón y B) humano. (Callihan, Mumaw, Machacek, Stice, & Hooks, 2011)

Está propuesto que otras vías de señalización colaboran con las arriba mencionadas en el mantenimiento de las propiedades de las células madre embrionarias de ratón. En particular, la vía de Wnt/Gsk3/βcatenina suprime la diferenciación en ESCs y en embriones tempranos (Kielman et al., 2002). Inhibición de la vía de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) impide la progresión desde G1 a S del ciclo celular y disminuye la proliferación de mESCs (Jirmanova, Afanassieff, Gobert-Gosse, Markossian, & Savatier, 2002). Y la activación de la vía de Ras/Raf/ERK promueve la diferenciación y suprime la autorenovación de estas células (Burdon, Stracey, Chambers, Nichols, & Smith, 1999; Yoshida-Koide et al., 2004). Recientemente, se ha logrado mantener y derivar mESC sin factores provenientes del SFB, utilizando LIF y una combinación de inhibidores de kinasas (Q.-L. Ying et al., 2008). Este medio, llamado 2i, contiene el inhibidor de Mek PD0325901 y el inhibidor de Gsk3 CHIR9902. Las células cultivadas en 2i presentan menor heterogeneidad en la expresión de ciertos factores de transcripción relevantes en la preservación de la pluripotencia que aquellas cultivadas en presencia SFB. Esta característica les confiere una mayor resistencia frente a estímulos de diferenciación externos que aquellas cultivadas en presencia de SFB.

En hESC, las vías de señalización involucradas en el mantenimiento de la autorenovación y la pluripotencia son diferentes a las reportadas en células de ratón (Figura 1.3B). Por ejemplo, la citoquina LIF no es capaz de mantener el estado indiferenciado en las ESCs humanas (Humphrey, Beattie, & Lopez, 2004). Por el contrario, estas células requieren de la activación de las vías de TGF β /Activina/Nodal y FGF para mantener su pluripotencia. El factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2 o bFGF) es el factor usado de rutina para promover la autorenovación de hESC. La unión de bFGF a su receptor lleva a la autofosforilación de este último y a la activación de las cascadas de RAS/ERK y de PI3K (R. Xu et al., 2005). Por otro lado, la superfamilia de ligandos de TGF β transduce su señal al interior de la célula por dos ramas diferentes. Los ligandos BMP y GDF lo hacen a través de los factores SMAD1 y SMAD5 mientras que la rama de TGF β /Activina/Nodal lo hace a través de los SMAD2 y 3. En células indiferenciadas los efectores SMAD2 y 3 se encuentran activados pero cuando éstas son forzadas a diferenciarse, la activación de SMAD2/3 decrece mientras que la de SMAD1/5 aumenta (James, Levine, Besser, & Hemmati-Brivanlou, 2005). Además, SMAD2/3 se une al promotor de NANOG, aumentando su transcripción. Se encuentra reportado que tanto la vía de TGF β /Activina/Nodal como la de bFGF cooperan, y que la activación de ambas vías es necesaria para mantener el estado indiferenciado de hESC por períodos prolongados de cultivo (R.-H. Xu et al., 2008).

Dado que poseen idéntico genoma, lo que distingue una célula pluripotente de su contraparte diferenciada es su programa de expresión génica. Dicho programa, debe estar finamente regulado y debe ser capaz de ser transmitido a sus células hijas de alguna manera. Los factores arriba mencionados interactúan en una compleja red de transducción de señales que permite el mantenimiento en estado indiferenciado de ESCs. Sin embargo, la activación de estas vías en células terminalmente diferenciadas no es suficiente para establecer el perfil de expresión génica que posee una célula pluripotente. Los primeros estudios genéticos con ESCs demostraron que los factores de transcripción Oct4 y Nanog son reguladores esenciales de ESCs y en el desarrollo temprano *in vivo* (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998). Estos factores de transcripción se expresan tanto en ESCs como en células del MCI del blastocisto. El silenciamiento tanto de Oct4 como de Nanog causa la pérdida de la

pluripotencia. Asimismo, células defectivas en Oct4 se diferencian a trofoectodermo y el silenciamiento de Nanog provoca diferenciación a endodermo extraembrionario. Oct4 puede, además, heterodimerizar con el factor de transcripción Sox2, contribuyendo a mantener el estado indiferenciado a través de la estabilización de los niveles de Oct4.

Dos trabajos, uno de Boyer y colaboradores en 2005 y otro de Loh y colaboradores en 2006, estudiaron qué sitios eran ocupados por Oct4, Sox2 y Nanog en el genoma humano y de ratón, respectivamente (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Estos experimentos condujeron a tres descubrimientos importantes que permitieron entender mejor los mecanismos moleculares por los cuales se establece y mantiene el estado indiferenciado. El primero es que Oct4, Sox2 y Nanog se unen juntos a los promotores de cada uno de ellos formando una red transcripcional autoregulatoria. Este circuito autoregulatorio sugiere que los tres factores cooperan para mantener su propia expresión en niveles precisos. Estudios funcionales confirmaron además, que Oct4 y Sox2 son reclutados al mismo tiempo a los genes de Oct4 y Nanog, induciendo su expresión. Segundo, existen muchos genes cuyos promotores son ocupados por los tres factores al mismo tiempo (Figura I.4A). Esto sugiere que estos factores de transcripción actúan coordinadamente para mantener el programa de expresión transcripcional requerido en células pluripotentes. Oct4 y Nanog pueden, además, ser co-precipitados en ESCs. Por último, los genes que son ocupados por los tres factores pueden ser clasificados en genes dos grupos. Uno que se transcribe activamente en ESCs y que incluye factores de transcripción, componentes de vías de transducción de señales y enzimas modificadoras de la cromatina que colaboran para mantener el estado indiferenciado. El otro grupo involucra factores de transcripción del desarrollo, cuya expresión se asocia a la diferenciación celular y la especificación de linaje, los cuales se encuentran silenciados en ESCs. De esta última observación se desprende la idea de que, además de promover la expresión de genes específicos del estado indiferenciado, Oct4, Sox2 y Nanog también contribuyen a mantener reprimidos múltiples factores de diferenciación.

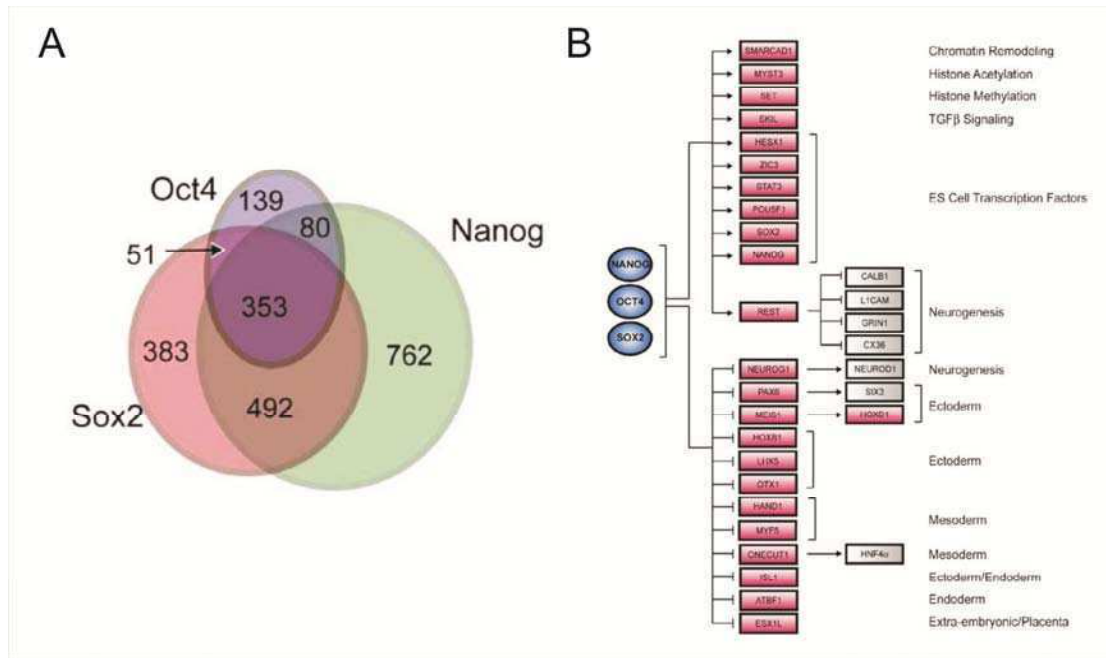


Figura 1.4: A) Número de promotores a los que son reclutados Oct4, Sox2 y Nanog. Las intersecciones de los diagramas representan los promotores que son ocupados simultáneamente por dos o por los tres factores simultáneamente. B) Genes que son inducidos (grupo de arriba) o silenciados (grupo de abajo) por Oct4, Sox2 y Nanog. Adaptado de Boyer et al. 2005.

¿Cómo se evalúa la pluripotencia y la auto-renovación?

Existen distintas formas de analizar la pluripotencia de las ESCs. La prueba más rigurosa es la complementación de células tetraploides. Este ensayo consiste, primero, en generar blastocistos 4n. Para ello se toman embriones normales en el estadio de dos células y se provoca la fusión de estas células por medio de corriente eléctrica. Esta célula 4n continuará dividiéndose hasta llegar al estadio de blastocisto. Pese a que este blastocisto tetraploide es capaz de implantarse en las paredes del útero y de generar tejidos extraembrionarios, sus células son incapaces de contribuir a los linajes somáticos y, por ende, de formar un feto normal. Una vez generados los embriones 4n, se les inyecta las células a probar. De esta forma, el feto que se forme estará compuesto exclusivamente de células que derivan de las que fueron inyectadas.

Otro experimento de alta rigurosidad para analizar la pluripotencia de células consiste en ensayar su habilidad para contribuir en la línea germinal y en todos los tejidos de un animal adulto. Para ello, son inyectadas en blastocistos receptores,

formando animales denominados quimera. Esta metodología, sin embargo, no puede ser empleada en hESCs por cuestiones éticas.

Una alternativa a los ensayos anteriores consiste en utilizar un modelo experimental de injerto subcutáneo. Este modelo experimental, que también es muy utilizado, consiste en la inyección de mESCs o hESCs en ratones inmunocomprometidos, en los que forman tumores denominados teratomas. La habilidad de las ESCs inyectadas de generar tumores que contengan distintos tipos celulares derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo es indicativa de su pluripotencia (Ohtsuka & Dalton, 2008).

Existen también métodos *in vitro* para analizar la pluripotencia de las ESCs, como la formación de cuerpos embrioides, mediante un protocolo de diferenciación no dirigido, en los que se analiza la presencia de las tres capas germinales (Kurosawa, 2007) o la diferenciación a linajes específicos.

Además del análisis funcional del potencial de diferenciación de las ESCs, para evaluar pluripotencia, otra propiedad que se debe analizar es el mantenimiento del estado indiferenciado a lo largo de los sucesivos pasajes. Para ello, es común el análisis de la expresión de marcadores moleculares como evidencia. Muchos de estos marcadores son factores de transcripción expresados en el MCI y en las ESCs, que han demostrado roles importantes en su mantenimiento. Los marcadores más importantes y mejor caracterizados incluyen a los factores de transcripción Oct3/4, Nanog y Sox2 (Niwa, 2007). Otros marcadores incluyen alta expresión de TERT, que es la subunidad catalítica de la telomerasa, la tetraspanina CD9 y a los carbohidratos N-acetilglucosamina y SSEA-1 (Ohtsuka & Dalton, 2008). De modo similar, se encuentran descriptos marcadores moleculares específicos para analizar las células diferenciadas. Entre éstos se encuentran β 3-tubulina que marca el linaje de ectodermo, Brachyury que identifica derivados del mesodermo y alfafetoproteína (AFP) que marca el linaje del endodermo (Takahashi & Yamanaka, 2006). Por otro lado, Cdx2 y Gata6 marcan a los linajes del trofoectodermo y del endodermo primitivo, respectivamente (Niwa, 2007). La existencia de marcadores moleculares facilita en gran medida, si bien no de modo concluyente, el análisis del estado indiferenciado así como de la diferenciación de ESCs y es una herramienta de uso cotidiano en el trabajo con éstas.

Células Madre Pluripotentes Inducidas

Durante el normal desarrollo de un individuo, las células transitan un proceso de diferenciación unidireccional desde el cigoto totipotente, pasando por las células pluripotentes del macizo celular y el epiblasto, hasta llegar a células diferenciadas y comprometidas con un tipo celular determinado. Estas transiciones ocurren en el contexto del embrión como resultado de señales extracelulares, interacciones célula-célula y modificaciones epigenéticas específicas. Sin embargo, este proceso puede ser revertido y llevar una célula terminalmente diferenciada a un estadio pluripotente, si se activan las señales adecuadas. En 2006 Takahashi y Yamanaka lograron reprogramar células somáticas, produciendo células similares a las ESCs (Takahashi & Yamanaka, 2006). Para ello introdujeron en MEFs y en fibroblastos adultos genes que codifican los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y C-Myc, forzando su expresión, y seleccionaron con antibióticos aquellas células que expresaran un gen blanco de Oct4, llamado Fbx15 (Figura I.5). Dichas células fueron llamadas Células Madre Pluripotentes Inducidas (o iPSC, por su sigla en inglés) y demostraron ser pluripotentes en ensayos de formación de teratomas aunque, en una primera instancia, las células reprogramadas de esta manera no lograron dar ratones quimeras. En este primer ensayo de reprogramación, los promotores endógenos de Oct4 y Nanog permanecieron mayormente metilados y sus niveles de expresión fueron muy bajos o no alcanzaron los de ESCs. Posteriormente, se reprogramaron células somáticas utilizando el reportero Nanog-GFP como criterio de selección más estricto. Las células Nanog-GFP positivas, resultaron completamente reprogramadas a un estado pluripotente mostrando varias cualidades similares a células embrionarias. Entre ellas, un perfil de expresión idéntico a las ESCs, expresión de Oct4 y Nanog endógenos y promotores de genes de pluripotencia hipometilados. Las Nanog-iPSC formaron, además, ratones quimera que aportaron células a su línea germinal (Okita, Ichisaka, & Yamanaka, 2007). Un año después de su primer trabajo, el grupo de Yamanaka logró reprogramar células somáticas humanas (Takahashi et al., 2007). El cambio de paradigma que significó el trabajo de Yamanaka permitió eludir el problema ético del uso para investigación y terapia de las células madre embrionarias y, a la vez, resolvió el problema técnico de rechazo inmunológico que tendrían estas células dado que

ahora se podrían generar células reprogramadas del propio paciente a trasplantar. No obstante, la comunidad científica hoy en día, considera que la aplicación terapéutica de iPSCs paciente-específica resultaría demasiado costosa e incompatible con los tiempos requeridos para este tipo de terapia. Alternativamente, se está trabajando en el establecimiento de bancos de IPSCs.

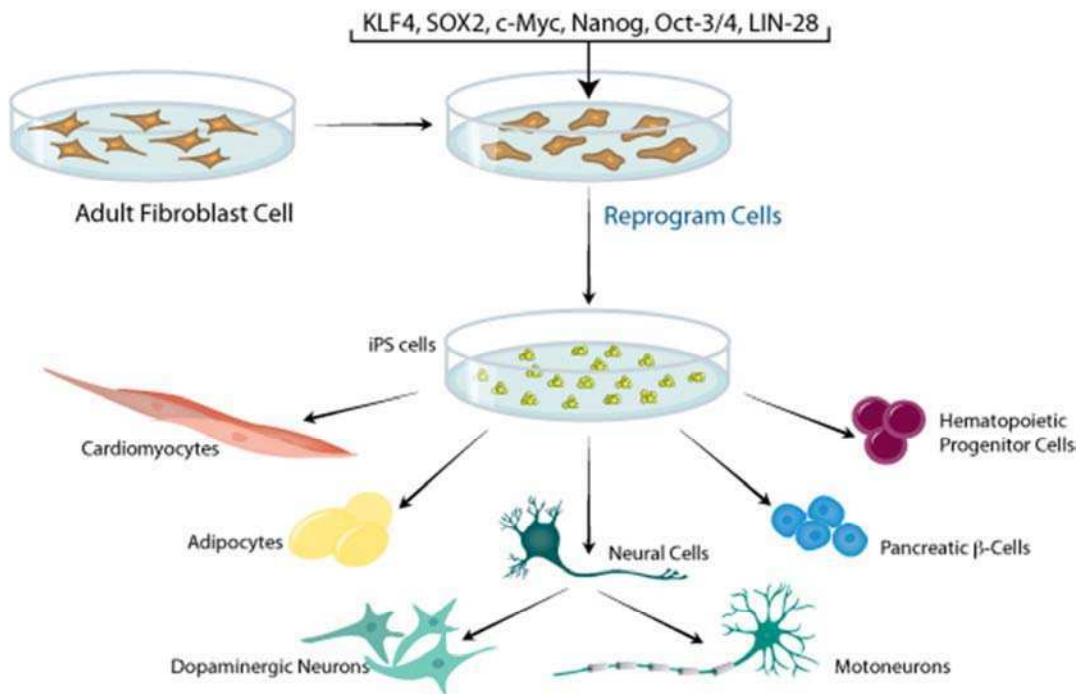


Figura I.5: Al forzar la expresión de ciertos factores en células adultas se logra desdiferenciarlas (reprogramarlas) a células similares a las ESCs. Estas células reprogramadas, llamadas iPSC, pueden ser luego diferenciadas a células derivadas de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo.

Epigenética de las Células Madre Pluripotentes

Como mencionamos anteriormente, todas las células de un adulto provienen de una sola célula: el oocito. Estas células comparten el mismo genoma, sin embargo tienen fenotipos muy distintos y cumplen funciones muy diferentes. Esto significa que la identidad de cada célula es adquirida durante el desarrollo, mayormente por mecanismos epigenéticos. Estos cambios epigenéticos son, generalmente, unidireccionales y provocan cambios en el programa de expresión génica de las células

que redundan en cambios fenotípicos y especialización de la función celular. La regulación epigenética de la expresión génica ocurre a diversos niveles que incluyen metilación de islas CpG en el DNA, modificaciones de histonas, rearrreglos de nucleosomas y estructuras de cromatina de orden mayor y dinámica nuclear.

La metilación de citosinas en el dinucleótido CpG de promotores es la forma de modificación epigenética predominante a nivel del DNA. El patrón de metilación en el DNA de mamíferos es mantenido por la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1). Esta metiltransferasa metila preferentemente DNA hemi-metilado manteniendo las metilaciones durante la replicación del DNA. Por el contrario, las DNMT3A y DNMT3B no presentan preferencias por el DNA hemi-metilado y pueden metilar DNA no modificado *de novo*. Estas metiltransferasas son las responsables de restaurar los niveles de metilación en las células del macizo celular interno del blastocisto luego de la fertilización (Okano, Bell, Haber, & Li, 1999). Ambas, las metiltransferasas *de novo* y las de mantenimiento se expresan en ESCs. Más aún, deficiencias en estas enzimas causan hipometilación del DNA y una progresiva pérdida de su potencial de diferenciación (Chen, Ueda, Dodge, Wang, & Li, 2003). Resulta interesante que esta hipometilación del DNA parece no afectar la capacidad de autorenovación de las ESCs (Tsumura et al., 2006).

Sin embargo, la metilación del DNA no es la primera modificación epigenética que ocurre tras la llegada de un estímulo de diferenciación, sino que ésta actúa consolidando la represión génica previamente establecida. La modulación en los programas transcripcionales durante el desarrollo está dada por la regulación en la organización de la cromatina.

El término cromatina fue creado en 1882 por Walther Flemming luego de que observó, por técnicas histológicas, una estructura fibrosa en el núcleo. Esta estructura se teñía más intensamente que otras y por eso la llamó cromatina (material que se teñe). Cincuenta años después, Emil Heitz hizo la distinción entre heterocromatina y eucromatina basándose en la tinción diferencial entre estos dos componentes. La heterocromatina representa las zonas más densamente compactadas y más fuertemente teñidas, mientras que la eucromatina consta de las porciones levemente teñidas. La unidad fundamental de la cromatina son los nucleosomas, compuestos por dos copias de las cuatro proteínas histonas clásicas, H2A, H2B, H3 y H4, rodeadas por

146 pares de bases de DNA. Los nucleosomas se conectan entre sí por regiones de DNA “linker” asociado a la histona H1, las cuales pueden tener tamaños variables (Gan, Yoshida, McDonald, & Owens, 2007). Posteriormente, un nivel de organización de orden superior lo constituye la fibra de 30 nm, compuesta por grupos de nucleosomas empaquetados unos sobre otros, adoptando disposiciones regulares debido a la acción de la histona H1. Existen diversos grados superiores de plegamiento, siendo los cromosomas que se observan en la metafase de la mitosis el nivel máximo de compactación del DNA (Figura I.6).

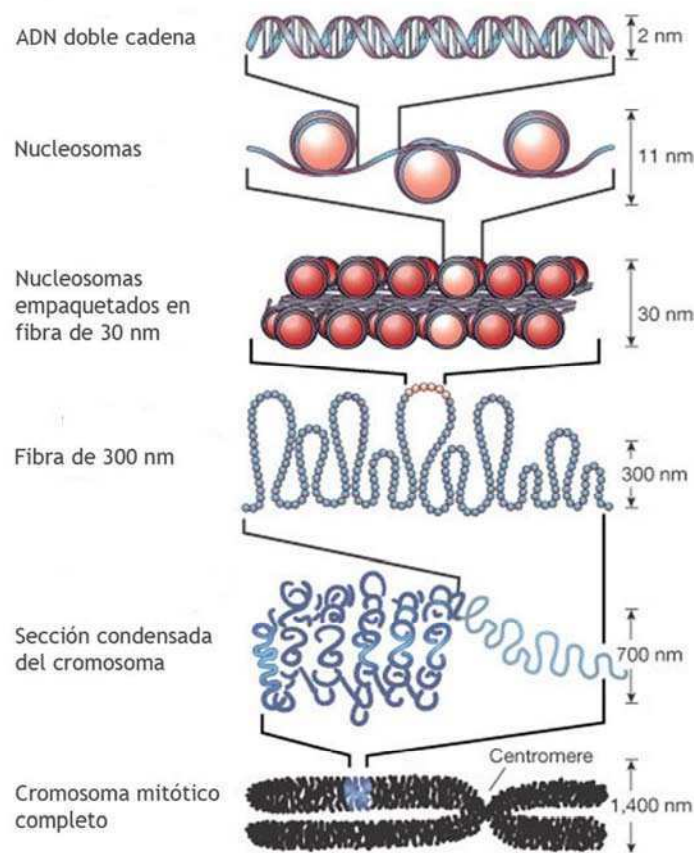


Figura I.6: Niveles de organización de la cromatina en células eucariotas.
Extraído y modificado de Felsenfeld y colaboradores (Felsenfeld & Groudine, 2003)

La evidencia recolectada hasta el momento mediante técnicas histológicas y microscopía electrónica sugiere que la conformación de la cromatina en células madre se encuentra mayormente abierta, es decir, que casi no contienen zonas heterocromáticas (Park et al., 2004). En comparación, las células diferenciadas poseen

más zonas compactas que se tiñen fuertemente. Más aún, el patrón epigenético de las ESCs también se puede encontrar en las células del MCI, *in vivo* (Ahmed et al., 2010). Estos estudios son apoyados, además, por estudios de sensibilidad a nucleasas: las ESCs son muy sensibles al tratamiento con DNasa I o nucleasa micrococcal (MNasa) pero se tornan más resistentes a estas enzimas luego de que son diferenciadas *in vitro*. Esta conformación “abierta” de la cromatina en ESCs sugirió la posibilidad de que estas células tuvieran una mayor transcripción general que las células comprometidas con un tipo celular en particular. Estudios del tipo *whole genome* han confirmado estas conjeturas, revelando una elevada actividad transcripcional global en células indiferenciadas la cual se pierde cuando las células son diferenciadas (Efroni et al., 2008).

Estas características tan particulares de la organización cromatínica de las ESCs despertaron, en los últimos años, un gran interés en el ambiente científico. En particular, surgen interrogantes en cuanto a si esta conformación es vital para mantener el estado indiferenciado y es la causa de la elevada actividad transcripcional de estas células. Existen, a grandes rasgos, dos formas de regular la estructura de la cromatina: la modificación ATP-dependiente del posicionamiento de los nucleosomas y la modificación covalente de histonas. Las proteínas histonas que componen los nucleosomas pueden sufrir más de cien modificaciones post-traduccionales diferentes, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, poliADP ribosilación e isomerización de prolinas (Figura 1.7A). Esto ocurre mayormente en la porción amino terminal de estas proteínas, denominada “cola”. Las modificaciones post-traduccionales más estudiadas son: la acetilación en la cual la adición del grupo acetilo está catalizada por enzimas acetil-transferasas de histonas (HATs, por su sigla en inglés) y la remoción del mismo por deacetilasas de histonas (HDACs) (Figura 1.7B); y la metilación, en la cual las metil-transferasas de histonas (HMTs) agregan el grupo metilo y las demetilinasas de histonas (HDMs) lo quitan (Figura 1.7C). En general, la acetilación de las histonas H3 y H4 y la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) señalan la unión de la Polimerasa II al DNA y correlaciona con la activación transcripcional. Por el contrario, trimetilación de la lisina 9 o de la lisina 27 de la histona H3 (H3K9me3 y H3K27me3, respectivamente) son indicadores de represión transcripcional (Bernstein, Meissner, & Lander, 2007).

La cromatina de las ESCs es abundante en marcas epigenéticas asociadas a activación transcripcional. Sin embargo, como dijimos anteriormente, para prevenir la diferenciación celular prematura, deben estar silenciados los genes que regulan el desarrollo. Llamativamente, dichos genes no sólo presentan marcas represivas como H3K27me3 sino también marcas activadoras, como H3K4me3 (Bernstein et al., 2006) (Figura I.8). Se cree que estos dominios “bivalentes” se encuentran silenciados en células pluripotentes, pero preparados para activarse rápidamente en el caso de recibir algún estímulo de diferenciación.

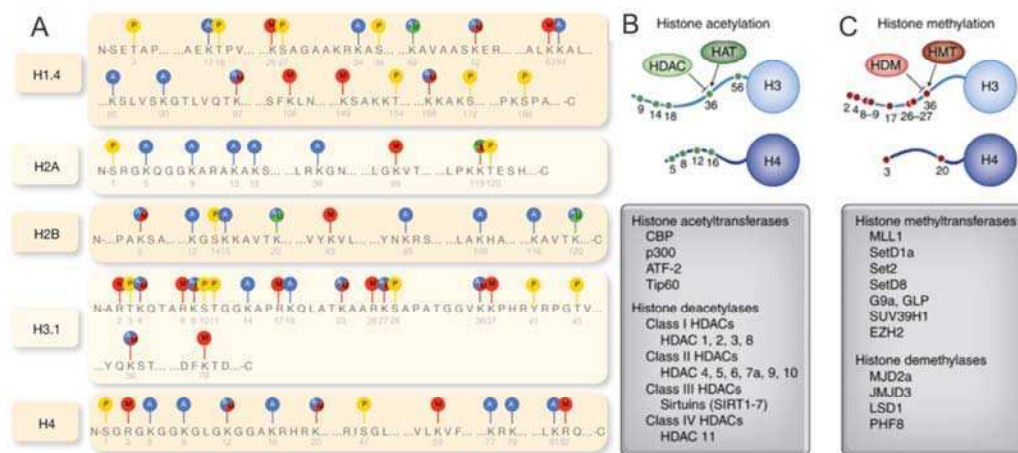


Figura I.7: A) Mapa de las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir los residuos aminoacídicos (recuadros de la derecha) de las histonas correspondientes (recuadros más pequeños de la izquierda) (Portela & Esteller, 2010). B) Ejemplos de distintas HATs que catalizan la adición de un grupo acetilo y HDACs que lo remueven. C) Ejemplos de distintas HMTs que adicionan un grupo metilo y HDMs que lo remueven (Day & Sweatt, 2011)

Las enzimas que modifican post-traduccionamente a las histonas se llaman remodeladores de cromatina. Muchas de ellas han demostrado cumplir alguna función en ESCs. Uno de los grupos de remodeladores más investigados y mejor caracterizados hasta el momento es el grupo de proteínas Polycomb (PcG). Este grupo incluye al complejo represor Polycomb 2 (PRC2) que cataliza la adición de la marca H3K27me3 y el PRC1, que reconoce dicha marca. Estudios a nivel global en mESCs y hESCs revelaron que varias proteínas del PcG se encuentran posicionadas preferentemente sobre aquellos genes reguladores del desarrollo que están silenciados (Boyer et al., 2006; T. I. Lee et al., 2006). Las ESCs deficientes en proteínas PcG son incapaces de silenciar

genes linaje-específicos y, pese a que son capaces de mantenerse en estado indiferenciado, estas células tienen muchos defectos durante el proceso de diferenciación (Chamberlain, Yee, & Magnuson, 2008). Las proteínas PcG son reclutadas a sus genes blanco por la demetilasa de histonas Jarid2. Las células deficientes en Jarid2 se diferencian defectivamente, lo que refuerza la hipótesis de que la actividad del PRC2 es indispensable para el correcto encendido de los genes linaje-específico. Los trabajos que demuestran la necesidad de Jarid2 en el reclutamiento del PRC2 fueron publicados durante el transcurso de esta tesis de doctorado (Landeira et al., 2010; Pasini et al., 2010).

Como mencionamos anteriormente, la trimetilación de H3K9 también está asociada a la represión transcripcional (Figura I.8). Esta marca se encuentra presente en alrededor de un 4% en células indiferenciadas y aumenta hasta el 12% en células diferenciadas (Hawkins et al., 2010). La enzima responsable de adicionar esta marca es la metil-transferasa G9a (también llamada EHMT2). Esta enzima se requiere para silenciar el gen de Oct4 durante la diferenciación, uniéndose a su promotor y metilando las histonas presentes. Posteriormente G9a recluta DNMTs lo cual lleva, a su vez, a la metilación y heterocromatinización definitiva del promotor de este regulador maestro de la pluripotencia (Epsztejn-Litman et al., 2008).

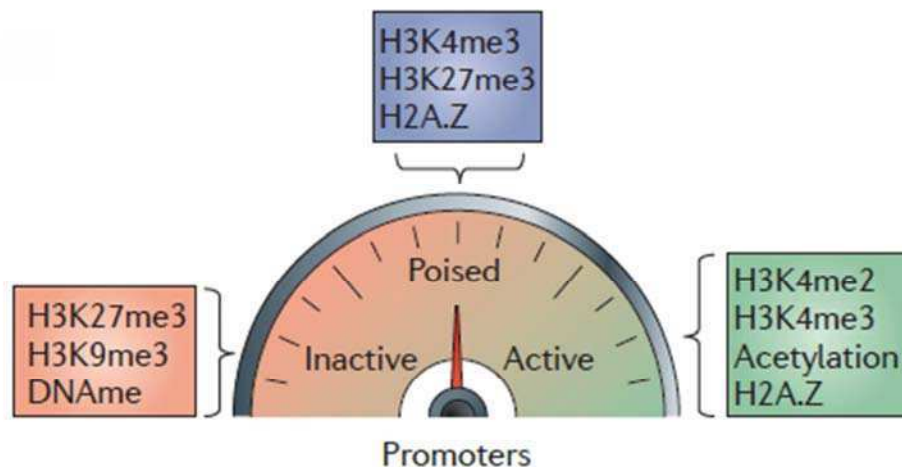


Figura I.8: Las distintas marcas epigenéticas se asocian a diferentes niveles de transcripción (Zhou, Goren, & Bernstein, 2011)

Además de la adición o remoción de marcas de histonas, otra forma de regular la estructura de la cromatina es modificar la posición de los nucleosomas mediante enzimas ATP-dependientes. Este nivel de regulación epigenética también es importante para mantener las propiedades fundamentales de las ESCs. Las enzimas modificadoras ATP-dependientes se clasifican en cuatro familias: SWI/SNF (por *swich/sucrose nonfermentable*), CHD (por *chromodomain helicase DNA binding*), ISWI (por *imitation swich*) e INO80 (*inositol-requiring 80*). Aunque existen representantes de las cuatro familias que cumplen algún rol en ESCs, quizás uno de los más relevantes es el complejo BAF de la familia de SWI/SNF. Este complejo tiene una composición específica en células madre, llamado esBAF, siendo BRG1 su subunidad catalítica. Los ratones *knock out* para Brg1 mueren en el estadio peri-implantatorio y las ESCs defectivas en este gen muestran una morfología aberrante, una menor tasa de proliferación y una menor capacidad de diferenciarse (Fazio, Huff, & Panning, 2008; Ho et al., 2008).

En los últimos años, el foco de atención de los investigadores se volcó hacia el rol que cumple la estructura de la cromatina de alto orden. Más allá de la modulación de la expresión génica a nivel de la fibra de 30 nm debido a las modificaciones post-traduccionales de las histonas, hoy se sabe que las zonas que se transcriben activamente ocupan una región definida dentro del núcleo. Un compartimento clave dentro del núcleo es la periferia nuclear. Se ha reportado que la asociación de regiones cromosómicas a este compartimento nuclear facilita la represión transcripcional de las mismas (Andrulis, Neiman, Zappulla, & Sternglanz, 1998; Reddy, Zullo, Bertolino, & Singh, 2008). Estas regiones llamadas Dominios Asociados a la Lámina (o LADs, en inglés) se encuentran íntimamente asociados a la lámina nuclear (Figura I.9). Los LADs interactúan con la lámina nuclear mediante diversas proteínas intermediarias, se encuentran enriquecidos en H3K27me3 y no poseen H3K4me3 (Guelen et al., 2008). La lámina nuclear es un conjunto de filamentos intermedios que se encuentran asociados a la envoltura nuclear en el interior del núcleo. Su composición varía entre células diferenciadas y ESCs. Mientras que en las primeras contiene Laminas del tipo A y B, en células pluripotentes y en el embrión temprano sólo está compuesta de Laminas tipo B (Dechat et al., 2008). Recientemente un grupo realizó un mapa de los LADs de todo el genoma en ESCs, progenitores neurales y MEFs (Peric-Hupkes et al., 2010). Al inducir la

diferenciación de ESCs a progenitores neurales, observaron un cambio de los dominios asociados a la lámina nuclear. Los genes inducidos con la diferenciación se alejan de la periferia y se reposicionan en el centro del núcleo mientras los genes de factores de pluripotencia recorren el camino inverso, terminando fuertemente asociados con la lámina nuclear. Los autores muestran que las interacciones de los LADs con la lámina son dinámicas y sugiere muy fuertemente que este mecanismo puede proveer un control espacial de control de la expresión génica.

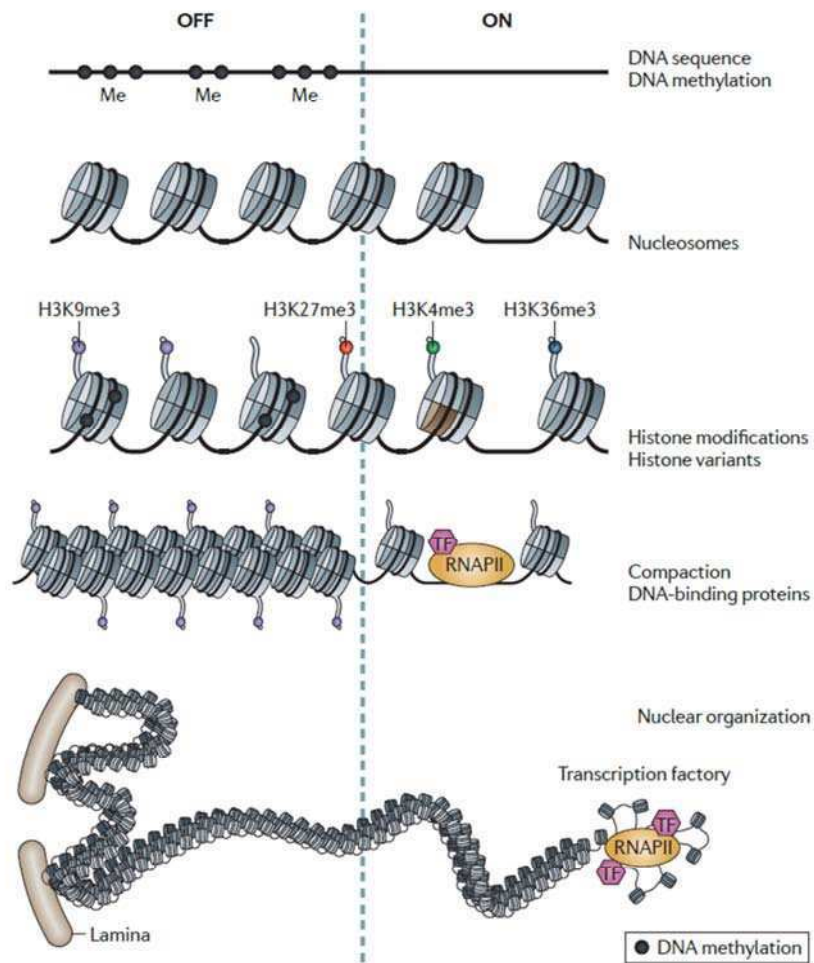


Figura I.9: Resumen de los mecanismos de regulación epigenética de la expresión génica. La metilación del ADN, el acercamiento de los nucleosomas, la marca H3K9me3, la compactación de los nucleosomas y la asociación de regiones cromosómicas con la lámina nuclear correlacionan con el silenciamiento génico. Por otra parte, el DNA demetilado, el remodelado nucleosómico por enzimas remodeladoras, las marcas H3K4me3 y H3K36me3 y las fábricas transcripcionales en el interior del núcleo correlacionan con transcripción activa (Zhou et al., 2011)

La Proteína Metiltransferasa de Argininas 8 (PRMT8)

La metilación del aminoácido arginina es una modificación post-traducciona muy común en proteínas, tanto nucleares como citoplasmáticas. Esta modificación cumple diversos roles en la célula incluyendo activación o represión transcripcional, modulación del *splicing* de RNAs mensajeros, ensamblado de los ribosomas y transporte nucleo-citoplasmático del RNA (Bedford & Richard, 2005). La metilación de argininas está mediada por la familia de enzimas proteína arginina metiltransferasas (PRMTs). El aminoácido arginina posee un grupo guanidino posicionado de manera tal que puede formar potencialmente cinco interacciones del tipo puente de hidrógeno con un aceptor compatible. Por ejemplo, en las interacciones proteína-DNA los residuos de arginina son los más frecuentes donores de puente de hidrógeno a las bases nitrogenadas timina, adenina y guanina (Bedford & Clarke, 2009). En mamíferos, esta modificación es catalizada por cuatro tipos de enzimas PRMTs. Las enzimas de tipo I, II y III transfieren los grupos metilo desde la S-adenosyl-L-metionina, mejor conocida como AdoMet, al nitrógeno- ω del grupo guanidino de la arginina dando como resultado ω -N^G-mono-metilarginina (MMA ω) (Figura I.10). Por otro lado, las enzimas del tipo IV catalizan la adición de un grupo metilo al nitrógeno- δ de la arginina (MMA δ). Hasta el momento, solo se ha reportado actividad del tipo IV en levaduras. Esta serie de modificaciones puede ser aún más compleja debido a que las enzimas del tipo I y II son capaces de sumar un metilo más a la arginina previamente modificada en el nitrógeno ω para dar argininas dimetiladas. De esta manera las enzimas con actividad tipo I producen residuos ω -N^G,N^G-di-metilarginina, denominada comúnmente di-metilarginina asimétrica (ADMA por su sigla en inglés) y las tipo II, ω -N^G,N^G-di-metilarginina, también llamada di-metilarginina simétrica o SDMA. En la ADMA, que es la modificación más frecuente, los dos grupos metilo son ubicados en uno sólo de los átomos de nitrógeno terminales del grupo guanidino. Mientras que en la SDMA en la cual se adiciona un grupo metilo a cada uno de los nitrógenos terminales.

Existen nueve genes que codifican para proteínas de la familia de enzimas PRMT. Las enzimas Prmt1, Prmt2, Prmt3, Prmt4, Prmt6 y Prmt8 poseen actividad del tipo I (Figura I.10). Prmt5 y Prmt7 poseen actividad del tipo II, aunque para esta última se ha observado también actividad del tipo III. Prmt1 fue la primera PRMT que se

caracterizó, probablemente debido al hecho de que se expresa en casi todos los tejidos y es además, la más abundante de toda la familia. Esta proteína es responsable de aproximadamente el 85% de las metilaciones en arginina de la célula y posee una gran variedad de sustratos. Entre ellos se encuentra la histona H4, la cual puede ser dimetilada asimétricamente en la arginina 3 (Wang & Li, 2012).

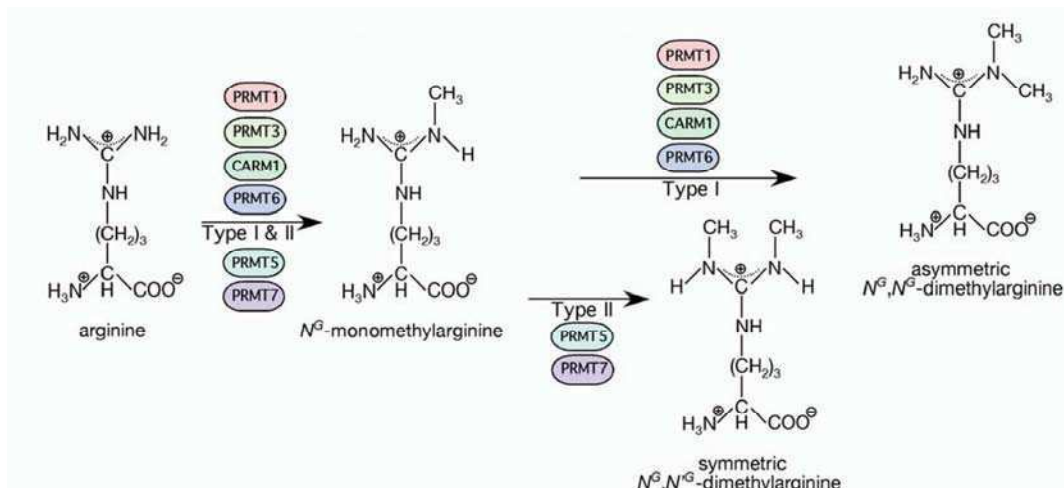


Figura I.10: Los tres tipos de actividades metiltransferasa. La dimetilación asimétrica es catalizada por las Prmts del tipo I, mientras que la dimetilación simétrica es catalizada por las del tipo II. Ambos tipos de enzimas catalizan la monometilación. Prmt8 es una enzima del tipo I (Bedford & Richard, 2005)

El rol de las metiltransferasas en el mantenimiento de la pluripotencia se encuentra poco estudiado. En el año 2000 se demostró que PRMT1 es esencial durante el desarrollo del ratón, dado que las mutaciones en este gen son letales poco tiempo después de la implantación del embrión (Pawlak, Scherer, Chen, Michael, & Ruley, 2000). Pese a que Prmt1 parece ser indispensable para el desarrollo, las mESCs deficientes en esta enzima son viables. Cabe aclarar que en el trabajo realizado por Pawlak y colaboradores se estudió la viabilidad pero no la pluripotencia de las células madre embrionarias mutadas.

PRMT8 aparenta ser un gen parálogo a PRMT1, compartiendo alrededor del 90% de su secuencia en vertebrados (Hung & Li, 2004) (Figura I.11). Hasta el momento, la bibliografía describe a PRMT8 como un gen cuya expresión se encuentra estrictamente limitada a neuronas en el cerebro de ratones adultos (Kousaka et al.,

2009). La secuencia de la enzima Prmt8 es 33 aminoácidos más larga que la de Prmt1 y contiene en su amino terminal una glicina pasible de ser miristoilada (J. Lee, Sayegh, Daniel, Clarke, & Bedford, 2005). Más aún, diversos ensayos sugieren que este N-terminal diferencial está sujeto a diferentes modificaciones que pueden regular la actividad de Prmt8 (Sayegh, Webb, Cheng, Bedford, & Clarke, 2007a). Por ejemplo, clivaje de esta porción de la enzima aumenta considerablemente su actividad y al mutar la glicina susceptible de ser miristoilada por una alanina, la proteína deja de estar asociada a membrana y se localiza en el núcleo. Sin embargo, estos experimentos fueron realizados *in vitro* o en líneas celulares con diversas construcciones que sobreexpresan la proteína de fusión correspondiente.

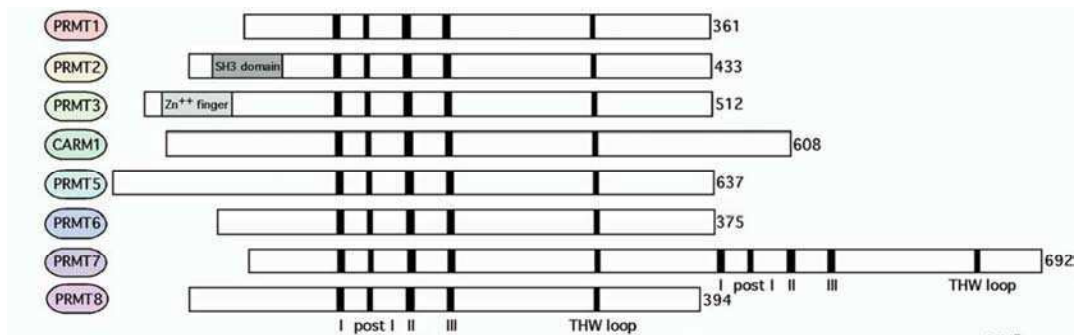


Figura I.11: Homología entre los distintos integrantes de la familia de Prmts. Prmt1 y Prmt8 difieren en 33 aminoácidos de su porción amino terminal (Bedford & Richard, 2005)

Hipótesis y Objetivos

En esta introducción nos propusimos destacar la relevancia que tiene el remodelado de la cromatina en el mantenimiento de las propiedades esenciales de las ESC en estado indiferenciado, con su diferenciación y con el proceso de reprogramación para la obtención de CMPI. Nuestra hipótesis propone que la modulación de la expresión de determinados remodeladores de la cromatina podría afectar los mencionados procesos. Postulamos la existencia de una relación bidireccional entre los niveles y la actividad de proteínas que remodelan la cromatina y de los factores de transcripción críticos en el mantenimiento de las propiedades de las células pluripotentes. Esto implicaría, por una parte, la existencia de modificaciones en la estructura de la cromatina en los genes de los factores de transcripción esenciales para la regulación de las células pluripotentes y, por otra parte, la existencia de mecanismos de control de la actividad de reguladores epigenéticos por estos factores de transcripción. Esto último podría, a su vez, involucrar al menos dos mecanismos, ambos dependientes de los factores de transcripción críticos en ESC. Por un lado, la inducción de la expresión de genes remodeladores de cromatina como una de las posibles formas de regulación de su actividad y, por otro lado, el reclutamiento de estos remodeladores de cromatina a promotores de genes específicos con influencia directa sobre el fenotipo celular.

El objetivo general del proyecto en que se enmarca este trabajo es estudiar la participación de proteínas remodeladoras de la cromatina en el mantenimiento del estado indiferenciado y en el proceso de diferenciación de las células madre pluripotentes.

En base a la hipótesis planteada y al objetivo general, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el patrón de expresión de proteínas modificadoras de la cromatina en ESC, en iPSC indiferenciadas y en distintos estadios de diferenciación.

2. Generar líneas de ESC que sub-expresen algún gen relacionado con el remodelado de la cromatina que resulte de interés.

3. Evaluar en las líneas obtenidas, el efecto de la modificación de los niveles de expresión de las proteínas modificadoras de la cromatina seleccionadas,

3.1- sobre el mantenimiento del estado indiferenciado

3.2- sobre la diferenciación

4. Estudiar la regulación de los genes candidato seleccionados por los factores de transcripción esenciales para la preservación de la pluripotencia.

Creemos que los conocimientos generados en el campo de la epigenética de células madre pueden contribuir a plantear estrategias que ayuden, en un futuro, a diseñar nuevas terapias celulares.

Materiales y Métodos

1. Cultivo celular

Trabajamos con las líneas de CME de ratón Ainv15 y R1, las cuales fueron adquiridas comercialmente (ATCC). Ambas líneas pueden ser cultivadas sobre una capa alimenticia de células, o *feeder layer*, compuesta por fibroblastos embrionarios murinos (MEF) irradiados o sobre placas cubiertas con gelatina de piel bovina para favorecer la adherencia de las células.

Para la propagación y el mantenimiento del stock celular mantuvimos las células en placas de 6 cm de diámetro (p60) sobre MEF utilizando medio de propagación (MP), compuesto por Dulbecco's minimal essential medium (high-glucose DMEM) DMEM (Invitrogen: Gibco 10829-018) suplementado con 2mM l-alanyl-l-glutamine (Gibco), 100 mM MEM non essential amino acids (Gibco) , 0.5mM beta-bercaptoetanol, y antibioticos (100U/ml penicillina and 100 mg/mL streptomina, Gibco) 15% de SFB (Life Technologies).. Contamos con la línea de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*, por su sigla en inglés) modificada genéticamente para que sobreexpresé el factor LIF en el medio de cultivo. Utilizamos el medio condicionado por éstas para propagar las células de forma rutinaria. Poseemos además el factor LIF comercial (Chemicon) para utilizar en casos en que se requieran condiciones más definidas. Las concentraciones de los distintos medios empleados en este trabajo se especifican en el apartado *Soluciones y Medios Utilizados*, al final del capítulo. Un día previo al pasaje de las células sembramos 5×10^5 MEF irradiadas (MEFi) y las dejamos adherir por 24 horas en presencia de medio MEF. Las MEF son obtenidas en nuestro laboratorio a partir de embriones de ratón de la cepa CF1 de 12,5 días (Losino et al., 2011; Luzzani et al., 2011; Solari et al., 2011).

Como mencionamos previamente, cultivamos las células en placas p60 recubiertas con gelatina de piel bovina (Sigma), para de esta forma evitar cualquier influencia que pudieran tener las MEF sobre las ESCs tanto en el proceso de diferenciación como en los distintos experimentos. Para esto, realizamos al menos tres pasajes en placas sin MEF, cubiertas con gelatina y en presencia de medio de propagación. El recubrimiento de las placas lo realizamos tomando 1 ml de solución 0,1% de gelatina en agua durante 15 minutos en estufa a 37°C. Pasado este tiempo, removemos la solución de gelatina y agregamos 2×10^6 de ESCs, las cuales se adhieren a

lo largo de las primeras 24 horas. A lo largo de los sucesivos pasajes en gelatina, las MEFi no se adhieren por lo que al tercer pasaje la cantidad de éstas es despreciable en comparación con las ESCs.

Realizamos el pasaje de las células entre 48 y 72 horas luego del plaqueo. Para esto, aspiramos el medio de cultivo y lavamos con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Luego, descartamos el PBS y tratamos las placas con 0,4 ml de tripsina (Gibco) a 37°C de 3 a 5 minutos, agitando ocasionalmente las placas para favorecer la disgregación de las células. Transcurrido ese tiempo, completamos la disgregación de forma mecánica con pipeta para evitar que queden agregados de células. Monitoreamos el proceso mediante observación al microscopio. Para inactivar la tripsina agregamos igual volumen de medio de propagación. Luego, colocamos el volumen de suspensión con la cantidad de células adecuadas en una nueva placa de cultivo y agregamos medio nuevo de forma tal que la tripsina quede diluida al menos 10 veces. La inactivación de la tripsina se debe a la presencia de suero en el medio de cultivo. Por un lado, el suero contiene inhibidores de la enzima a la vez que el alto contenido proteico del mismo compite con las proteínas presentes en el cultivo por el uso de la enzima.

Determinamos la cantidad de células mediante el método de exclusión con Azul de Tripán. Para eso, tomamos 10 µl de suspensión de células y los mezclamos con un volumen igual de solución 4% de Azul de Tripán. Para el recuento, tomamos 10 µl de dicha dilución, los colocamos en una cámara de Neubauer y contamos las células no coloreadas en los cuatro campos de la cámara. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el recuento, realizamos diluciones de la mezcla de células con el colorante utilizando PBS.

Sembramos las células en una nueva p60 a una densidad aproximada de 2×10^6 células y en presencia de medio de propagación para alcanzar un volumen final de 3 ml. Realizamos la siembra por goteo de la suspensión celular de forma uniforme y luego mezclamos formando “ochos” para diseminar las células de forma homogénea a lo largo de la superficie de la placa. Incubamos las placas en una estufa a 37°C y con una concentración de CO₂ del 5% y las controlamos a diario para verificar su correcto estado, cambiando el medio de cultivo de ser necesario.

Las células madre embrionarias humanas de la línea WA09 fueron utilizadas en colaboración con el grupo de Santiago Miriuka, de FLENI. La línea WA09 provino del WiCell Research Institute (WI). Mantuvimos las líneas de hESCs sobre una feeder layer de MEF inactivados mitóticamente, habitualmente mediante irradiación gama; en un medio que contiene of Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado con 20% KSR, 2 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 4 ng/ml de FGFb o sobre una placa de cultivo cubierta con Matrigel™ diluido (1/40) en medio condicionado MEF. Para la obtención de medio condicionado MEF, incubamos por 24 horas en 25 ml de medio DMEM/F12 suplementado con 5% KSR y 2 ng/ml de FGFb (además de los otros suplementos mencionados anteriormente) 3×10⁶ células MEF inactivadas. Conservamos el medio condicionado a -20°C y una vez descongelado, le agregamos nuevas alícuotas de KSR y FGFb al medio para alcanzar una concentración final de 20% y 4 ng/ml, respectivamente.

2. Extracción de ADN genómico para la detección de *Mycoplasma* por PCR.

Como parte de nuestro trabajo de rutina, habitualmente controlamos la ausencia de la bacteria del género *Mycoplasma* en nuestros cultivos celulares. Dado que no se puede detectar con el análisis microscópico de rutina, como las demás contaminaciones, realizamos una extracción de ADN genómico y detectamos por PCR la presencia de su genoma. Utilizamos como control positivo de presencia de ADN genómico, para validar la ausencia del marcador de *Mycoplasma*, la presencia del gen GAPDH con primer que hibridan en el mismo exón. Brevemente, tripsinizamos las células y separamos 1/10 de las células presentes en una placa de 10 cm de diámetro en un tubo eppendorf. Centrifugamos 5 minutos a 1000 rpm. Descartamos el sobrenadante, lavamos el pellet con 200 µl de PBS y volvemos a centrifugar 5 minutos a 1000 rpm. Resuspendemos el pellet en 100 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20), al cual

previamente le agregamos proteinasa K a una concentración final de 10 mg/ml. A continuación realizamos el lisado celular durante 1 hora a 60°C con agitación intermitente. Precipitamos el ADN con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente durante 5 - 10 minutos. Centrifugamos a 13.000 g a temperatura ambiente durante 15 - 20 minutos, descartamos el sobrenadante y lavamos el pellet con etanol 70%. Secamos al aire y resuspendemos el pellet en 30 µl de agua. Rehidratamos el ADN incubando 1 hora a 65°C y lo guardamos a -20°C. Para realizar la amplificación por PCR, utilizamos 1-2 µl de la preparación. El programa que utilizamos para la misma es:

1. 5 minutos a 94 °C
2. 30 segundos a 94 °C
3. 30 segundos a 55 °C
4. 40 segundos a 72 °C
5. Ir al paso 2 39 veces
6. 5 minutos a 72 °C
7. Fin

<i>Gen</i>		<i>Secuencia del primer (5'-3')</i>
Marcador de Mycoplasma	Forward	ACACCATGGGAGYTGGTAAT
	Reverse	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT
GAPDH	Forward	AAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG

Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

3. Congelamiento y descongelamiento de células

Para mantener un stock de células las congelamos en N₂ líquido de acuerdo al siguiente protocolo. Se cultivan las células en una p60 y se las tripsiniza como se explicó previamente. Centrifugamos las células a 1000 g por 5 minutos en un tubo cónico de 15 ml, las resuspendemos en 1 ml de medio de propagación con una concentración final 25% SFB y 10% DMSO y las colocamos en hielo. Colocamos la suspensión en un criotubo y, siempre trabajando en frío, llevamos las células

rápidamente a un freezer de -80 °C, colocando los criotubos en un recipiente que contiene isopropanol (Frost-it) para lograr un enfriamiento gradual.

Para descongelar las células tomamos un criotubo del termo de N₂ líquido y lo calentamos rápidamente a 37°C hasta lograr el descongelamiento de la suspensión celular. Para remover el DMSO, que resulta tóxico para las células, pasamos rápidamente el contenido del criotubo a un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de medio de propagación y lo centrifugamos a 1000 g por 5 minutos. Luego, se resuspenden las células en un volumen adecuado de medio de propagación y analizamos la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con Azul de Tripán, como se explicó anteriormente. Una vez verificado el estado de las células, las sembramos en la cantidad necesaria de placas de la superficie adecuada en presencia de MEF.

4. Diferenciación celular

4.1 Método de *Hanging Drop*

Indujimos la diferenciación de las CMEs a través de la formación de cuerpos embrioides (CE), empleando el protocolo de *Hanging Drop* (Kurosawa, 2007). Este protocolo consiste en la remoción de las señales que mantienen el estado indiferenciado y en favorecer los contactos celulares que promueven la diferenciación.

El esquema general de la diferenciación utilizando este método se puede ver en la Figura 14. Brevemente, consiste en sembrar las células en gotas de medio de cultivo en la tapa de placas no adherentes, que son las placas de Petri comúnmente utilizadas para el cultivo de bacterias, e incubarlas por 48 horas. Durante este período, las células se acumulan en el extremo de las gotas debido a la acción de la gravedad, interactuando entre sí y formando estructuras tridimensionales denominadas cuerpos embrioides. Posteriormente, los CE son pasados a un período de crecimiento en suspensión por 72 horas, luego de los cuales se cultivan en adherencia durante distintos tiempos, entre 4 y 11 días. Durante este último período, los cuerpos se

adhieren y las células proliferan y se diferencian a los diferentes linajes. A lo largo del proceso utilizamos medio de diferenciación (MD), cuya formulación es similar a la del MP, pero usando SFB 20% y sin el agregado de LIF.

Partimos de una p60 con R1 o Ainv15 mantenidas en estado indiferenciado en gelatina. Las tripsinizamos y resuspendimos 6×10^5 células en 15 ml de MD en un tubo cónico de 50 ml. Preparamos 10 placas de bacterias colocando 1 ml de PBS en la base para evitar la posterior deshidratación de las gotas durante la incubación. Utilizando una pipeta de repetición, colocamos gotas de 25 μ l de la suspensión celular conteniendo alrededor de 1000 células/gota en las tapas de las placas de bacterias y las incubamos a 37°C 5% CO₂ durante 48 horas (Figura M.2).

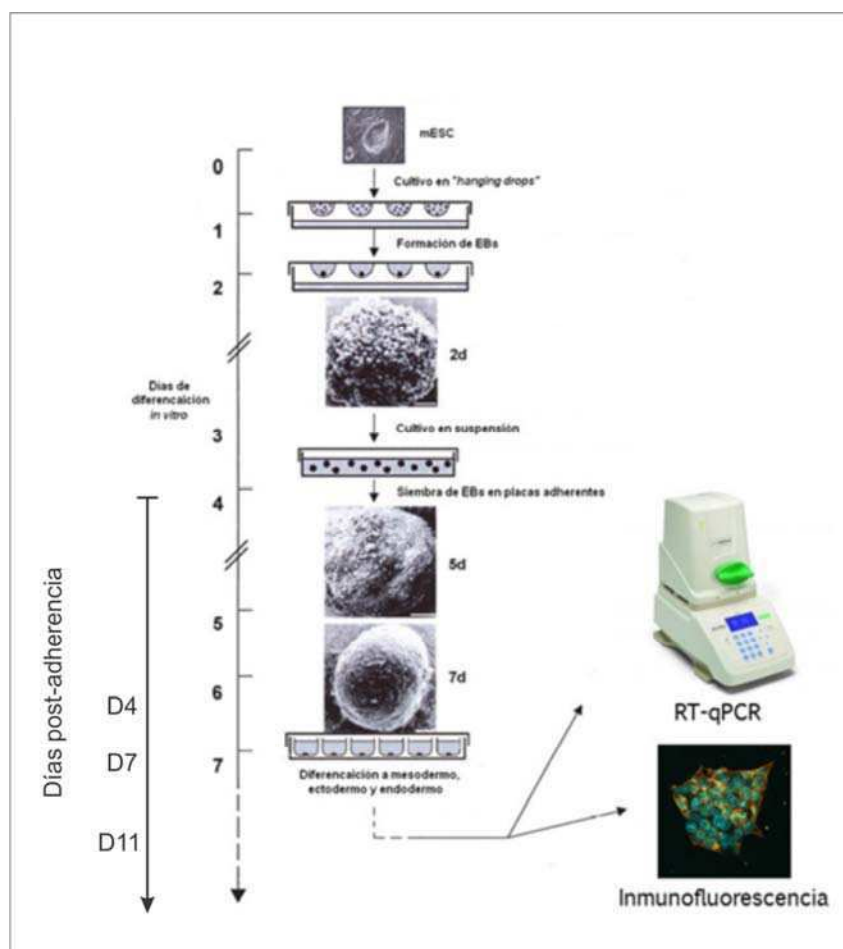


Figura M.1. Esquema de formación de cuerpos embrioides mediante el protocolo de *Hanging Drop*.



Figura M.2. Diferenciación por el método de *hanging drop*. Placa con gotas conteniendo mESCs durante un protocolo de diferenciación.

Transcurrido ese tiempo se pueden visualizar los CE a simple vista en las gotas de MD como puntos blancos. En ese momento, cosechamos las gotas con CE agregando 1 ml de MD por placa y colectamos el medio con los cuerpos utilizando una pipeta de 5 ml, aplicando una succión suave para no dañarlos.

Por cada 5 placas con gotas, tomamos su contenido y lo sembramos en la base de una nueva placa de bacterias, de forma tal de obtener un volumen final de 10 ml. De esta forma, obtenemos 2 placas para cultivo en suspensión por cada 10 placas con gotas. Verificamos la integridad de los cuerpos a través de un microscopio invertido y los cultivamos en suspensión por 72 horas a 37 °C y 5% CO₂.

Al cabo de 72 horas de cultivo en suspensión los CE aumentan su tamaño y se observan como puntos blancos flotando en el medio de cultivo. Colectamos los CE como se explicó previamente y sembramos el contenido de cada placa de cultivo en suspensión en 3 placas p60 previamente tratadas con gelatina, obteniendo de esta forma 6 p60 con cuerpos en adherencia.

Pasadas 24 horas, los CE se adhieren a la placa de cultivo y en los días sucesivos las células proliferan, migran y se diferencian, por lo que se pueden distinguir diversas poblaciones celulares con morfologías claramente diferentes.

4.2 Diferenciación dirigida a progenitores neurales

Utilizamos un protocolo de diferenciación en monocapa dirigido hacia progenitores neurales (Q.-L. Ying & Smith, 2003; Q.-L. Ying, Stavridis, Griffiths, Li, & Smith, 2003). Para ello, sembramos 6×10^5 ESCs en medio de propagación en placas

p35 recubiertas previamente con gelatina. Un día después, lavamos exhaustivamente con PBS y cambiamos el medio por el medio de diferenciación definido N2B27, el cual favorece la diferenciación a progenitores neurales luego de 4 días en cultivo. Evaluamos el cambio en la expresión génica a lo largo de la diferenciación, para lo cual extrajimos RNA todos los días, desde el día previo a iniciar la diferenciación (D0) hasta seis días transcurrida la misma (D6).

El medio N2B27 consiste en una mezcla 1:1 de DMEM/F12 suplementado con N2 modificado (insulina 25 µg/ml, apotransferrina 100 µg/ml, progesterona 6 ng/ml, putrescina 16 µg/ml, selenito de sodio 30 nM y seroalbúmina bovina fracción V 50 µg/ml) con Neurobasal Medium suplementado con B27 (ambos de Life Technologies). Los progenitores neurales pueden distinguirse morfológicamente de las ESCs. Los cuerpos celulares se organizan próximamente pudiendo discernirse sin embargo los límites de las células. Los núcleos de los progenitores neurales son difíciles de evidenciar a simple vista, a diferencia de las CME que presentan núcleos muy prominentes. Los progenitores neurales también pueden ser identificados mediante técnicas inmunquímicas con anticuerpos contra las proteínas Sox1 y nestina. También puede evaluarse la expresión de genes marcadores, como son los nombrados previamente además de Sox3, así como la disminución en la expresión de genes marcadores de ESCs, Oct4 y Nanog.

5. Extracción de RNA y cuantificación

Realizamos la extracción de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen)(Numbers, 2010). El reactivo de Trizol está compuesto por una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que facilitan el aislamiento de los diversos tipos de ARN.

Para el aislamiento, descartamos el medio de cultivo de la placa que contiene las células y agregamos 1 ml de Trizol por placa de 3,5 cm de diámetro, homogeneizamos utilizando un rastrillo de goma (*scraper*) e incubamos por 5 minutos a temperatura ambiente. Colocamos la muestra en un tubo eppendorf y agregamos 200 µl de

cloroformo por cada 1 ml de Trizol, agitando vigorosamente por 15 segundos. Incubamos a temperatura ambiente por 2-3 minutos.

Centrifugamos el tubo a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, luego de los cuales observaremos tres fases: una superior acuosa que contiene el ARN, una interfase y una fase inferior roja compuesta por fenol-cloroformo.

Transferimos la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y agregamos 0,5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol. Incubamos 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la precipitación del ARN. Centrifugamos durante 10 minutos a 12000 g a 4 °C, luego de los cuales se observa un precipitado blanco tipo gel correspondiente al ARN. Descartamos cuidadosamente el sobrenadante y lavamos el *pellet* con 1 ml de etanol 75% por cada 1 ml de Trizol utilizado. Homogeneizamos con *vortex* y centrifugamos a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet* durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, resuspendemos el pellet en 30 µl de agua RNAsa *Free* y preservamos el ARN purificado a -80 °C.

Para realizar la cuantificación del ARN utilizamos el equipo NanoDrop, un espectrómetro de amplio espectro (220-750 nm) que mide 1 µl de muestra con alta eficiencia y reproducibilidad. Brevemente, se coloca 1 µl de muestra en la punta de una fibra óptica y, en segundos, el equipo otorga la concentración de la misma, la cual puede estar en un rango de 2 a 3000 ng/µl. La concentración se obtiene por la medición de la absorbancia cuando la muestra es excitada a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos. El equipo también evalúa la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y se calcula la relación 260/280, la cual debe ser superior a 1.8 para ser considerada de una pureza aceptable.

6. Retrotranscripción

Para la síntesis del ADNc utilizamos la enzima transcriptasa reversa del virus MMLV (Invitrogen). Esta enzima utiliza como molde ARN o ADN simple cadena en

presencia de un *primer* para sintetizar la hebra de ADNc. Para todas las reacciones, partimos de 1 µg de ARN para una masa representativa y homogénea del cultivo celular. Realizamos la reacción en dos pasos. Primero, alicuotamos en un tubo el ARN y el agua, según:

ARN	1 µg
H₂O_{mQ}	c.s.p 10 µl
Volumen final	10 µl

Incubamos a 65°C por 5 minutos en un termociclador (Bio-Rad) para de esta forma desnaturalizar el ARN y romper las posibles estructuras secundarias que pudieran haberse formado. Luego, agregamos 10 µl de la mezcla de retrotranscripción, compuesta por:

H ₂ O _{mQ}	2 µl
dNTP 25 mM (Life Technologies)	0,8 µl
Random Primers (Life Technologies)	0,2 µl
DTT (Life Technologies)	2 µl
Buffer 10x	4 µl
RT-MMLV	1 µl

Incubamos a 37°C por 50 minutos, tiempo en el cual la enzima cataliza la síntesis del ADNc. Por último, calentamos a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima.

7. PCR a punto final y qPCR en Tiempo Real

7.1 PCR a punto final

Realizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final utilizando la ADN polimerasa DreamTaq (Fermentas). La reacción fue llevada a cabo en el equipo Peltier Thermal Cycler DNA (BioRad). Analizamos el producto de amplificación

mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% teñido bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de ADN. Detallamos los primers utilizados a continuación:

<i>Gen</i>		<i>Secuencia del primer (5'-3')</i>
<i>OCT4</i>	<i>Forward</i>	<i>TGACGGGAACAGAGGGAAAG</i>
	<i>Reverse</i>	<i>TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG</i>
<i>Nanog</i>	<i>Forward</i>	<i>AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG</i>
	<i>Reverse</i>	<i>CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG</i>
<i>Tet-pLKO</i>	<i>Forward</i>	<i>ACCCGACAGGCCCGAAGGAA</i>
	<i>Reverse</i>	<i>GCCGCGGCCAAAGTGGATCT</i>
<i>actina</i>	<i>Forward</i>	<i>GTGGGCCGCTCTAGGCACCA</i>
	<i>Reverse</i>	<i>CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG</i>

Utilizamos el siguiente esquema de ciclos de amplificación:

94°C	2 minutos	} 34 ciclos
94°C	30 segundos	
47°C	1 minuto	
72°C	2 minuto	
72°C	5 minutos	

Analizamos el producto de amplificación en un gel de agarosa 2% conteniendo bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de ADN.

7.2 PCR cuantitativa en tiempo real

Utilizamos la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de expresión de los ARNm de los marcadores en estudio en distintas condiciones. Llevamos a cabo la amplificación de ADNc por Real Time qPCR con *primers* específicos en el termociclador Opticon Real Time DNA Engine (Bio-Rad), utilizando la mezcla SYBR Mix qPCR (Fermentas). Ésta cuenta con el buffer adecuado, dNTPs, MgCl₂, la enzima Maxima® Hot Start Taq ADN polimerasa, así como el fluoróforo SYBR Green, necesario para detectar el producto de amplificación. La ventaja del uso de esta enzima es que se

encuentra modificada para que su actividad comience una vez que haya transcurrido el primer ciclo de desnaturalización de la PCR, debido a que su sitio activo se encuentra bloqueado mediante un anticuerpo. Debido a esto, estas ADN polimerasas evitan la elongación de productos inespecíficos previo al inicio de la PCR. El esquema de reacción fue el siguiente:

94°C	5 minutos	} 40 ciclos
94°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	
72°C	2 minuto	
Curva de <i>melting</i>		

Como se indica en la tabla, el esquema de reacción contempla la confección de una curva de *melting* inmediatamente finalizada la amplificación, utilizando una tasa de transición de temperatura lineal de 0,3°C/s de 60°C a 90°C con adquisición continua de fluorescencia. La misma siempre presentó un único pico para todos los *primers* utilizados, indicando la presencia de un único producto de PCR. Confirmamos el correcto tamaño del producto de amplificación y la presencia de una única banda mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Analizamos los datos crudos utilizando el programa MJ Opticon Monitor Software 3.1.32 (Bio-Rad). La expresión génica fue normalizada a la del gen de la Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación de la expresión génica relativa fue calculada usando el método $\Delta\Delta Ct$ (*Methods and Applications Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide*, n.d.). Realizamos al menos dos duplicados de al menos dos muestras independientes para cada experimento y un blanco sin cDNA. Previo a la reacción, realizamos una dilución del cDNA de 1/5 en H₂O_{mQ}. Luego, en cada *well* de la placa utilizada colocamos una mezcla compuesta por los siguientes componentes:

H ₂ O _{mQ}	4,25 µl
Primer Forward	0,5 µl
Primer Reverse	0,5 µl

SYBR Mix qPCR	6,25 μ l
ADNc	2 μ l

Los *primers* utilizados se detallan en la siguiente tabla:

Nombre del gen		Secuencia (5'-3')	Especie
Oct4	Forward	TGACGGGAACAGAGGGAAAG	mouse
	Reverse	TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG	
Nanog	Forward	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	mouse
	Reverse	CAACCACTGGTTTTCTGCCACCG	
AFP	Forward	CCACGTTAGATTCCTCCCAGTGCGT	mouse
	Reverse	CATACTTGTTAGAGAGTTCCGTCTC	
Brachyury	Forward	GACTTCGTGACGGCTGACAA	mouse
	Reverse	CGAGTCTGGGTGGATGTAG	
Nestin	Forward	CTGCAGGCCACTGAAAAGTT	mouse
	Reverse	GACCCTGCTTCTCCTGCTC	
Gcn5L2	Forward	GCTCTGTTACTGCCACGTGC	mouse
	Reverse	GCATGGTGAAGCCTGACTCC	
GTF3C3	Forward	AGAGAAGAGAGAAAAACCCG	mouse
	Reverse	TTGTCTTATGATTTCCATGC	
GTF3C4	Forward	CCTCATGGTGACTCGGCGGG	mouse
	Reverse	GCAACTTCTGTTTTGAGCC	
Myst2	Forward	TGCAGGCAGTAGTTCAGATGG	mouse
	Reverse	ATGTCAGACTCAGAAGAAGG	
ATF7ip	Forward	CGAGTGGAGAAGATAGAGTG	mouse
	Reverse	TGCTGTTGGTGCATTGG	

TAF15	Forward	ACCAACAGTCTTACCATTAC	mouse
	Reverse	CTCTTCCATCCTTGTCATATCC	
GAPDH	Forward	AAGAAGGTGGTGAAGCAG	mouse
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG	
HDAC3	Forward	GAATACTTCGAGTACTTTGC	mouse
	Reverse	GTAATAATGGACATAAAGCC	
HDAC2	Forward	TGGCGTACAGTCAAGGAGGC	mouse & human
	Reverse	AGGATGGCAAGCACAATATC	
HDAC5	Forward	GACAACGGGAAGTCTTTCC	mouse & human
	Reverse	CCAAAACATCTGGCGGTGA	
OCT4	Forward	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	human
	Reverse	CACAGAACTCATACGGCGGG	
NANOG	Forward	AAAGAATCTTCACCTATGCC	human
	Reverse	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT	
AFP	Forward	TGCTGGATTGTCTGCAGGATG	human
	Reverse	ACGTTCCAGCGTGGTCAGTTT	
BRACHYURY	Forward	TCCCAGGTGGCTTACAGATGA	human
	Reverse	GGTGTGCCAAAGTTGCCAAT	
NKX2.5	Forward	CCCACGCCCTTCTCAGTCAA	human
	Reverse	GTAGGCCTCTGGCTTGAAGG	
PAX6	Forward	CTAATGGGCCAGTGAGGAG	human
	Reverse	TACTCACACATCCGTTGGACAC	
MYST2	Forward	TGACAGAGGCGGACAACAC	human
	Reverse	AGGCATAGTAAGGATACAGGAGAC	
GTF3C3	Forward	GCAATCCAATATTATCAGAAGG	human

	Reverse	AAGCGTTTGAGCCATTCC	
HDAC3	Forward	CTCTGGCTTCTGCTATGTCAAC	human
	Reverse	TGGTGGATGTCAATGTCAATGTAG	
HDAC10	Forward	CAGAAACACGGGCTACAC	human
	Reverse	TGACTCTCGCAGGAAAGG	
ATF7IP	Forward	GTGCTGTATTTGATAAGACTTTGG	human
	Reverse	GGTGATACTGGTGGGTTGG	
JARID2	Forward	TTTCCTTACCTTTCTCTGCCTTC	human
	Reverse	GTCTTCTGTCTCATCATCTTCC	
SUV39H2	Forward	CGATACTCGTCTTCCCCGA	human
	Reverse	GCATTTCTCTGTTACATAG	
BMI-1	Forward	CCTGATGTGTGTGCTTTGTGGAG	human
	Reverse	GTGGTCTGGTCTTGTGAACTTGG	
GAPDH	Forward	ACAGCCTCAAGATCATCAG	human
	Reverse	GAGTCCTTCCACGATAACC	

8. Inmunofluorescencia

Cultivamos las células sobre vidrios cubreobjetos en placas de 12 o 24 *wells* cubiertas con gelatina como se especificó previamente. Una vez adheridas las células o llegado al estadio de diferenciación deseado, descartamos el medio de cultivo y realizamos tres lavados con PBS. Fijamos las células mediante el agregado de 0,5 ml de metanol a -20°C durante diez minutos, luego de los cuales realizamos una segunda ronda de lavados con PBS para eliminar el exceso de fijador. El bloqueo se realizó incubando los *wells* con 0,5 ml de una solución de Seroalbúmina Bovina (BSA) al 1 % en PBS Tween, durante media hora a temperatura ambiente. Con este método de

fijación no es necesario un paso posterior de permeabilización con detergente, dado que el metanol permeabiliza las células. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en las tablas a continuación. La incubación con el anticuerpo primario específico para cada marcador en estudio se realizó utilizando 200 μ l de una dilución de dicho anticuerpo en PBS Tween.

Incubamos cada *well* con 200 μ l de anticuerpo primario específico para los marcadores en estudio durante una hora a temperatura ambiente. Luego, realizamos 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween para remover el exceso de anticuerpo primario e incubamos con 200 μ l del anticuerpo secundario por 40 minutos. En la mezcla de incubación, además agregamos 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0,1 μ g/ml para marcar los núcleos de todas las células. Montamos los cubreobjetos con 5 μ l de solución de montaje Mowiol/Dabco, dejamos secar un día y sellamos con esmalte de uñas transparente. Conservamos en frío y en oscuridad hasta observar al microscopio.

Obtuvimos las imágenes utilizando un microscopio confocal Olympus IX81/Fluoview FV 1000 y las procesamos con el software Photoshop CS3.

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo Primario	Especie	Empresa	Dilución empleada
Anti Oct3/4	Ratón	Santa Cruz	1:500
Anti SSEA-1	Ratón	Santa Cruz	1:500
Anti AML	Ratón	Chemicon	1:200
Anti AFP	Cabra	Santa Cruz	1:200
Anti β 3-Tubulina	Ratón	Santa Cruz	1:200
Anti Nanog	Conejo	Santa Cruz	1:200
Anti Actina	Ratón	Santa Cruz	1:200

Anticuerpos Primarios utilizados

Anticuerpo	Especie	Fluoróforo	Empresa	Dilución empleada
Anti IgG Ratón	Cabra	Cy3	Santa Cruz	1:500
Anti IgG Ratón	Cabra	FITC	Sigma	1:100
Anti IgG Conejo	Cabra	Cy2	Santa Cruz	1:500
Anti IgG Cabra	Burro	Texas Red	Santa Cruz	1:200

Anticuerpos secundarios utilizados

9. Transfección

Realizamos la transfección de células HC11 y HEK293T mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Este método se basa en la formación de complejos entre el DNA plasmídico y lípidos catiónicos, los cuales son endocitados al interior de las células. Realizamos los estudios en placas de 24 *wells*, sembrando 50.000 células sobre vidrios cubreobjetos el día previo a la transfección. Efectuamos la transfección utilizando una relación $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$ de Lipofectamina 2000 de 1:3. Para cada muestra, preparamos los complejos de la siguiente manera:

- 1) Diluimos 1 μg de vector GFP en 50 μl de medio DMEM sin suero, dado que el SFB puede afectar el correcto ensamblado de los complejos.
- 2) Diluimos 3 μl de Lipofectamina 2000 en 50 μl de medio DMEM sin suero ni antibióticos, e incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente. La necesidad de que el medio no tenga antibióticos se debe a que éste podría presentar alta toxicidad celular durante la transfección.
- 3) Luego de la incubación, mezclamos la dilución del vector con la dilución de Lipofectamina 2000, mezclamos e incubamos 25 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Sobre la placa de 24 *wells*, retiramos el medio de cultivo del *well* en estudio, lavamos con 500 μl de PBS y luego agregamos los 100 μl de mezcla por cada *well* a transfectar. Mezclamos la placa haciendo "ochos".
- 5) Incubamos la placa en estufa durante 48 horas.
- 6) Fijamos las células en metanol como se describió anteriormente.

10. Purificación de DNA por Maxiprep

Inoculamos en esterilidad 400 ml de medio Terrific conteniendo 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ampicilina con un "glicerol" de *E. coli* transformada con el plásmido de interés e incubamos a 37°C con agitación durante 36-48 horas. Una vez concluido el crecimiento de las bacterias, hacemos tubos de glicerol para reponer el stock. Para esto, por cada

tubo tomamos 500 μ l de cultivo y le agregamos 500 μ l de glicerol 30%, de forma tal que la concentración final de glicerol sea del 15%. Conservamos los stocks a -80°C . Dividimos cada cultivo en dos tubos de 200 ml. Lo descripto a continuación corresponde a cada uno de ellos. Centrifugamos los cultivos de bacterias a 2700 g por 15 minutos y descartamos el sobrenadante. Resuspendemos el pellet en 10 ml de Solución 1 y mezclamos con *vortex* por 5 minutos. Agregamos 20 ml de Solución 2, mezclamos por inversión e incubamos en hielo durante 20 minutos. Como explicamos previamente, esta solución produce la lisis de las bacterias, por lo que la solución pasa de turbia a translúcida. Luego, agregamos 15 ml de Solución 3, mezclamos por inversión e incubamos durante 5 minutos. Centrifugamos a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y transferimos los sobrenadantes a nuevos tubos de centrifuga, filtrándolos a través de una gasa para evitar el pasaje de cualquier resto de precipitado.

Agregamos 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclamos e incubamos 20 minutos, tiempo durante el cual se facilita la precipitación del ADN plasmídico. Centrifugamos a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C . Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet*. Resuspendemos el *pellet* en 1,25 ml de Buffer TE, juntamos el contenido de ambos tubos y llevamos a 3 ml de volumen final.

Agregamos 3 ml de LiCl 5 M enfriado a -20°C , mezclamos bien y centrifugamos inmediatamente 5 minutos a 10.000 rpm en frío. El LiCl precipita la mayor parte del ARN presente en la muestra. Transferimos el sobrenadante a otro tubo y agregamos 6 ml de isopropanol, mezclamos y centrifugamos a 10.000 por 5 minutos a 4°C . Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet*. Resuspendemos el *pellet* en 0,5 ml de Buffer TE y agregamos 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNasa A. Incubamos por 30 minutos a temperatura ambiente. Esta enzima termina de degradar el ARN remanente. Agregamos 500 μ l de Polietilenglicol (PEG) 13% m/v en NaCl 1,6 M, preparado en el momento. Mezclamos bien y centrifugamos 5 minutos a 13.000 rpm. El PEG provee las condiciones necesarias para que precipite el ADN plasmídico. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos el *pellet* en 400 μ l de Buffer TE.

Posteriormente, realizamos la extracción de las proteínas que permanecen en la solución, entre las cuales se encuentra la RNasa agregada en el paso anterior. El protocolo de extracción se basa en el agregado de fenol, mezclado por *vortex* y posterior centrifugación durante 5 minutos a 13.000 rpm. A continuación se utiliza

cloroformo para extraer el fenol que pudiera permanecer en solución acuosa. Las combinaciones de solventes que utilizamos son:

- 1x 400 µl de fenol-tris
- 2x 400 µl de fenol-tris/cloroformo 1:1
- 1x 400 µl de cloroformo

A la fase acuosa de la última extracción le agregamos 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Incubamos a -20°C por 20 minutos. Centrifugamos a 13.000 rpm por 15 minutos y descartamos el sobrenadante. Lavamos el *pellet* con etanol 70%, centrifugamos 15 minutos a 13.000 rpm y dejamos secar bien el precipitado. Por último, resuspendemos en 500 µl de Buffer TE o H₂O_{mQ} y realizamos la cuantificación del plásmido utilizando un NanoDrop. Finalmente, corremos una alícuota en un gel de agarosa 0,8% para verificar su calidad.

11. Silenciamiento génico mediante RNAi

El RNAi es un sistema conservado en células eucariotas. Es mediado por pequeños fragmentos de ARN doble cadena que utilizan una vía celular que silencia genes de forma secuencia-específica a nivel del mRNA. Estos fragmentos, denominados shRNA (*short hairpin RNA*, ARN cortos en horquilla), están formados por una secuencia de ARN que presenta complementariedad de bases intracatenaria formando una pequeña horquilla de ARN doble cadena. Los fragmentos de shRNA son reconocidos por la enzima Dicer, una proteína perteneciente a la familia de Ribonucleasas tipo III, y son cortados en fragmentos de RNA doble cadena de entre 21 y 23 nucleótidos de largo que presentan extremos protruyentes de entre 2 y 3 nucleótidos. Estos fragmentos se denominan siRNA (*small interfering RNA*, ARN pequeños interferentes). Los pequeños fragmentos de ARN doble cadena generados por Dicer son incorporados en un complejo denominado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*, complejo de silenciamiento inducido por ARN) y la doble hebra de ARN es separada por Argonauta 2, una subunidad perteneciente a este complejo con actividad

helicasa. El complejo RISC activado, que contiene la hebra *antisense* complementaria al ARN mensajero blanco, puede reconocer e interactuar con éste provocando su degradación (Figura M.3). Posteriormente, el complejo RISC cargado con el siRNA puede degradar otras moléculas de ARN mensajero del mismo tipo.

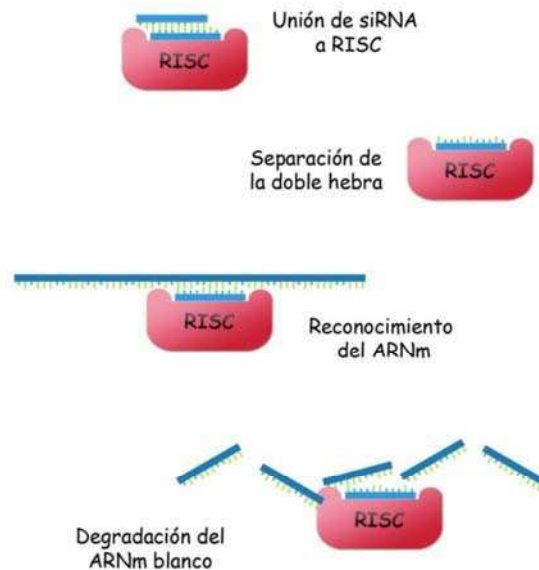


Figura M.3: Actividad del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA, RISC. El siRNA es reconocido por el complejo RISC, y Argonata 2, una subunidad de éste, separa la doble hebra de RNA, permaneciendo solamente una de ellas asociada al complejo. El complejo RISC activado puede ahora reconocer al ARNm blanco y provocar su degradación (Cycle, Bioscience, Institutes, Wiederschain, & Ave, 2009; Henriksen et al., 2007; Shin et al., 2006; Sliva & Schnierle, 2010).

12. Construcción de los vectores pLKO-Tet-On shPrmt8

12.1 Descripción del vector pLKO-Tet-On

El vector pLKO-Tet-On (Figura M.4) está diseñado especialmente para la generación de partículas lentivirales defectivas en su replicación, con el fin de obtener líneas estables que expresen shRNAs de manera inducible por tetraciclina.

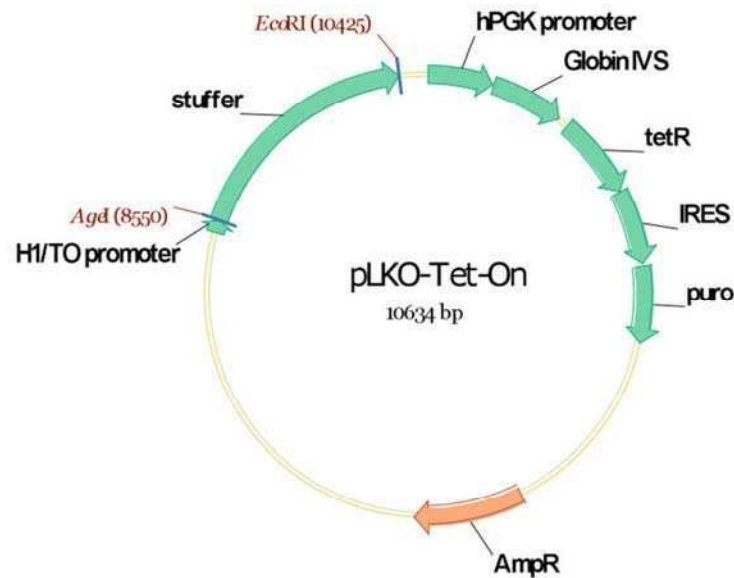


Figura M.4: Mapa del vector pLKO-Tet-On

El vector posee un tamaño de 10,6 kpb y cuenta con una variante del promotor H1, el cual dirige la transcripción a través de la ARN polimerasa III, río arriba de la región donde se inserta la secuencia codificante para el shRNA. El uso de sistemas dirigidos por RNA polimerasa III tienen distintas ventajas en la expresión de shRNAs, como una alta tasa de transcripción y la posibilidad de generar transcritos con extremos 3' y 5' definidos, a diferencia de los transcritos dirigidos por la polimerasa II cuyos extremos son menos precisos. Esta variante del promotor H1 contiene dos secuencias correspondientes al elemento respondedor a tetraciclina (TRE, *Tet Response Element*) flanqueando a la TATA box, donde se une la polimerasa (Figura M.5). Las secuencias TRE tienen alta afinidad por la proteína represora de tetraciclina, TetR. Una vez unida, TetR evita la unión de la ARN polimerasa III al promotor H1 por impedimento estérico, previniendo de esta forma la transcripción del shRNA. La tetraciclina, o diversas variantes como la doxiciclina, tienen alta afinidad por la proteína TetR y, al unirse, le producen un cambio conformacional que evita su unión al TRE. De esta manera, mediante el agregado de esta droga, se puede inducir la transcripción del shRNA (Cycle et al., 2009).

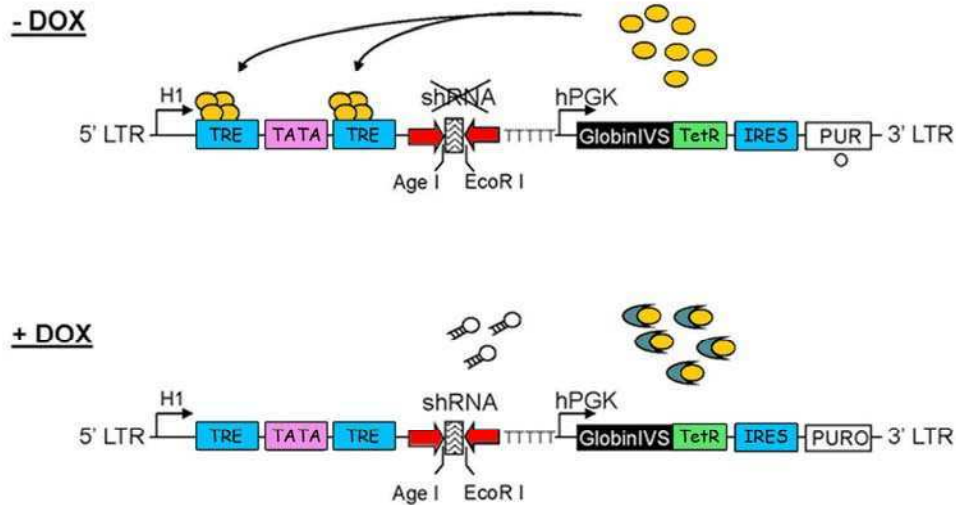


Figura M.5. Esquema del vector pLKO-Tet-On y su mecanismo de acción.

pLKO-Tet-On contiene todos los elementos necesarios en *cis* para la producción de partículas lentivirales defectivas en su replicación. También contiene los componentes necesarios para la expresión de shRNAs de forma inducible en las células blanco. En ausencia de tetraciclina/doxyciclina, la expresión del shRNA es reprimida por la proteína TetR constitutivamente expresada. Con la adición de tetraciclina o doxyciclina al medio de cultivo, se produce la expresión del shRNA resultando en el silenciamiento o *knock down* del gen de interés.

El vector cuenta además con dos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoR1 y AgeI flanqueando a un fragmento de 2 kpb, río abajo del promotor H1. Estas secuencias permiten, luego de la digestión del vector, el clonado de forma dirigida de los insertos correspondientes a los shRNAs. La presencia del fragmento de 2 kpb, que se escinde luego de la digestión, tiene como objetivo poder diferenciar las bandas correspondientes al vector bi-digerido del vector mono-digerido que pudiera haberse generado por una digestión incompleta. Debido a esto, cuando se corren las digestiones en un gel de agarosa se puede aislar la banda correspondiente al vector bi-digerido. De esta forma, al no co-purificar el vector mono-digerido se reduce de forma considerable la aparición de colonias con vector religado (sin inserto) luego de la ligación con los insertos correspondientes a los shRNAs y la transformación de las bacterias.

El vector cuenta además con las secuencias en *cis* necesarias para su correcto empaquetamiento, transcripción inversa e integración en las células blanco. Las partículas lentivirales se obtienen por co-transfección de las células empaquetadoras 293T con el vector pLKO-Tet-On conteniendo el shRNA junto con los vectores *gag/pol* y

VSV-G. Estos dos últimos aportan la maquinaria necesaria para la replicación del genoma viral, así como para la síntesis de las proteínas estructurales virales y las glicoproteínas que le confieren el tropismo, en este caso, de amplio rango y adecuado para la transducción de mESC. Las partículas lentivirales son liberadas al medio de cultivo de las células empaquetadoras, el cual es colectado y utilizado para transducir a las células blanco. Es importante destacar que mediante este sistema, donde los genes que codifican para las proteínas virales no pueden ser empaquetados dado que carecen de las señales necesarias, se obtienen lentivirus defectivos en su replicación. Esta característica es fundamental porque determina que éstos sean más seguros, ya que el genoma de las partículas obtenidas no contiene los genes que codifican para la maquinaria necesaria para la multiplicación del virus.

12.2 Obtención del vector pLKO-Tet-On shPrmt8

Obtuvimos comercialmente el vector pLKO-Tet-On (AddGene). Digerimos el vector pLKO-Tet-On con las enzimas EcoR1 y AgeI para luego purificar la banda correspondiente al vector bi-digerido. Utilizamos para eso el vector purificado por Maxiprep, con una concentración de 1 µg/µl. Realizamos la digestión por duplicado según el siguiente esquema:

Vector	10 µl
Buffer O 10X	2 µl
EcoR1	1 µl
AgeI	1 µl
H₂O	4 µl

Incubamos los tubos a 37°C *overnight* y, al día siguiente, corrimos todo su contenido en un gel de agarosa 0,8 % (Figura M.6).

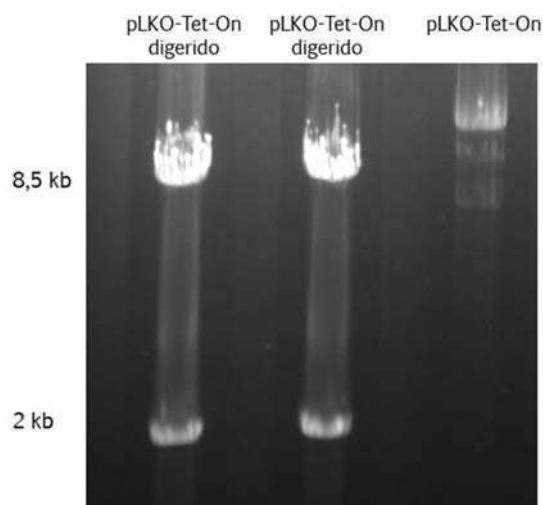


Figura M.6. Digestión del vector pLKO-Tet-On con las enzimas EcoR1 y AgeI y corrido en un gel de agarosa 0,8%.

Para la purificación del vector del gel de agarosa utilizamos el kit *AxyPrep DNA Gel Extraction Kit* (Axygen Biosciences). El protocolo utilizado se basa en la disolución de la agarosa y la retención del DNA en una columna para su posterior elución. Utilizando una espátula cortamos la parte inferior de la banda superior, intentando llevar la menor cantidad de agarosa posible, debido a que ésta podría disminuir el rendimiento de la purificación. Colocamos el fragmento de gel conteniendo el vector en un tubo eppendorf previamente pesado y lo pesamos nuevamente para calcular la masa de gel obtenida. La densidad del gel puede considerarse como 1 g/ml, por lo que 100 mg de gel se consideran como 100 μ l.

Agregamos Buffer DE-A en un volumen correspondiente a 3 veces el volumen de gel escindido y homogeneizamos con *vortex*. Colocamos el tubo en un baño a 75°C hasta que el gel se encuentre completamente disuelto, típicamente entre 8 y 10 minutos, vortexeando intermitentemente cada dos minutos. Luego, agregamos Buffer DE-B en un volumen correspondiente a 0,5 veces el volumen de Buffer DE-A utilizado. Colocamos una columna en el tubo correspondiente, ambos provistos en el kit, y transferimos la agarosa solubilizada sobre la misma. Centrifugamos a 12.000 g durante 1 minuto. Descartamos el filtrado y agregamos 500 μ l de Buffer W1 sobre la columna. Centrifugamos a 12.000 g por 30 segundos y descartamos el filtrado. Agregamos 700 μ l de Buffer W2, centrifugamos a 12.000 g por 30 segundos y descartamos el filtrado.

Agregamos nuevamente 700 μ l de Buffer W2 y centrifugamos a 12.000 g por un minuto. Estos dos lavados con el Buffer W2 aseguran la eliminación completa de las sales, que podrían causar problemas en subsiguientes reacciones enzimáticas, como la ligación. Descartamos el filtrado y centrifugamos 1 minuto más a 12.000 g para asegurarnos la elución completa del filtrado.

Colocamos la columna en un tubo *ependorf* nuevo, agregamos 30 μ l de H₂O_{mQ} y dejamos reposar durante 1 minuto. Por último, centrifugamos a 12.000 g por un minuto y descartamos la columna. Este eluido corresponde al ADN purificado. Cuantificamos el vector purificado utilizando el NanoDrop y, por otra parte, lo corrimos en un gel de agarosa 0,8% para verificar su tamaño y calidad.

12.2.1 Elección de shRNAs

El diseño de los shRNAs para cada gen se realizó utilizando como referencia la Biblioteca de shRNA del *RNAi Consortium* del *Broad Institute, MIT, Harvard*. Este es un consorcio público-privado cuyo objetivo es diseñar una amplia variedad de RNAi contra genes humanos y de ratón en forma de shRNA para ser incorporados a las células blanco a través de vectores lentivirales (www.broadinstitute.org/rnai/trc). El consorcio cuenta con una biblioteca de más de 160.000 RNAi diseñados *in silico* contra más de 15.000 genes humanos y 15.000 genes de ratón. Para cada uno de los genes presentes en la biblioteca existe una cantidad diversa de secuencias de RNAi que tienen como blanco distintas regiones del gen. Dado que no se encuentra validada la efectividad de cada secuencia de shRNA respecto al silenciamiento de los genes blanco, seleccionamos tres shRNA contra *Prmt8* para aumentar la probabilidad de que alguno resulte efectivo en el silenciamiento. La biblioteca otorga la información de cada shRNA en forma de dos oligonucleótidos: una secuencia *Forward* y de una secuencia *Reverse*, ambas de 58 bases. Las secuencias obtenidas son luego hibridizadas *in vitro* para formar el oligonucleótido de ADN doble cadena (Figura M.5). Las secuencias están diseñadas para que luego de la hibridación presenten en sus extremos secuencias protruyentes para las enzimas de restricción *EcoR1* y *Age1*. De esta manera, el fragmento obtenido puede ser clonado directamente en el vector Tet-pLKO digerido, sin ser necesaria la digestión de los insertos.

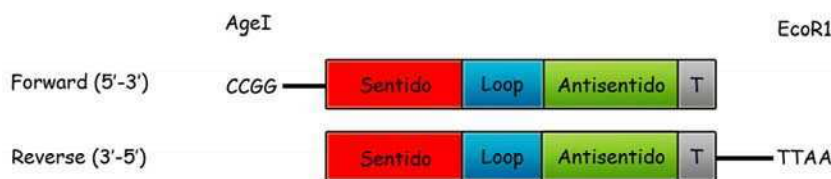


Figura M.5: Hibridación de las secuencias de ADN *forward* y *reverse* correspondientes a un shRNA. Se forma, de esta manera, el inserto de ADN doble cadena con extremos protruyentes compatibles con los extremos producidos por la digestión del vector Tet-pLKO con las enzimas de restricción EcoR1 y AgeI.

De esta forma, los distintos insertos clonados dentro del vector pLKO-Tet-On generarán los shRNAs que dirigirán el silenciamiento de los factores Taf15 y Atf7ip, de forma inducible por tetraciclina, como se explicó previamente (Figura M.6).

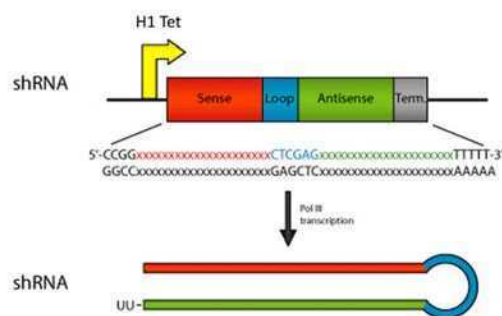


Figura M.6: Esquema de transcripción de shRNA a partir del molde de DNA.

12.2.2 Hibridación de los oligonucleótidos

Obtuvimos los oligonucleótidos correspondientes a las hebras *Forward* y *Reverse* de cada shRNA según se indica en la tabla a continuación. Es importante destacar que los 3 shRNAs seleccionados no tienen como blanco otros genes que Prmt8, de acuerdo a análisis bioinformáticos disponibles en el sitio web del *RNAi Consortium*.

mPrmt8-1025

Forward (5'-3')	CCGGGCTTTGTACGTGGTAGCGATTCTCGAGAATCGCTACCACGTACAAAGCTTTTTG
Reverse (5'-3')	AATTCAAAAAGCTTTGTACGTGGTAGCGATTCTCGAGAATCGCTACCACGTACAAAGC

mPrmt8-1036

Forward (5'-3')	CCGGGAGGAAATCTACGGGACCATACTCGAGTATGGTCCCGTAGATTCTCTTTTTG
-----------------	--

Reverse (5'-3')	AATTCAAAAAGAGGAAATCTACGGGACCATACTCGAGTATGGTCCCGTAGATTCCTC
-----------------	---

mPrmt8-1093

Forward (5'-3')	CCGGGATTCACAGTAGACTTGGATCTCGAGATCCAAGTCTACTGTGAAATCTTTTG
Reverse (5'-3')	AATTCAAAAAGATTCACAGTAGACTTGGATCTCGAGATCCAAGTCTACTGTGAAATC

Oligonucleótidos utilizados para realizar el silenciamiento de Prmt8.

El número contenido en el nombre de cada secuencia corresponde a la posición de hibridación en el mensajero desde el inicio del mismo.

Reconstituimos los oligonucleótidos liofilizados en H₂O_{mQ} a una concentración final de 0,1 nmol/μl. Para la hibridación utilizamos *Annealing Buffer* 10x, compuesto por NaCl 1M, Tris-HCl, pH 7.4 100 mM. Para cada shRNA realizamos la hibridación según:

Oligonucleótido Forward	11,25 μl
Oligonucleótido Reverse	11,25 μl
<i>Annealing Buffer</i> 10x	2,5 μl

Calentamos un recipiente con agua y la llevamos a 95°C. Colocamos los tubos en el agua caliente y los dejamos enfriar lentamente hasta una temperatura de 30°C. Realizamos una dilución 1/400 de los oligonucleótidos hibridados, mezclando 1 μl de oligos + 400 μl de *Annealing Buffer* 0,5x. Conservamos la dilución de oligonucleótidos hibridados a -20°C.

12.2.3 Ligación de los oligonucleótidos doble cadena en el vector pLKO-Tet-On

Realizamos la reacción de ligación para cada fragmento utilizando la enzima Ligasa de ADN T4 (Promega), según:

Solución de inserto a clonar	1 μ l
pLKO-Tet-On digerido	1 μ l
Buffer de ligación 10x	1 μ l
Ligasa de ADN T4	1 μ l
H ₂ O _{mQ}	6 μ l
Total	10 μ l

También realizamos una reacción de ligación sin inserto para evaluar el religado del vector.

Incubamos las reacciones a temperatura ambiente durante 3 horas, según indicaciones del manual de la enzima. Una vez concluido el tiempo, transformamos bacterias por el método de *heat shock* durante 90 segundos

Debido a que siempre existe la posibilidad de tener vector religado es necesario evaluar un número adecuado de colonias por cada placa para verificar si efectivamente tienen el inserto. Para eso, picamos colonias de cada una e hicimos estrías en una nueva placa de forma tal de poder picar nuevamente las estrías en caso de ser las construcciones esperadas, a la vez que inoculamos cultivos de 2 ml de LB-Ampicilina para obtener DNA plasmídico. Realizamos una extracción de DNA plasmídico de baja escala de cada cultivo realizado a partir de cada colonia y evaluamos el correcto clonado de los shRNAs a través de una reacción de PCR con *primers* específicos flanqueando el sitio de clonado y posterior corrida en un gel de agarosa 2%. En caso de ser negativos, debido a la presencia del fragmento de 2kpb en el vector religado, debería observarse una banda de 2,5 kpb. En caso de ser positivos, debería observarse una banda de 450 pb (Ver resultados).

Primers Tet-pLKO

pLKO-Tet-On <i>Forward</i> (5'-3')	ACCCGACAGGCCCGAAGGAA
pLKO-Tet-On <i>Reverse</i> (5'-3')	GCCGCGGCCAAAGTGGATCT

13. Traduccion virales

Las partículas lentivirales se produjeron mediante la transfección de células empaquetadoras HEK 293T con un sistema de cinco plásmidos. Cuatro de éstos codifican la cápside y la transcriptasa reversa (*gag/pol*), la envoltura (*vsv-G*) y proteínas regulatorias (*tat* y *rev*). El quinto plásmido, es el que lleva la información que se desea transducir (*backbone*). Para los experimentos en HC11 se transdujo con el vector denominado pHAGE-EF1 α -STEMCCA, que codifica 3 factores necesarios para la reprogramación de células somáticas (*Oct4*, *Sox2* y *Klf4*), además del gen reportero *mCherry*. Para el establecimiento de la línea estable se utilizó el vector Tet-pLKO sh *Prmt8* 1025, 1036 ó 1093, producido como se detalló anteriormente. La relación de los plásmidos utilizados fue la siguiente:

Backbone : *tat* : *rev* : *gag/pol* : *vsv-G*
 20 : 1 : 1 : 1 : 2

Para producir partículas retrovirales utilizamos células HEK 293T Phoenix Amphi como empaquetadoras, que poseen integrados establemente en su genoma los genes que codifican para *gag-pol* y *env*. El protocolo de transfección utilizado se describe a continuación y es similar para las dos líneas empaquetadoras.

Sembramos aproximadamente 600.000 células HEK 293T por *well* de una placa MW6 para ser transfectadas. El agente de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat 11668-019) fue utilizado según se detalla anteriormente, en una relación 10 μ l de Lipofectamina 2000 : 4 μ g de DNA total. Colectamos los sobrenadantes con partículas virales 48, 72 y 96 horas post-transfección y los filtramos utilizando filtros de 0.45 μ m *low binding* (Millipore, Cat SLHV033RB).

Veinticuatro horas antes de colectar el primer sobrenadante, sembramos aproximadamente 500.000 células a ser transducidas. Realizamos tres rondas de transducción cada 24 horas utilizando los sobrenadantes filtrados frescos, complementados con 1/3 de medio fresco. En algunos casos también complementamos con polibreno en una concentración final de 5 µg/ml. Veinticuatro horas posteriores a la última ronda de transducción cambiamos el medio por medio estándar.

14. Soluciones y medios de cultivo utilizados

PBS 1x (1 litro)

NaCl	8 mg
KCl	200 mg
KH ₂ PO ₄	200 mg
Na ₂ HPO ₄	1,14 mg
H ₂ O _{mQ} estéril	c.s.p 1 litro

Medio de propagación (MP) para CEM (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/Estreptomina (100x)	500 µl
2-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 µl
LIF 1000x	50 µl
H ₂ O _{miliQ (mQ)} estéril	28,4 ml

Medio MEF (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 μ l
H ₂ O _{mQ} estéril	32 ml

Azul de Tripán 4% pH 7,4

Azul de Tripán	400 mg
NaCl	810 mg
K ₂ HPO ₄	60 mg
Metil-p-hidroxibenzoato	50 mg
H ₂ O _{mQ} estéril	c.s.p 10 ml

Medio de diferenciación (MD) para mESCs (50 ml)

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
NaHCO ₃ 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 20%)	10 ml
Glutamax 200 mM (100x)	500 μ l
Aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)	500 μ l
Penicilina/Estreptomicina (100x)	500 μ l
2-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 μ l
H ₂ O _{mQ} estéril	25,95 ml

Medio LB (1000 ml)

Extracto de levadura	5 g
Triptona de carne	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{dest}	Llevar a 1000 ml

Medio SOC (1000 ml)

Extracto de levadura	5 g
Triptona de carne	20 g
NaCl	0,5 g
KCl 250 mM	10 ml
MgCl ₂ 2M	5 ml
Glucosa 1M	20 ml

H ₂ O _{dest}	Llevar a 1000 ml
----------------------------------	------------------

Solución 1 Preparación DNA plasmídico (40 ml)

Tris-HCl pH 7,5 1 M	2 ml
EDTA 0,5 M	0,8 ml
H ₂ O _{dest}	37,2 ml

Solución 2 Preparación DNA plasmídico (20 ml)

NaOH 1M	4 ml
SDS 10%	2 ml
H ₂ O _{dest}	14 ml

Solución 3 Preparación DNA plasmídico (50 ml)

Ácido acético glacial 100%	5,75 ml
Acetato de potasio 5M	30 ml
H ₂ O _{dest}	14,25 ml

Medio Terrific

Peptona	5,23 g
Extracto de levadura	10,7 g
Glicerol	1,8 ml
H ₂ O _{dest}	c.s.p. 360 ml

En esterilidad se agregan 40 ml de Buffer fosfato al Buffer Terrific, obteniendo un volumen final de 400 ml.

Buffer fosfato

KH ₂ PO ₄	1,03 g
K ₂ HPO ₄	5,57 g
H ₂ O _{dest}	c.s.p. 40 ml

Buffer TE

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

PEG 13% m/v en NaCl 1,6M

NaCl 1,6M	1,87 g en 20 ml H ₂ O _{dest}
PEG	0,26 g en 2 ml NaCl 1,6 M

Resultados

1. Estudio de la expresión de remodeladores de la cromatina en células madre pluripotentes

En la búsqueda de proteínas con actividad remodeladora de la cromatina que sean relevantes en los procesos de mantenimiento de la pluripotencia o de la diferenciación celular, nuestro primer objetivo fue identificar en la bibliografía aquellas cuya presencia fuera indispensable para el normal desarrollo murino (Fazio et al., 2008). Luego, estudiamos si estos y otros remodeladores se encontraban incluidos en el grupo de genes cuyos promotores son capaces de reclutar factores de transcripción específicos del estadio indiferenciado de ESC como Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, C-Myc, Dax1 y Zfp281. Para ello, nos basamos en datos de *ChIP on chip* publicados por Kim y colaboradores, donde se inmunoprecipitaron dichos factores de transcripción y se analizó a qué secuencias se unen en el genoma del ratón (Kim, Chu, Shen, Wang, & Orkin, 2008; Loh et al., 2006). Interpolando los datos de la primera y segunda búsqueda, y partiendo de una lista de más de 6000 genes, llegamos a encontrar 19 promotores de genes que codifican para enzimas remodeladoras de la cromatina que unen distintos factores de transcripción considerados indispensables en células madre pluripotentes. Nuestra hipótesis es que estos genes podrían ser regulados durante el proceso de diferenciación celular, jugando un rol en el mantenimiento del estado indiferenciado y/o en la pluripotencia de dichas células. En la Figura R.1 se encuentran esquemáticamente representados cuales son los factores de transcripción que se unen a estos genes candidato y donde los clasificamos según su función conocida.

Los datos utilizados en esta búsqueda preliminar de candidatos fueron generados en ensayos del tipo *whole genome*. En su mayoría, estos datos nunca fueron validados de manera específica para cada gen, así como tampoco fueron analizados sus perfiles de expresión. Por esta razón es que nos abocamos a medir los niveles de expresión de estos factores por PCR cuantitativa en células indiferenciadas, comparándolos contra los niveles de expresión en fibroblastos, como un primer modelo de célula terminalmente diferenciada. Para eso, diseñamos *primers* específicos para algunos de los genes mencionados en la Figura R.1. Como explicamos antes, en esta primera etapa de la búsqueda pretendimos encontrar un conjunto de genes candidato para poder, luego, seguir adelante con el estudio de la función de sólo

algunos de ellos. El criterio que aplicamos consistió en concentrar nuestros esfuerzos en medir la expresión de aquellos remodeladores que unieran los factores de transcripción *core* de pluripotencia (Oct4, Nanog o Sox2) o que se hallaran en trabajos previos que sugirieran su posible relevancia en la biología de las ESC. Tal es el caso de Gcn5L2 o HDAC3, cuyos promotores no unirían los factores de transcripción antes mencionados, pero que como veremos más adelante, parecen modularse fuertemente. Ejemplo del caso contrario es HDAC10, gen que resultaría interesante estudiar pero para el cual no logramos, hasta el momento diseñar un par de *primers* satisfactorios.

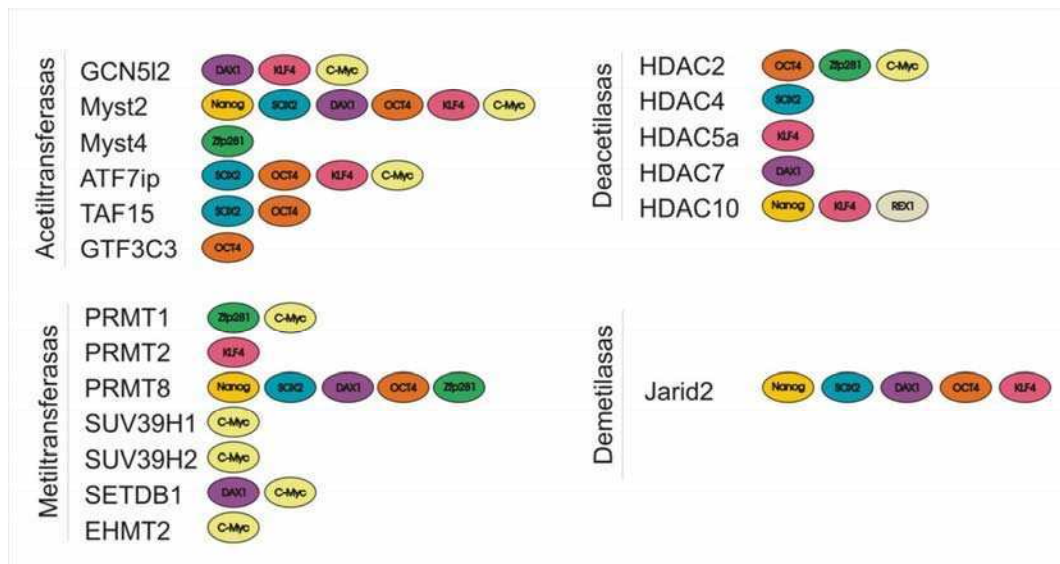


Figura R.1: Esquema de unión de los factores de transcripción de pluripotencia a los promotores de enzimas remodeladoras de la cromatina (Kim et al., 2008). Los óvalos representan los factores de transcripción. A su izquierda, el promotor del gen al cual se unen. En vertical, el grupo funcional al que pertenece cada enzima.

El segundo paso de esta búsqueda consistió, entonces, en medir la expresión de las acetil transferasas Gcn5L2, GTF3C3 y GTF3C4, Myst2, ATF7ip y las deacetilasas de histonas HDAC2, HDAC3 y HDAC5 en las ESC de ratón Ainv15 y compararla contra la de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por su sigla en inglés). En la Figura R.2 se observa que la mayoría de los genes analizados posee un mayor nivel de expresión en células madre embrionarias de ratón (mESC, por su sigla en inglés) que en los MEFs a

excepción de ATF7ip y HDAC5. Por otro lado, medimos la expresión de TAF15 en ambas líneas celulares. Pese a que aún no se ha descrito una actividad remodeladora de la cromatina *per se* para esta proteína, Taf15 es una subunidad del complejo de iniciación transcripcional TFIID y forma parte del complejo acetilador de histonas PCAF87. Estudios previos de otro grupo demostraron la reducción de su expresión en ESC humanas cuando éstas se diferencian espontáneamente (Andersson et al., 2008). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado, observándose una menor expresión de TAF15 en MEFs comparada con la de mESC.

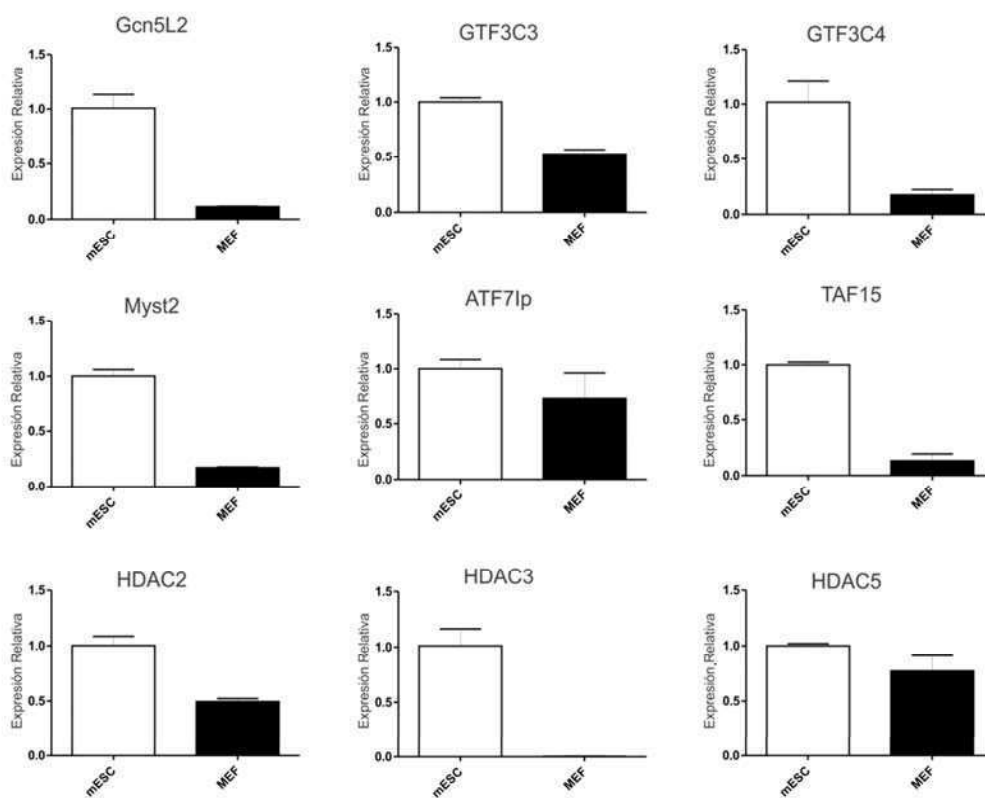


Figura R.2: Expresión de remodeladores de la cromatina en mESC de la línea Ainv 15 comparada con la de fibroblastos embrionarios murinos (MEF). La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó a la de las células indiferenciadas.

Con la intención de confirmar el patrón de expresión obtenido en mESC y analizar el comportamiento de estos genes en otro tipo de células pluripotentes, repetimos este

ensayo utilizando otra línea celular pluripotente indiferenciada, las iPSC. Estas células, generadas previamente en nuestro laboratorio, fueron reprogramadas a partir de MEFs y presentar características muy similares a las ESC, por lo cual esperábamos que los niveles de expresión de los remodeladores en iPSC se asemejaran más a una célula embrionaria que a las células que le dieron origen. Nuevamente vimos que, en general, los genes analizados se transcriben más en las iPSC que en los fibroblastos terminalmente diferenciados que les dieron origen, excepto HDAC5 que parece expresarse de igual manera en ambos tipos celulares (Figura R.3).

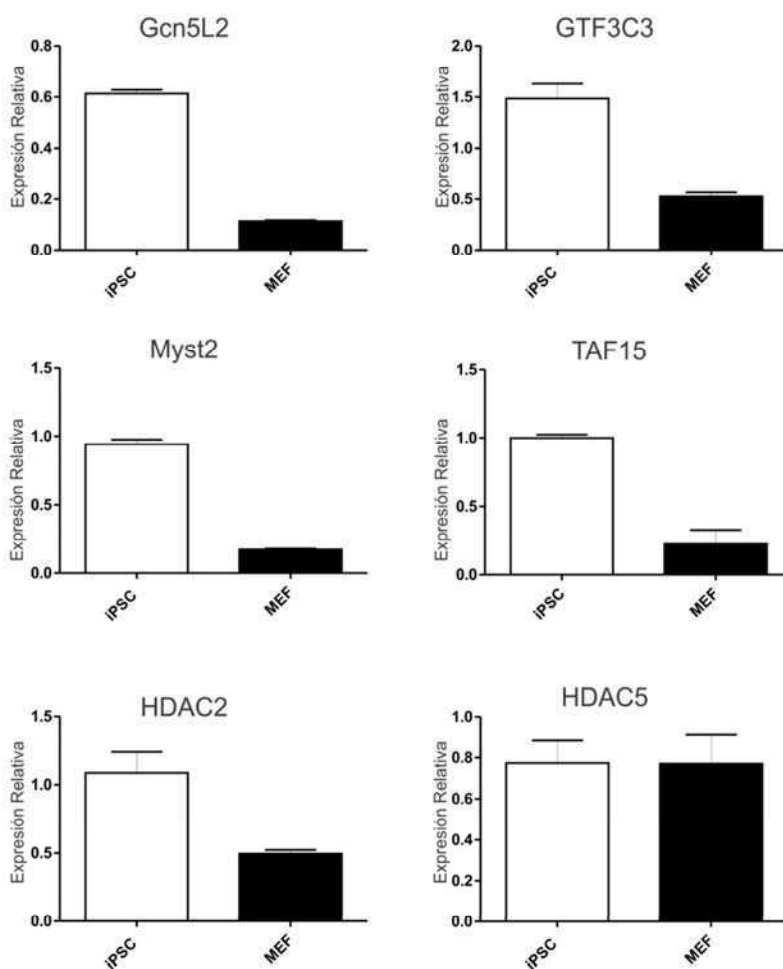


Figura R.3: Expresión de remodeladores de la cromatina en iPSC comparada con la de MEF que le dieron origen. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó a la de las células indiferenciadas.

Recordemos que el propósito de esta búsqueda inicial era encontrar una enzima remodeladora que tuviera un rol determinante en un proceso biológico que resulta clave para el desarrollo de un organismo y está altamente regulado en la naturaleza. Razonamos que un buen gen candidato sería aquel que repitiera su patrón de expresión en el mayor número de líneas celulares de una misma especie, pero que además conservara este comportamiento en líneas celulares de otra especie. Es por eso que repetimos este *screening* en líneas de ESC de humanos comparándolas nuevamente con células terminalmente diferenciadas, en este caso fibroblastos adultos humanos, obtenidos a partir de un cultivo primario de prepucio (HFF, por su sigla en inglés).

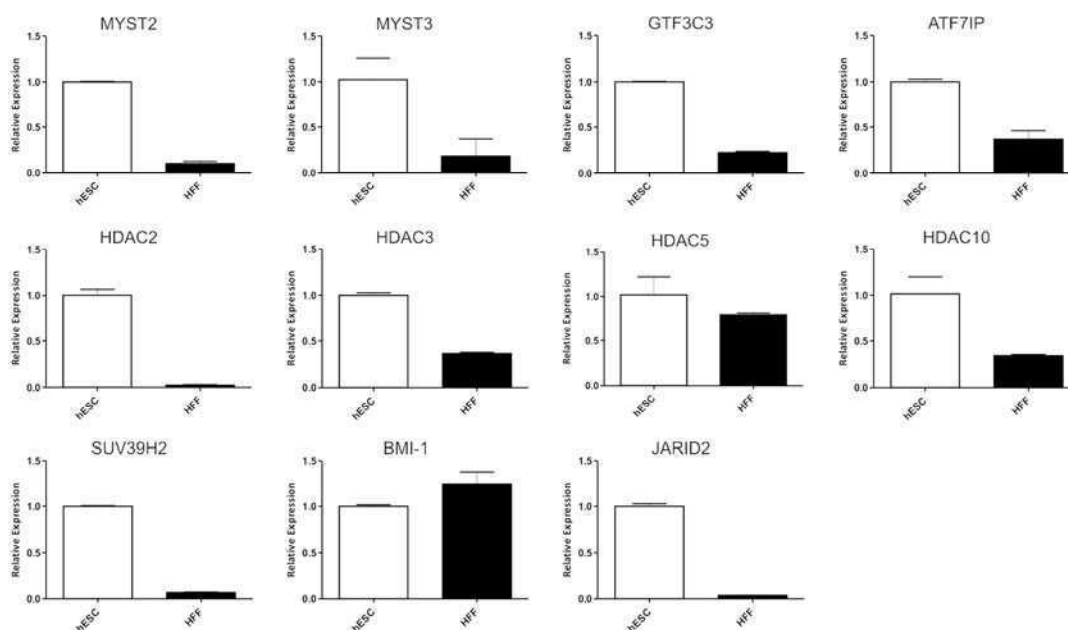


Figura R.4: Expresión de remodeladores de la cromatina en hESC comparada con la de los fibroblastos de prepucio humanos (HFF). La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó a la de las células indiferenciadas.

Analizando en la bibliografía encontramos, en datos no publicados del laboratorio de Richard Young (<http://younglab.wi.mit.edu>), que no todos los genes que seleccionamos para estudiar en ESC de ratón unen en los promotores de sus homólogos en el genoma humano los factores de transcripción de pluripotencia. Por esta razón seleccionamos algunos genes con los que veníamos trabajando, pero

además agregamos en este estudio la deacetilasa de histonas HDAC10, la metiltransferasa SUV39H2, y los genes BMI-1 y JARID2 que codifican para integrantes del complejo represor Polycomb 1 (PRC1) y 2 (PRC2), respectivamente, de conocida importancia en el mantenimiento de la auto-renovación en ESC (Boyer et al., 2006; Endoh et al., 2008; Landeira et al., 2010). Como se muestra en la Figura R.4, para MYST2, GTF3C3 y las HDAC 2, 3 y 5 se repite el patrón previamente observado en ESC de ratón. BMI-1, llamativamente, parece expresarse de igual manera en células ESC y en HFF, contradiciendo en un principio lo que esperábamos de acuerdo a lo que se encontraba reportado (Ding, Lin, Ensenat-Waser, Rose-John, & Zenke, 2012; Hosen et al., 2007).

Hasta aquí, encontramos que en general los genes analizados se expresan más en células madre pluripotentes que en fibroblastos diferenciados, ya sea en células de ratón o en células humanas. El siguiente paso consistió en analizar qué sucede con la expresión de los genes de remodeladores de la cromatina seleccionados, cuando son las mismas ESC las que son forzadas a abandonar el estado indiferenciado y comenzar a diferenciarse. Para ello, decidimos tomar las ESC en estado indiferenciado y diferenciarlas *in vitro* con el protocolo de *hanging drop* para luego medir los niveles transcripcionales de los genes arriba mencionados por PCR en tiempo real. Este abordaje resulta muy informativo y complementa los resultados obtenidos en la comparación entre células pluripotentes y fibroblastos, antes descrita. En primer lugar, las células diferenciadas que se obtienen con este protocolo provienen directamente de las ESC y, por ende, poseen su mismo *background* genómico. Esto nos permite deducir con mayor confianza que las variaciones que se observen en los niveles de expresión de los genes estudiados es resultado del cambio en el programa transcripcional de la célula durante la diferenciación. En segundo lugar, el ensayo de *hanging drop* es un protocolo de diferenciación celular no dirigido, es decir que con el mismo podemos obtener células derivadas de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Elegimos este protocolo y no uno dirigido, porque lo que nos interesó en un principio fue encontrar genes que actúen en la frontera entre la salida del estado indiferenciado y el inicio de la diferenciación celular y no genes implicados en la generación de un linaje en particular. Las estructuras obtenidas por

este protocolo no dirigido contienen diversos tipos celulares. Al analizarlos todos juntos, como un *pool*, podemos detectar genes cuya expresión haya sido modulada durante el proceso de diferenciación en general, y no en un tipo celular en particular. De esta manera, este abordaje experimental permite concluir que las diferencias observadas en la expresión de los genes analizados se deben a una modulación general de su transcripción y no a una regulación linaje-específica. Son muchos los genes que no se modulan cuando la célula se compromete con un linaje determinado pero sí lo hace cuando se diferencia a otros. Este protocolo nos permite identificar estos genes como modulados por la diferenciación. En cambio, si utilizáramos un protocolo de diferenciación linaje-específico, muchos de ellos pasarían inadvertidos.

Brevemente, este ensayo consiste en la formación de cuerpos esféricos, llamados cuerpos embrioides, en la punta de una gota invertida de medio de cultivo sobre la tapa de una placa de cultivo (Figura R.5A, foto del medio). Luego de formados, estos cuerpos embrioides se dejan crecer durante 72 horas y se colocan en una placa de cultivo previamente tratada con gelatina donde se adhieren como se muestra en la foto de la derecha en la Figura R.5A. Para corroborar la eficacia de cada diferenciación, tomamos muestras a distintos tiempos durante 11 días luego de la adherencia de los cuerpos y se midieron los niveles de expresión de diversos marcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog) y de marcadores de diferenciación hacia los linajes endodérmico (AFP), mesodérmico (*Brachyury*) y ectodérmico (*nestina*) (Figura R.5B). Como esperábamos, conforme avanza la diferenciación, los niveles de Oct4 y Nanog disminuyen mientras que los niveles de los marcadores de diferenciación aumentan. En particular, *Brachyury* presenta siempre un máximo en su expresión alrededor del día 7 post adherencia que luego disminuye marcadamente (A. L. Evans et al., 2012).

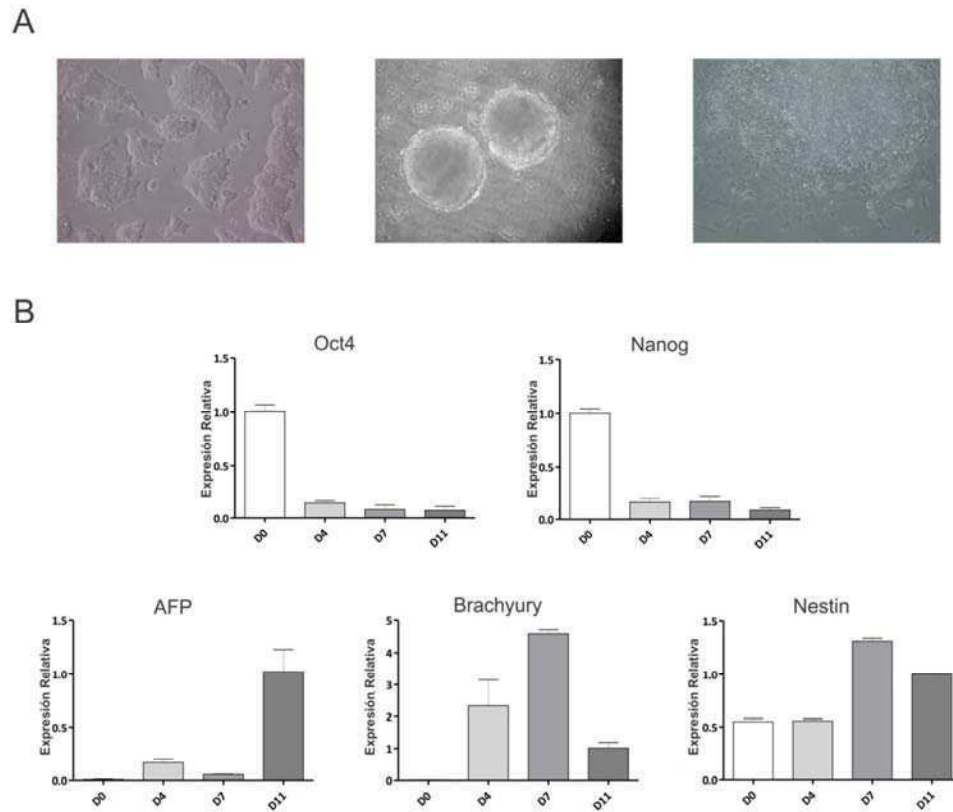


Figura R.5: Validación del ensayo de diferenciación *in vitro* de mESCs de la línea Ainv 15. A) Fotos de campo claro de: izquierda, mESC indiferenciadas; medio, cuerpos embrioides en suspensión; derecha, cuerpos embrioides en adherencia. B) Expresión de genes marcadores a distintos días post-adherencia del protocolo de diferenciación (D4, día 4; D7, día 7 y D11, día 11). D0 se denominó al día 0 del protocolo, es decir, a células indiferenciadas. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al D0.

Una vez verificado el estado de diferenciación de las células, cuantificamos los niveles de expresión de los genes por medio de PCR cuantitativa (Figura R.6). Una vez más, el patrón que encontramos en los otros sistemas analizados pareció repetirse, aunque esta vez con ciertas discrepancias a lo observado previamente. Tal es el caso de GTF3C4, donde vimos que la disminución de su expresión es mucho menos pronunciada que al comparar células indiferenciadas con fibroblastos. Por el contrario, ATF7ip y HDAC5, genes que no habían mostrado previamente una modulación marcada, revelaron en los ensayos de diferenciación *in vitro* perfiles de expresión con una fuerte tendencia a disminuir.

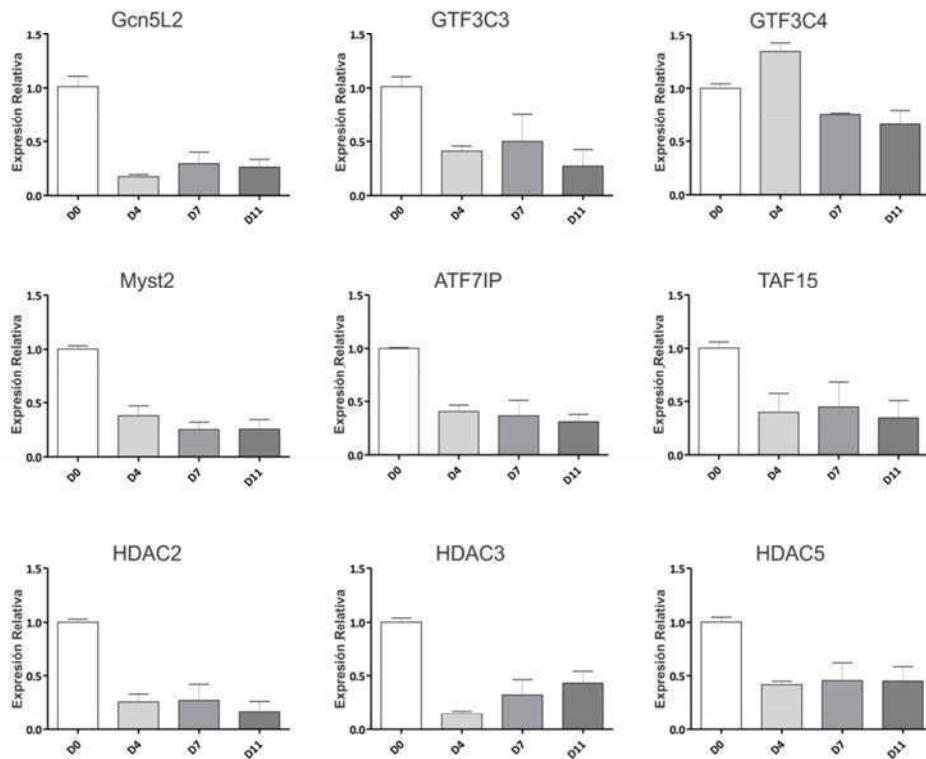
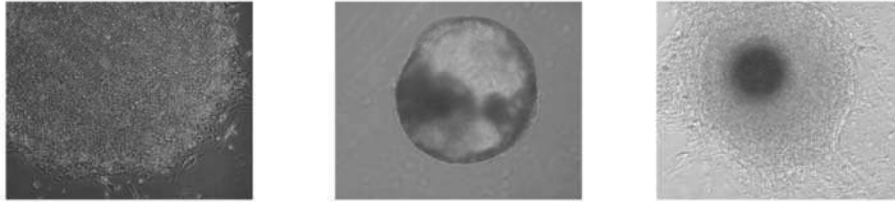


Figura R.6: Expresión de remodeladores de la cromatina durante la diferenciación *in vitro* de mESC de la línea Ainv 15. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió a distintos días post-adherencia del protocolo de diferenciación (D4, día 4; D7, día 7 y D11, día 11). D0, células indiferenciadas. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al D0.

Sabiendo, ahora, que pueden existir discrepancias entre lo observado al comparar células madre pluripotentes con fibroblastos y los perfiles obtenidos en los ensayos de *hanging drop*, quisimos estudiar qué sucedía al diferenciar ESC humanas. En este caso, el protocolo es levemente distinto, debido a que las colonias de ESC humanas no pueden ser disgregadas a células individuales como su contraparte de ratón, sin morir por apoptosis. Se han desarrollado protocolos que utilizan un inhibidor de *Rho-associated kinases*, con lo que se logra disminuir la apoptosis en protocolos de diferenciación *in vitro* similares (Watanabe et al., 2007). En el protocolo utilizado en este trabajo, se toman las colonias de ESC indiferenciadas cultivadas sobre una matriz a base de colágeno (Figura R.7A, foto de la izquierda), se las despegan de la placa con una mezcla de colagenasa y dispasa. Por su tamaño y forma, las colonias en suspensión

tienden a plegarse sobre sí, formando cuerpos esféricos similares a los que se forman con las células madre pluripotentes de ratón (Figura R.7A foto del medio). Estos cuerpos embrioides se dejan crecer por 72 horas y luego se los adhiere a una placa previamente tratada con gelatina (Figura R.7A foto de la derecha).

A



B

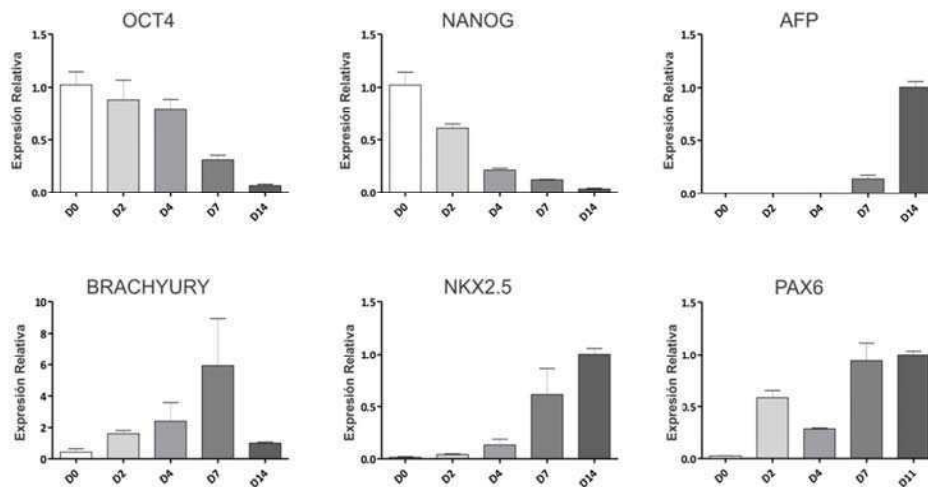


Figura R.7: Validación del ensayo de diferenciación *in vitro* de hESCs de la línea WA09. A) Fotos de campo claro de: izquierda, hESC indiferenciadas; medio, cuerpos embrioides en suspensión; derecha, cuerpos embrioides adheridos. B) Expresión de genes marcadores a distintos días post-adherencia del protocolo de diferenciación (D2, día 2; D4, día 4; D7, día 7 y D14, día 14). D0, células indiferenciadas. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al D0.

Nuevamente, medimos la expresión de genes marcadores del estado indiferenciado (OCT4, NANOG) y de diferenciación hacia los distintos linajes (AFP: endodermo; BRACHYURY y NKX2.5: mesodermo; PAX6: ectodermo) para comprobar que el protocolo se haya llevado a cabo correctamente (Figura R.7B). Como está reportado, OCT4 y NANOG tienden a disminuir conforme avanza el protocolo de

diferenciación celular, mientras que los niveles de AFP, BRACHYURY, NKX2.5 y PAX6 aumenta.

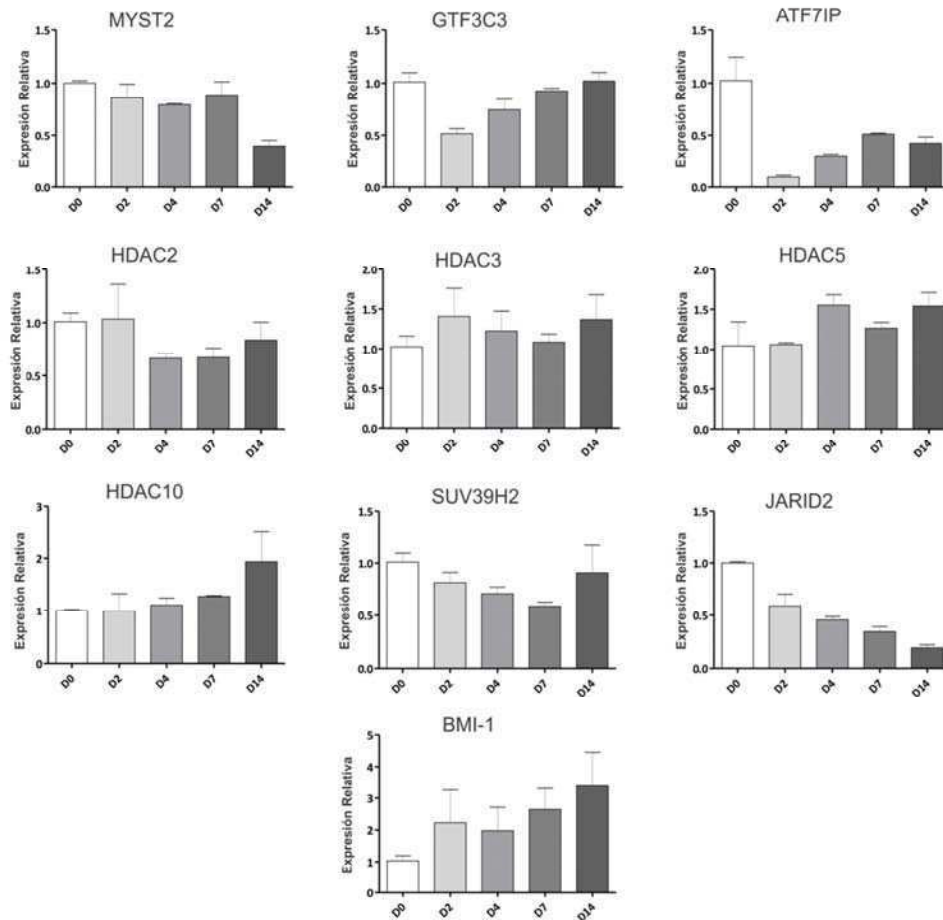


Figura R.8: Expresión de remodeladores de la cromatina durante la diferenciación *in vitro* de HESC de la línea WA09. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió a distintos días post-adherencia del protocolo de diferenciación (D2, día 2; D4, día 4; D7, día 7 y D14, día 14). D0, células indiferenciadas. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al D0.

Una vez corroborado el estado de las células, analizamos los perfiles de expresión de MYST2. Observamos, que tal como se vio previamente, sus niveles de RNA disminuyen, pero lo hacen de manera tardía (Figura R.8). GTF3C3 en cambio, disminuye a tiempos cortos de la diferenciación (Día 2), pero luego se recupera. ATF7ip disminuye

abruptamente a tiempos muy cortos y se mantiene aproximadamente en los mismos niveles de expresión. Al observar las deacetilasas de histonas, vemos que de los tres genes analizados, el único que parece disminuir es HDAC2 y aun así no lo hace dramáticamente como observamos en el experimento de la Figura 3. Para HDAC3 y HDAC5 no se aprecia una tendencia clara. HDAC10 tiende a aumentar sobre el final del protocolo, aunque esta tendencia no es tan marcada. La expresión de la demetilasa SUV39H2 disminuye progresivamente pero sobre el día 14 de la diferenciación esta tendencia se revierte levemente. Tal vez, lo más interesante de esta búsqueda preliminar fueron los resultados obtenidos con los genes que codifican para BMI-1 y JARID2. Hay pocos reportes en la literatura acerca del comportamiento de la expresión de estos dos componentes en ESC humanas indiferenciadas y durante su diferenciación. En particular, BMI-1 parece aumentar muy marcadamente su expresión, casi 4 veces, mientras que JARID2 se apaga progresiva y escalonadamente durante el protocolo.

2. Análisis de la expresión de la metiltransferasa de argininas Prmt8 en células madre pluripotentes

El *screening* previamente descrito, arrojó una serie de genes que podrían ser regulados por los factores de transcripción *core* en ESC y cuya modulación durante la diferenciación *in vitro* apoya la hipótesis de que podrían tener un rol fundamental en los procesos de autorenovación y diferenciación de estas células. Uno de estos genes es Prmt8, una metiltransferasa de histonas cuya expresión está descrita solamente en el sistema nervioso central del ratón. Pese a los pocos datos disponibles en bibliografía, esta metiltransferasa llamó particularmente nuestra atención desde los comienzos de este estudio debido a que, según los resultados del trabajo de Kim y colaboradores, parece reclutar en su promotor los tres factores de transcripción *core* (Oct4, Nanog, Sox2) y además Dax1, Nac1 y Zfp281 (Figura R.1).

Siguiendo con el mismo razonamiento que explicamos anteriormente, analizamos la expresión de Prmt8 por PCR cuantitativa en mESC y en iPSC, y la

comparamos con su expresión en fibroblastos embrionarios murinos (Figura R.9). Observamos que tanto en mESC como en la línea pluripotente reprogramada a partir de MEFs la expresión es mayor a la de fibroblastos.

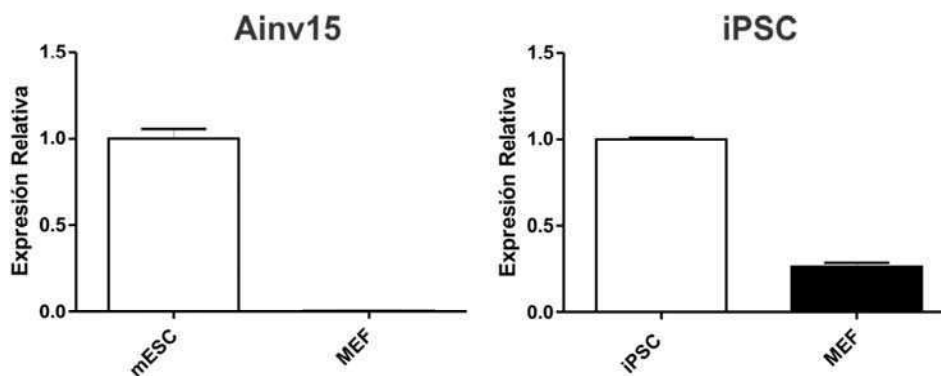


Figura R.9: Expresión de la metiltransferasa Prmt8 en mESC de la línea Ainv 15 (izquierda) e iPSC (derecha) comparada con la de MEF. La expresión de Prmt8 se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó a la de las células indiferenciadas que corresponde en cada caso.

Una vez más, con el propósito de estudiar los niveles transcripcionales de este gen durante la diferenciación *in vitro* de ESC, comparamos su expresión en células indiferenciadas con la en cuerpos embrioides en diferentes días del protocolo de diferenciación *in vitro*.

Medimos la expresión de Prmt8 en dos líneas celulares de mESC derivadas independientemente, R1 y Ainv15, y una de iPSC. En la Figura R.10 mostramos los perfiles de expresión de cada experimento por separado. En todos los casos, observamos que Prmt8 tiende a disminuir fuertemente conforme avanza la diferenciación. No obstante, en algunos de los experimentos realizados con R1 y Ainv15, los niveles de expresión de Prmt8 se recuperan en los últimos días analizados del protocolo. Este incremento tardío en los niveles de RNA mensajero es variable en intensidad y tiempo de aparición. Como mencionamos anteriormente, la diferenciación por *hanging drop* no está dirigida hacia ningún linaje en particular. A pesar de las ventajas ya descritas, esto produce cierta variabilidad en cuanto a los porcentajes de cada tipo celular obtenido al final del ensayo. Razonamos que si en distintos experimentos obtuvimos proporciones variables de un tipo celular en

particular, que exprese normalmente Prmt8, esto podría explicar las diferencias de expresión observadas.

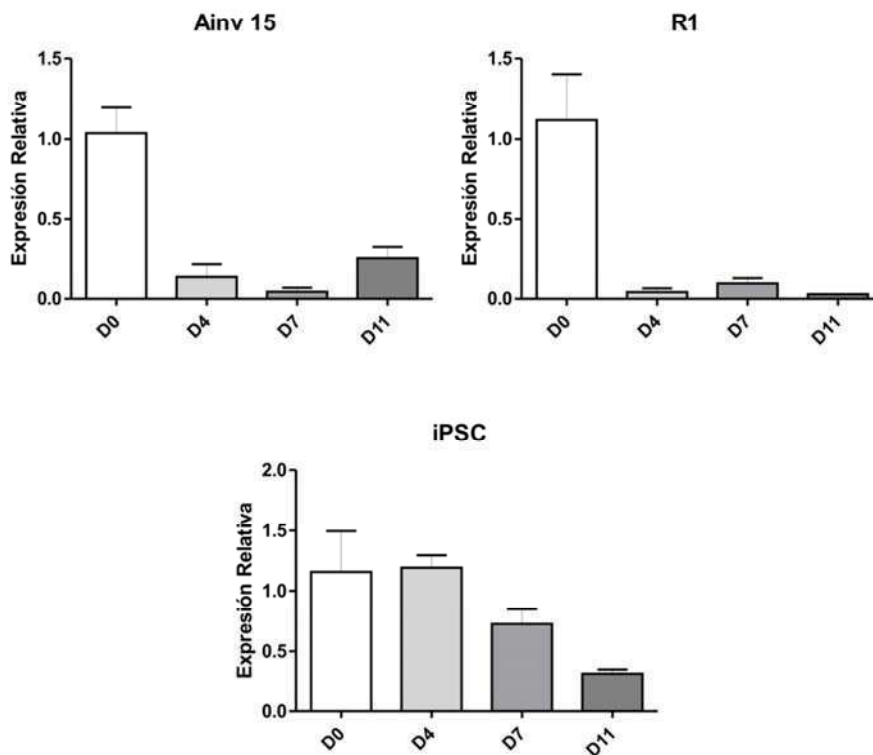


Figura R.10: Expresión de Prmt8 durante la diferenciación *in vitro* de mESC de la línea Ainv 15, R1 o iPSC. La expresión de Prmt8 se midió en la línea mencionada arriba de cada gráfico individual a distintos días post-adherencia del protocolo de diferenciación (D4, día 4; D7, día 7 y D11, día 11). D0, células indiferenciadas. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al D0.

Como explicamos previamente, Prmt8 posee una gran homología con Prmt1. Estas dos proteínas comparten más del 80% de su secuencia aminoacídica. Por esta razón, nos interesó analizar si la transcripción de Prmt1 disminuía durante la diferenciación de la misma manera en que lo hace Prmt8. Para ello medimos sus niveles de expresión en distintos días del protocolo de diferenciación por *hanging drop*. En la Figura R.11 se observa que, al igual que Prmt8, Prmt1 disminuyó considerablemente durante la diferenciación *in vitro*. Sin embargo, el comportamiento de este gen fue diferente al de Prmt8. Por una lado, la disminución observada en la línea R1 presentó una cinética diferente, siendo paulatina a lo largo de la diferenciación; por otra parte, tanto en la

línea Ainv 15 como en IPSC, Prmt1 no siempre disminuyó su expresión durante la diferenciación. En diferentes réplicas Prmt1 mostró distintas tendencias, probablemente consecuencia de las diferentes poblaciones celulares que surgieron en los distintos protocolos de diferenciación (resultados no mostrados). En conjunto, esto sugiere que los mecanismos de regulación de ambos genes son diferentes.

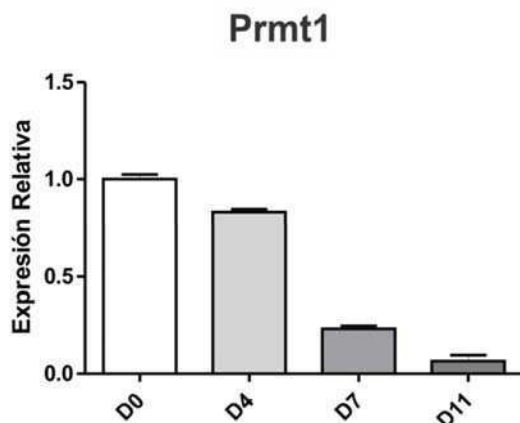


Figura R.11: Expresión de Prmt1 durante la diferenciación *in vitro* de mESC de la línea R1. La expresión de Prmt1 se midió a distintos días post-adherencia del protocolo de diferenciación (D4, día 4; D7, día 7 y D11, día 11). D0, células indiferenciadas. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al D0.

El grupo de Kousaka describió que la expresión de Prmt8 se encuentra limitada al sistema nervioso. Hasta el momento no se ha descrito su rol durante el desarrollo. Debido a que durante este trabajo encontramos que se expresa en células madre y que durante su diferenciación no dirigida esta expresión disminuye notablemente nos interesó estudiar que ocurre al diferenciar mESCs de forma dirigida a progenitores neurales. Nos preguntamos si al diferenciarse hacia tipos celulares del sistema nervioso, la transcripción de esta metiltransferasa se modula de forma diferente. Para probar esta hipótesis, sometimos a las células a un protocolo de diferenciación dirigido, que consiste en sembrar las células en baja densidad en placas adherentes y cultivarlas en presencia de un medio definido (para más detalles ver sección de Materiales y Métodos). Tomamos muestras de RNA a cada día durante los 6 días de duración de este protocolo y medimos, por RT-qPCR, los niveles de los genes marcadores del estado indiferenciado Oct4, Nanog y Sox2 y los marcadores neuronales

Sox1, Sox3 y Nestina (Figura R.12). Como esperábamos, los niveles de Nanog, Sox2 y Oct4 bajaron conforme avanzó la diferenciación aunque, llamativamente, este último lo hizo sobre el final del protocolo. Tanto Sox1 y Sox3 como Nestina aumentaron sus niveles, sugiriendo que las células se diferenciaron exitosamente hacia tipos celulares neurales.

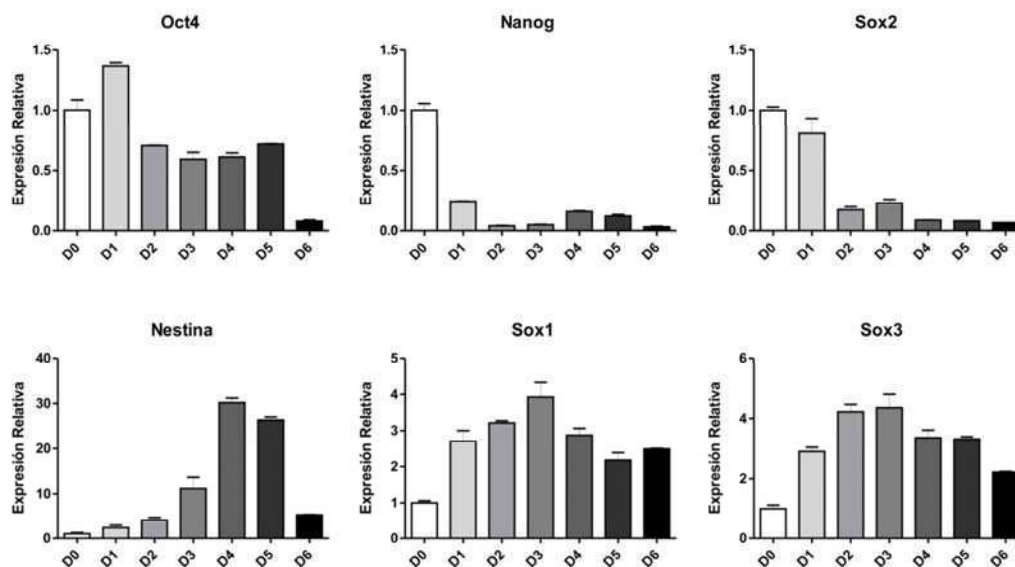


Figura R.12: Validación del ensayo de diferenciación *in vitro* dirigido de mESCs de la línea R1. Expresión de genes marcadores a distintos días (D) del protocolo de diferenciación. La expresión del gen mencionado arriba de cada gráfico individual se midió por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al día 0 del protocolo.

Contrariamente a lo que esperábamos, como se muestra en la Figura R.13, la expresión de Prmt8 disminuyó de forma similar a lo que ocurrió con el protocolo no dirigido de *hanging drop*. Si bien esperábamos que su expresión se regule positivamente en células nerviosas, creemos que la expresión de esta metiltransferasa debe ser específica de un tipo celular determinado, pero no necesaria para alcanzar dicho tipo celular durante un proceso de diferenciación. De ser así, cabe la posibilidad de que este protocolo no logre producir una cantidad suficiente de células tal que los niveles de mensajero de Prmt8 puedan ser detectados.

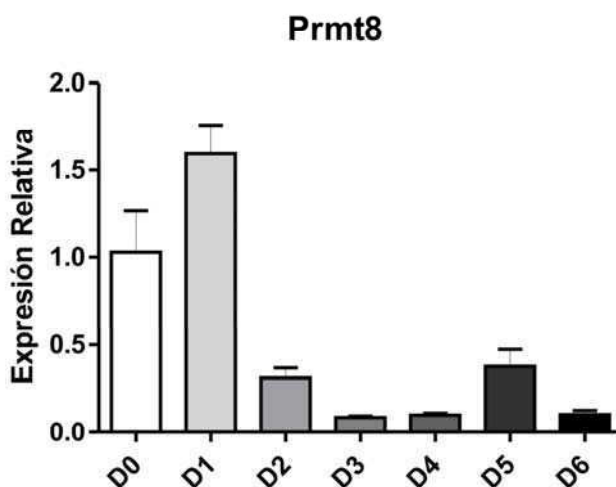


Figura R.13: Expresión de Prmt8 durante la diferenciación dirigida de mESC de la línea R1. La expresión de Prmt8 se midió a distintos días (D) del protocolo de diferenciación por RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al día 0 (D0) del protocolo, es decir, a células indiferenciadas.

3. Estudio de la relevancia de Prmt8 en células madre pluripotentes

3.1 Generación de una línea estable que sub-expresa Prmt8 de manera inducible

Una vez que comprobamos que la transcripción de esta metiltransferasa es modulada durante la diferenciación, nos propusimos investigar su influencia sobre las propiedades fundamentales de las células indiferenciadas: la autorenovación y la pluripotencia. Para ello, decidimos silenciar Prmt8 introduciendo de forma estable en ESCs de la línea R1, diversos shRNA inducibles cuyo blanco específico es el RNA mensajero de esta enzima. Dado que las ESC poseen una muy baja eficiencia de transfección, optamos por introducir estos shRNAs mediante transducción con partículas lentivirales defectivas en su replicación. Primero elegimos las tres secuencias con mejor puntaje dentro de las prediseñadas por The RNAi Consortium (TRC, www.broadinstitute.org/rnai/public/gene/search). Estas secuencias están especialmente diseñadas para formar una estructura de horquilla al ser transcritas. Los productos procesados de estas horquillas reconocen regiones diferentes de la secuencia codificante del RNA para el cual fueron diseñadas. Posteriormente,

procedimos a clonar dichas secuencias de manera direccional en el vector Tet-pLKO Puro, obtenido comercialmente (Addgene). Este vector posee todas las secuencias necesarias para que el shRNA se empaquete en partículas virales y el gen que confiere resistencia al antibiótico puromicina, de manera de poder seleccionar establemente las células que hayan integrado la secuencia deseada en el genoma. Este sistema cuenta, además, con la ventaja de ser inducible por tetraciclina. Silenciar la secuencia de interés en el momento que se desee es, en este caso, de gran importancia. Si nuestra hipótesis fuera correcta y Prmt8 resultase necesario para el mantenimiento de las propiedades de las ESCs, la introducción de un shRNA de expresión constitutiva llevaría a la diferenciación espontánea de las ESC que lo contengan, haciendo imposible la selección de clones estables.

Luego de obtenidos los tres vectores con los shRNA correspondientes (Tet-pLKO puro shPrmt8 1025, 1036 y 1093), transfectamos las células empaquetadoras HEK293T con el fin de ensamblar las partículas lentivirales. Posteriormente, transdujimos ESCs de la línea R1 con los sobrenadantes virales que llevan cada uno de los shPrmt8. Estas ESCs fueron seleccionadas por 5-7 días con el antibiótico puromicina. Para conocer la mínima concentración de puromicina que logra matar a la totalidad de las células que no poseen el transgen realizamos una curva de respuesta al antibiótico con las siguientes concentraciones del mismo: 0, 0,5, 1, 2,5 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Luego de 5 días con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina no encontramos células *wild type* viables. Las células que sobrevivieron al proceso de selección se dejaron crecer por dos días más y luego tomamos estas colonias y las disgregamos para obtener clones y *pools* de células resistentes.

Utilizando un *pool* de células procedente de cada transducción, estudiamos cuál de las tres horquillas resultó más efectiva a la hora de disminuir la expresión del RNA mensajero de Prmt8. Debido a que la expresión de dichas horquillas se encuentra regulada por un promotor activable por tetraciclina o su análogo más estable, doxiciclina, medimos los niveles de Prmt8 en ESCs tratadas con dos concentraciones de doxiciclina, a diferentes tiempos (Figura R.14).

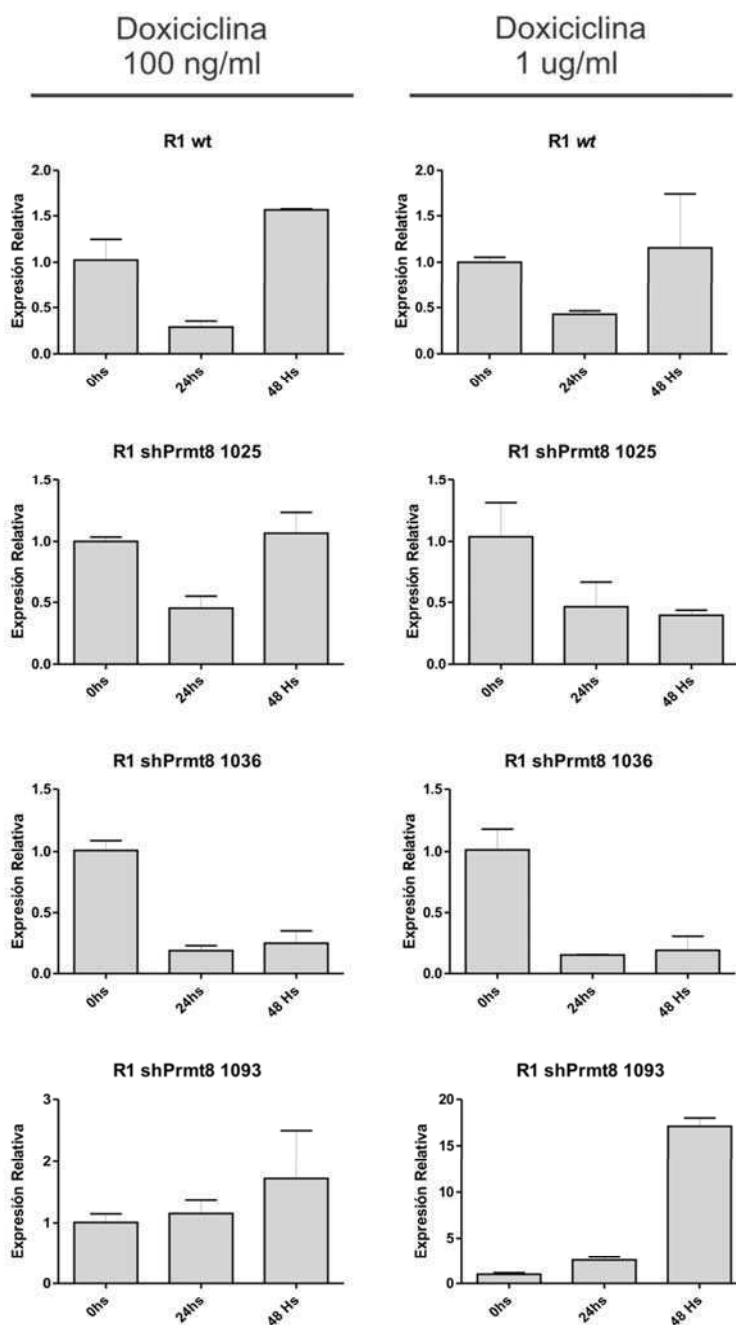


Figura R.14: Expresión de Prmt8 en células de las líneas R1 *wt* o R1 1025, 1036 ó 1093 cultivadas con 100 ng/ml o 1 µg/ml de doxiciclina. La expresión de Prmt8 se midió a distintos 24 ó 48 horas mediante RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al control no tratado (0 horas).

Para este ensayo, elegimos dos concentraciones de doxiciclina que estuvieran en los extremos de lo recomendado por el proveedor del vector: 100 ng/ml y 1 µg/ml y medimos la expresión de Prmt8 a las 24, 48 y 72 horas. Como se observa en el panel correspondiente a la línea R1 *wt*, existe una gran variabilidad en la expresión de Prmt8

en presencia de doxiciclina aún en ESC que no poseen el shRNA. A lo largo de todo este trabajo observamos esta misma variabilidad aún en células *wt* en ausencia de doxiciclina, sugiriendo que se debe más a un fenómeno de regulación de la enzima que a una respuesta al inductor del transgen. De los tres shRNAs analizados, el único que parece disminuir la expresión de este gen de forma robusta y confiable es el shPrmt8 1036. Además, lo hace con una eficiencia de alrededor del 80%. Tanto la inducción del shPrmt8 1025 como del 1093 no resultaron confiables para disminuir los niveles de Prmt8. Para el resto de los ensayos decidimos utilizar las células que contienen en su genoma el shPrmt8 1036 y las denominamos R1 1036. Además, para esta línea, no observamos diferencias entre las concentraciones de doxiciclina ensayadas, razón por la cual para el resto de los experimentos continuamos utilizando la concentración más baja.

Las secuencias de las horquillas fueron elegidas con el criterio de que ninguna tuviera otro blanco más que Prmt8. Sin embargo, considerando la alta similitud de secuencias de esta proteína con Prmt1, decidimos asegurarnos que el shRNA 1036 disminuye específicamente la expresión de Prmt8 y no la de Prmt1. Para ello analizamos, en primer lugar, la expresión de Prmt1 en la línea R1 *wild type* y R1 1036 en presencia de doxiciclina. Observamos que los niveles de este gen en la línea parental y la línea modificada son muy similares (Figura R.15).

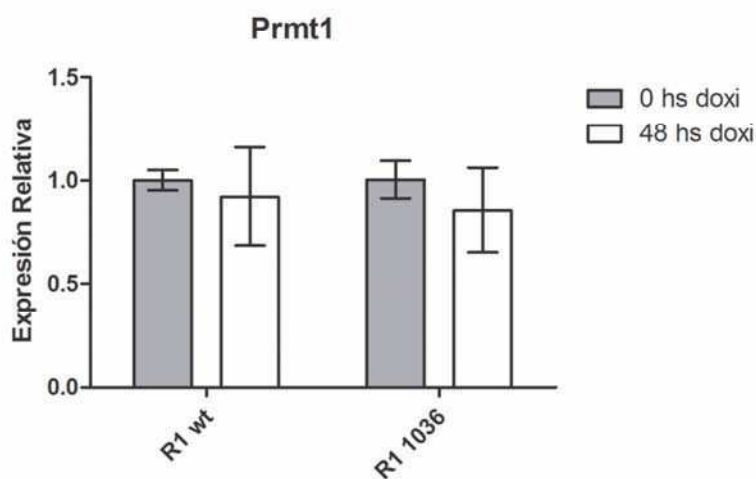


Figura R.15: Expresión de Prmt1 en células de las líneas R1 *wt* o R1 1036 cultivadas con 100 ng/ml de doxiciclina durante 48 horas. La expresión se midió mediante RT-qPCR, se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al control no tratado (0 horas).

Además, comparamos por medio del programa Genious Basic (Biomatters) la secuencia blanco de este shRNA con la de los cuatro mensajeros anotados de Prmt1. Se utilizaron los parámetros por defecto del programa (Matriz de costo: 65% de similitud (5.0/-4.0), penalidad de brecha: 12, penalidad de extensión de brecha: 3 y tipo de alineamiento: global con brechas finales libres). El shRNA 1036 se alinea con el exón 12 de los mensajeros de Prmt1 pero posee 5 *missmatches* no consecutivos. Más aún, al alinear esta secuencia blanco con todos los mensajeros de *Mus musculus* utilizando la herramienta BLAST del sitio de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) el único resultado compatible con el de la secuencia ingresada es el de Prmt8 (*E value* = 0.005).

Intentamos confirmar que los niveles de la proteína Prmt8 disminuyen en células donde se induce el shRNA. Todos los anticuerpos comerciales contra Prmt8 reconocen un péptido que también es parte de la secuencia aminoacídica de Prmt1 y, dado que esta última es la metiltransferasa mayoritaria en mamíferos, no logramos ver diferencias en ensayos de inmunofluorescencia o *western blot*.

3.2 Rol de Prmt8 sobre la auto-renovación de ESCs

Una vez obtenida la línea estable inducible para el silenciamiento de Prmt8, nos propusimos estudiar la importancia de este gen en las propiedades básicas de las células madre pluripotentes: la auto-renovación y la pluripotencia. En primer lugar, con el objetivo de analizar el rol de Prmt8 en el mantenimiento del estado indiferenciado, indujimos la expresión del shRNA mediante tratamiento de las células R1 1036 con doxiclina por 48 horas y las comparamos con su control no tratado correspondiente. Por otra parte, evaluamos el efecto de la doxiclina *per se* mediante tratamiento de la línea R1 *wild type*. Observamos una diferencia de morfología de las colonias correspondientes a la línea R1 1036 cuando se induce la expresión del shRNA. En la Figura R.16 se observa que las colonias de células tratadas con doxiclina son más grandes, refringentes y simétricas que aquellas de la misma línea que no fueron tratadas. Asimismo, notamos que las células R1 1036 que son cultivadas por largos períodos de tiempo en presencia de doxiclina aumentan más rápidamente en número

que aquellas que son cultivadas sin doxiciclina. Esto no sucede en la línea parental, donde las colonias de células tratadas o no con doxiciclina suelen tener el mismo tamaño y tiempo de duplicación. En estos momentos nos encontramos evaluando si las células R1 1036 tratadas con doxiciclina tienen una mayor tasa de proliferación celular.

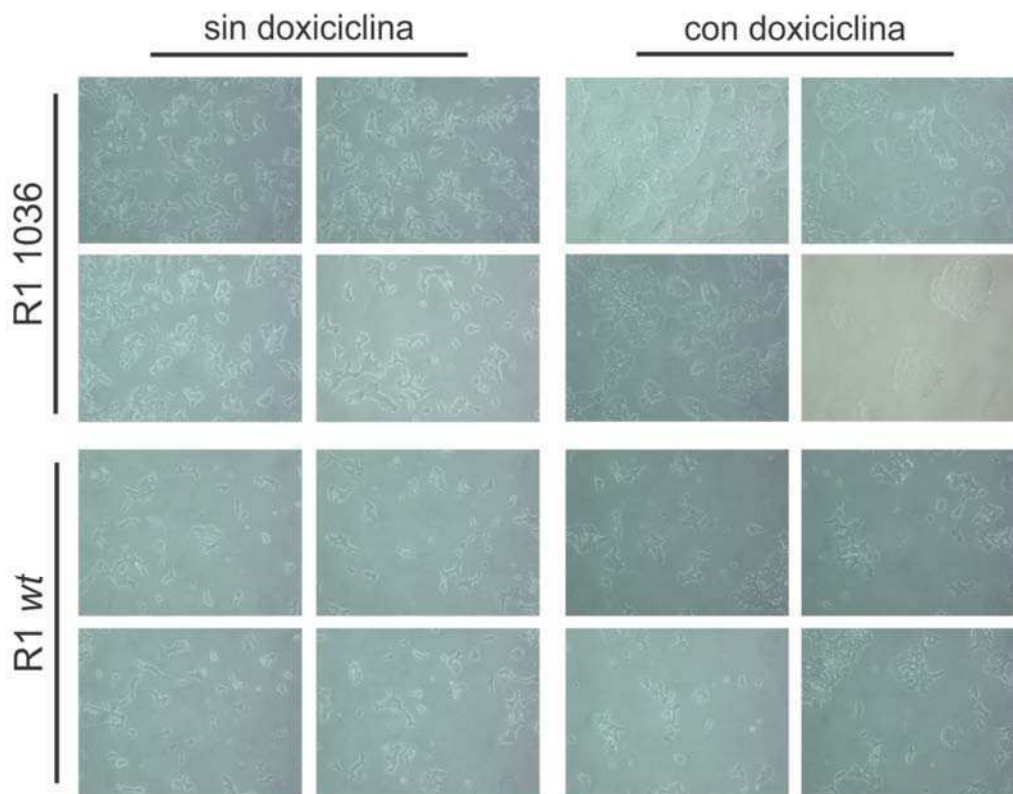


Figura R.16: Fotos de campo claro obtenidas con un aumento 400X, de células R1 wt o R1 1036 cultivadas con o sin doxiciclina por 48 horas. Cada grupo contiene fotos de dos campos correspondientes a dos experimentos independientes.

Una primera hipótesis que formulamos es que Prmt8 es necesaria para el mantenimiento de la auto-renovación. Por el contrario, observamos que las células con menores niveles de Prmt8 aparentan ser homogéneamente indiferenciadas. Para confirmar esta observación decidimos analizar por inmunofluorescencia la presencia y localización de Oct4, Nanog y SSEA-1, todos ellos marcadores del estado indiferenciado, en células tratadas o no con doxiciclina por 48 horas (Figura R.17). Como mencionamos anteriormente, además tratamos a células R1 *wild type* con

doxiciclina para estudiar si las diferencias observadas se debían a un efecto inespecífico de esta droga. Como se muestra en la Figura R.17, no observamos diferencias en cuanto a intensidad y ubicación de los marcadores analizados para células *wild type* cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina por 48 horas. No obstante, pudimos observar que en ambas condiciones existe cierta heterogeneidad en la localización subcelular de Nanog. Existen gran cantidad de reportes de que las ESCs presentan cantidades de Nanog diferentes dentro de una misma colonia (Singh, Hamazaki, Hankowski, & Terada, 2007). Así, las células de dicha colonia pueden dividirse en *high Nanog* y *low Nanog* según los niveles de expresión del mismo. En este ensayo nosotros no pudimos apreciar diferencias en la intensidad de este factor de transcripción, pero sí notamos que tanto en las células del borde de la colonia como en las que se desprendieron de ella Nanog se encuentra en el citoplasma. Por otro lado, en las células que se encuentran en el interior de la colonia, especialmente en aquellas colonias más compactas y de aspecto más redondeado, con morfología típica de célula indiferenciada, Nanog se localiza preferentemente en el núcleo o tanto en núcleo como citoplasma.

Posteriormente, repetimos este protocolo con células de la línea R1 1036 induciendo o no el shRNA por 48 horas. Nuevamente, analizamos estas muestras con anticuerpos que reconocen específicamente Oct4, Nanog y SSEA-1. Las células 1036 tratadas con doxiciclina presentan marcaciones para Oct4 y SSEA-1 que son indistinguibles de las de células sin tratar. Sin embargo, nuevamente notamos que las colonias de células a las que se les indujo el shRNA son más grandes (dato no mostrado en esta figura), simétricas y conservan un mejor aspecto en general que las de la condición control. Más aún, la marca de Nanog parece ser más homogénea en células 1036 con doxiciclina, reteniendo su localización nuclear aún en las células ubicadas en los bordes de las colonias (Figura R.18).

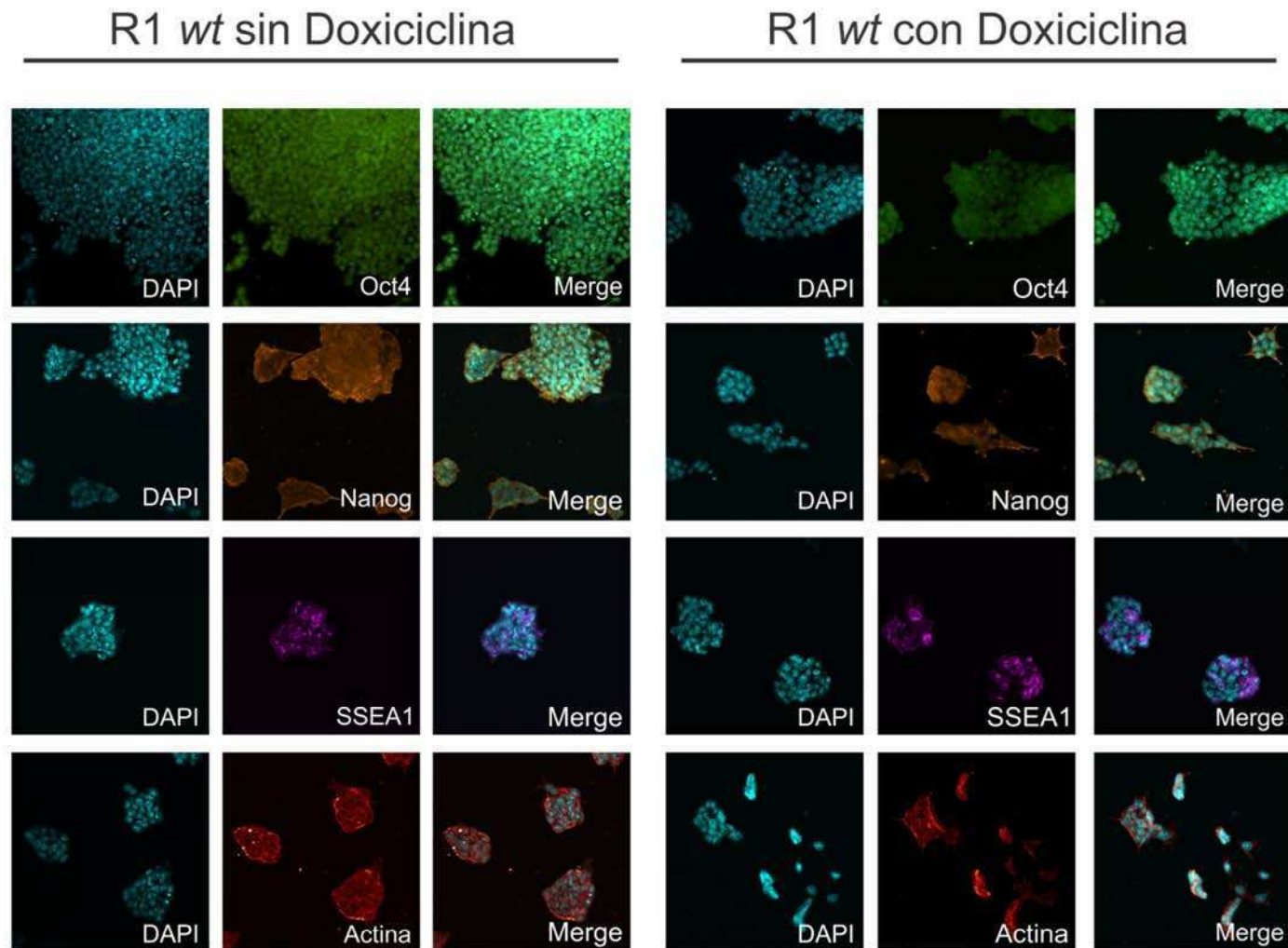


Figura R.17: Inmunofluorescencia confocal de células R1 wt cultivadas en presencia o ausencia de doxyciclina 100 ng/ml por 48 horas. En las fotos se muestran colonias representativas de la muestra indicada en el borde superior de la figura. Las células se marcaron con los anticuerpos específicos mencionados en la columna del centro de cada panel. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Aumento 400X.

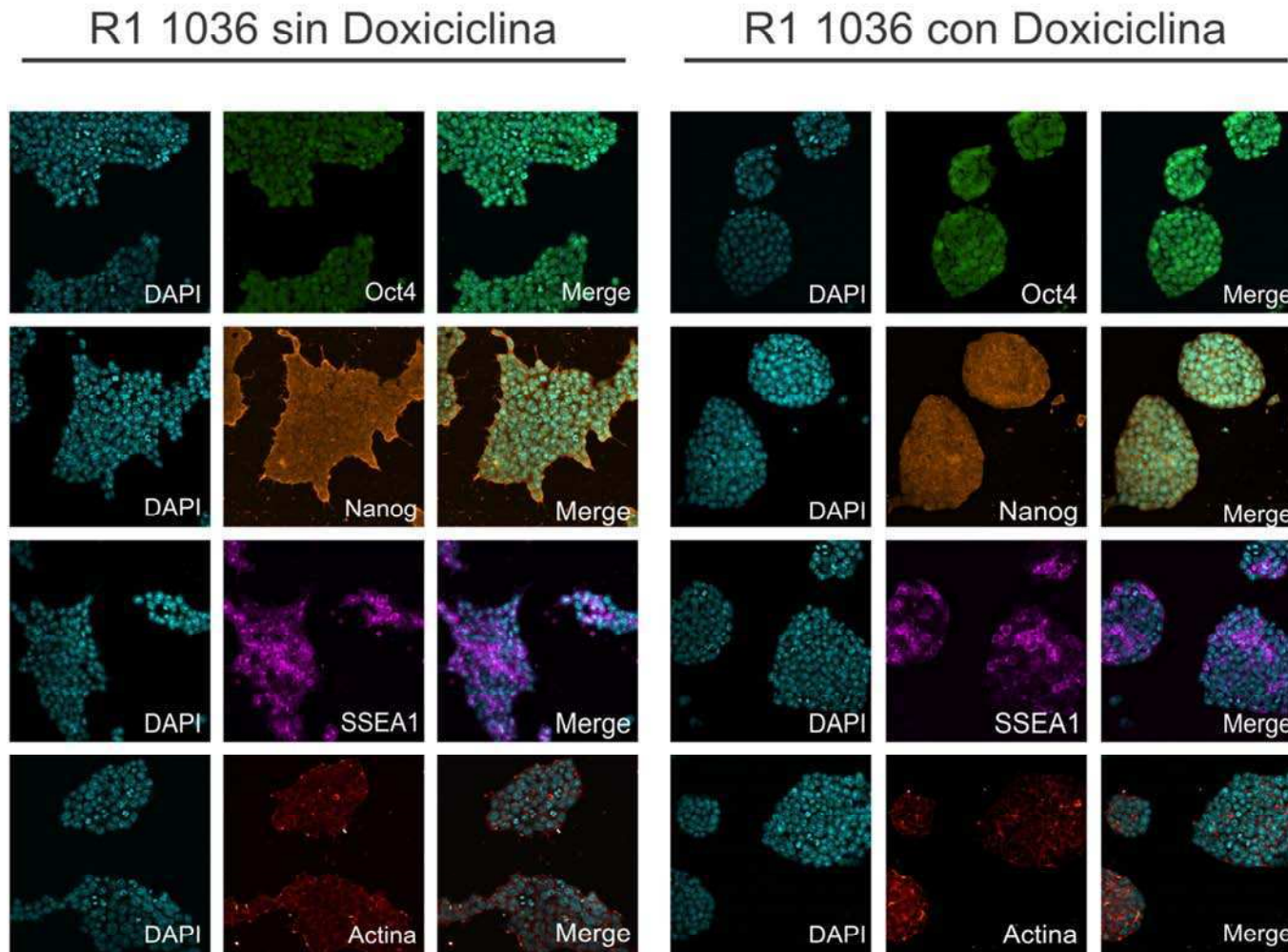


Figura R.18: Inmunofluorescencia confocal de células R1 1036 cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina 100 ng/ml por 48 horas. En las fotos se muestran colonias representativas de la muestra indicada en el borde superior de la figura. Las células se marcaron con los anticuerpos específicos mencionados en la columna del centro de cada panel. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Aumento 400X.

Por otro lado, existen reportes en la literatura que indican que una de las proteínas con las que se puede asociar Prmt8 es actina (Pahlich, Zakaryan, & Gehring, 2008). Debido a que el remodelado del citoesqueleto es un requerimiento clave durante la diferenciación, quisimos estudiar si la ausencia de Prmt8 en mESCs modifica de alguna manera las fibras de actina. Para ello, realizamos un análisis de inmunofluorescencia en células de la línea R1 *wt* y 1036 a las que se las cultivó en presencia o ausencia del inductor doxiciclina de la misma manera que los ensayos anteriores. En estos ensayos no pudimos observar diferencia alguna en intensidad de marca, localización o apariencia de la marca de actina. Cabe mencionar que debido a que las mESC son muy pequeñas en tamaño y poseen muy poco citoplasma en comparación al volumen de su núcleo, aunque existiese alguna diferencia en la estructura del citoesqueleto resultaría muy difícil observarla por técnicas de microscopía.

3.3 Rol de Prmt8 sobre la pluripotencia de ESCs

Como mencionamos anteriormente en repetidas oportunidades, otra de las propiedades que caracterizan a las ESCs además del mantenimiento de su estado indiferenciado en cultivo, es su habilidad para diferenciarse a tipos celulares derivados de las tres capas germinales. Dado que las células que poseen menor expresión de Prmt8 parecen Dado que las células que poseen menor expresión de Prmt8 tienen morfología de colonia indiferenciada, expresan los marcadores de estado indiferenciado e incluso tienen mejor aspecto que las que lo expresan normalmente, resulta de interés saber si, además, se pueden diferenciar con normalidad, es decir, si preservan su pluripotencia. Con este objetivo sometimos a células que poseen el shRNA contra Prmt8, cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina, al mismo protocolo de diferenciación no dirigido que utilizamos en la primera parte. Tomamos cuerpos embrioides al día 7 y al día 11 post-adherencia y analizamos presencia y distribución de los marcadores moleculares de endodermo, Alfa-fetoproteína (AFP); mesodermo, actina de musculo liso (AML) y ectodermo, beta-III tubulina (B3T). Como se observa en la Figura R.19, la línea 1036 posee, en ausencia de doxiciclina, expresión de todos los marcadores analizados, lo cual nos confirma que estas células son capaces de diferenciarse *in vitro* a los tres linajes a pesar de estar genéticamente modificadas.

En experimentos de diferenciación realizados previamente con la línea R1 *wt*, las marcas de AML y B3T tradicionalmente se limitan a cúmulos en forma de esfera localizados en ciertas regiones de los cuerpos embrioides (datos no mostrados). Hemos observado este tipo de marcas en distintos días del protocolo de diferenciación, inclusive en cuerpos embrioides R1 *wt* de día 11. De forma similar, los cuerpos embrioides de día 7 correspondientes a la línea 1036 sin doxiciclina muestran tener este tipo de marca dispersa. Llamativamente, al día 11 de este protocolo, además de la marca en forma de cúmulos tradicional, estos cuerpos embrioides comienzan a mostrar en su periferia células de fenotipo fibroblástico que presentan AML en el citoplasma en forma de fibras alargadas. Si la diferenciación de células 1036 se lleva a cabo en presencia de doxiciclina (Figura R.20), los cúmulos de AML se tornan más evidentes y conspicuos en el centro de los cuerpos embrioides, mientras que a día 7 se puede observar que algunas células ya presentan AML como fibras alargadas

definidas. A día 11, prácticamente todos los cuerpos embrioides de la línea 1036 diferenciados en presencia de doxiciclina poseen en su periferia células que se tiñen fuertemente con AML en forma de fibras mientras que muy pocos siguen presentando los cúmulos en forma de esfera.

De la misma manera, los cuerpos embrioides de la línea 1036 derivados en ausencia de doxiciclina presentan la misma marca dispersa de B3T. Sin embargo, cuando estas células se diferencian en presencia de doxiciclina observamos una marca definida en forma de fibras delgadas compatible con la de procesos neuronales. Cabe destacar que en estas muestras, B3T marca una gran red de procesos en las tres dimensiones, hecho que no se consigue apreciar en las fotos.

En conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de Prmt8 provee un contexto que favorece la diferenciación de las células hacia un tipo celular determinado, o al menos, a tipos celulares donde la AML tiene esta organización particular.

En este momento nos encontramos estudiando si la ausencia de Prmt8 posee algún efecto durante la diferenciación de ESCs in vivo mediante ensayos de formación de teratomas. Por otro lado, también estamos evaluando si estas células poseen la capacidad de diferenciarse en un protocolo dirigido hacia linaje neural.

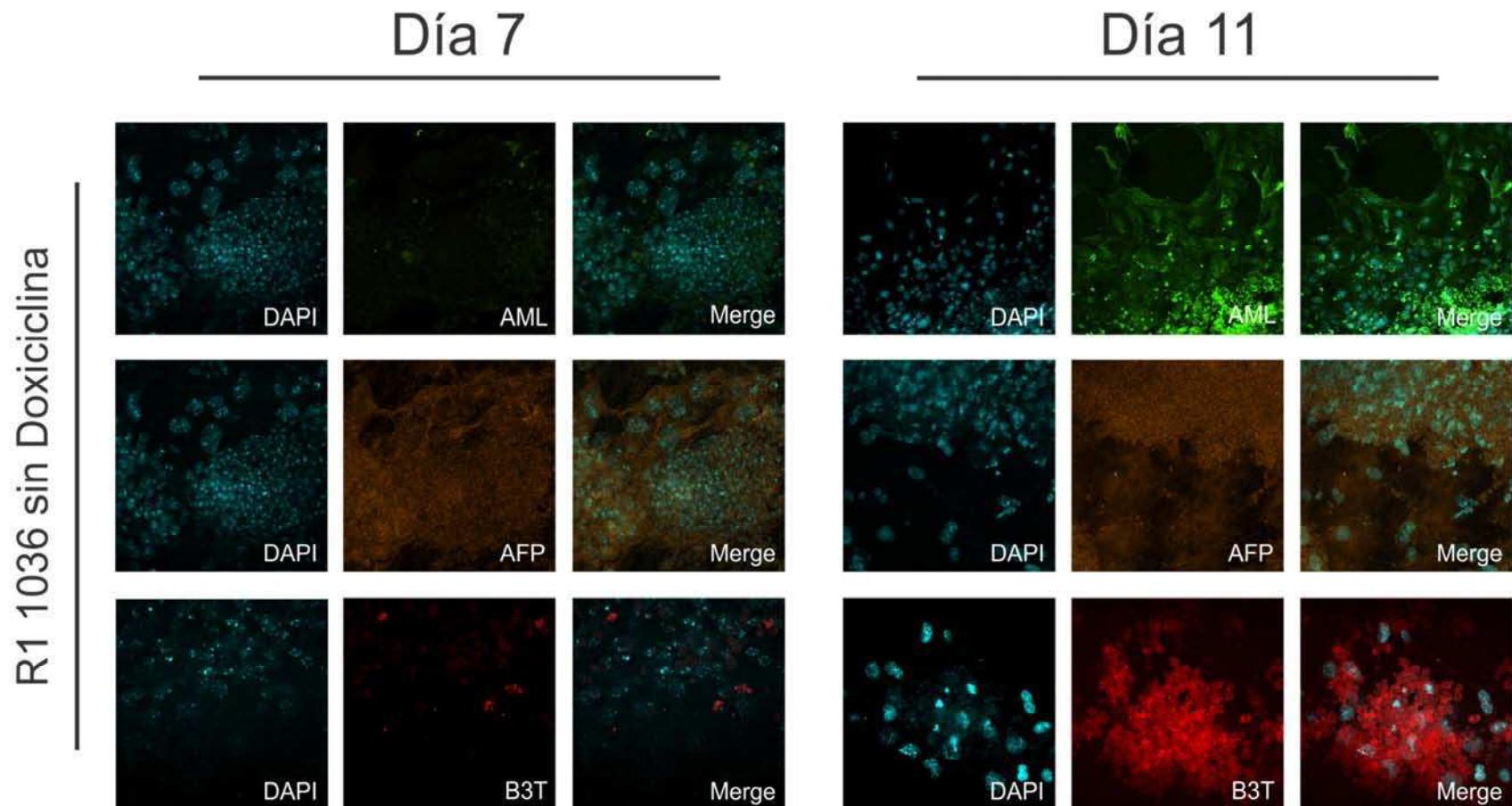


Figura R.19: Inmunofluorescencia confocal de cuerpos embrioides derivados de células R1 1036 diferenciados en ausencia de doxiciclina. En las fotos se muestran cuerpos embrioides representativos correspondientes al día post-adherencia indicado en el borde superior de la figura. Las células se marcaron con los anticuerpos específicos mencionados en la columna del centro de cada panel. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Aumento: para AML y AFP 400X, para B3T 600X.

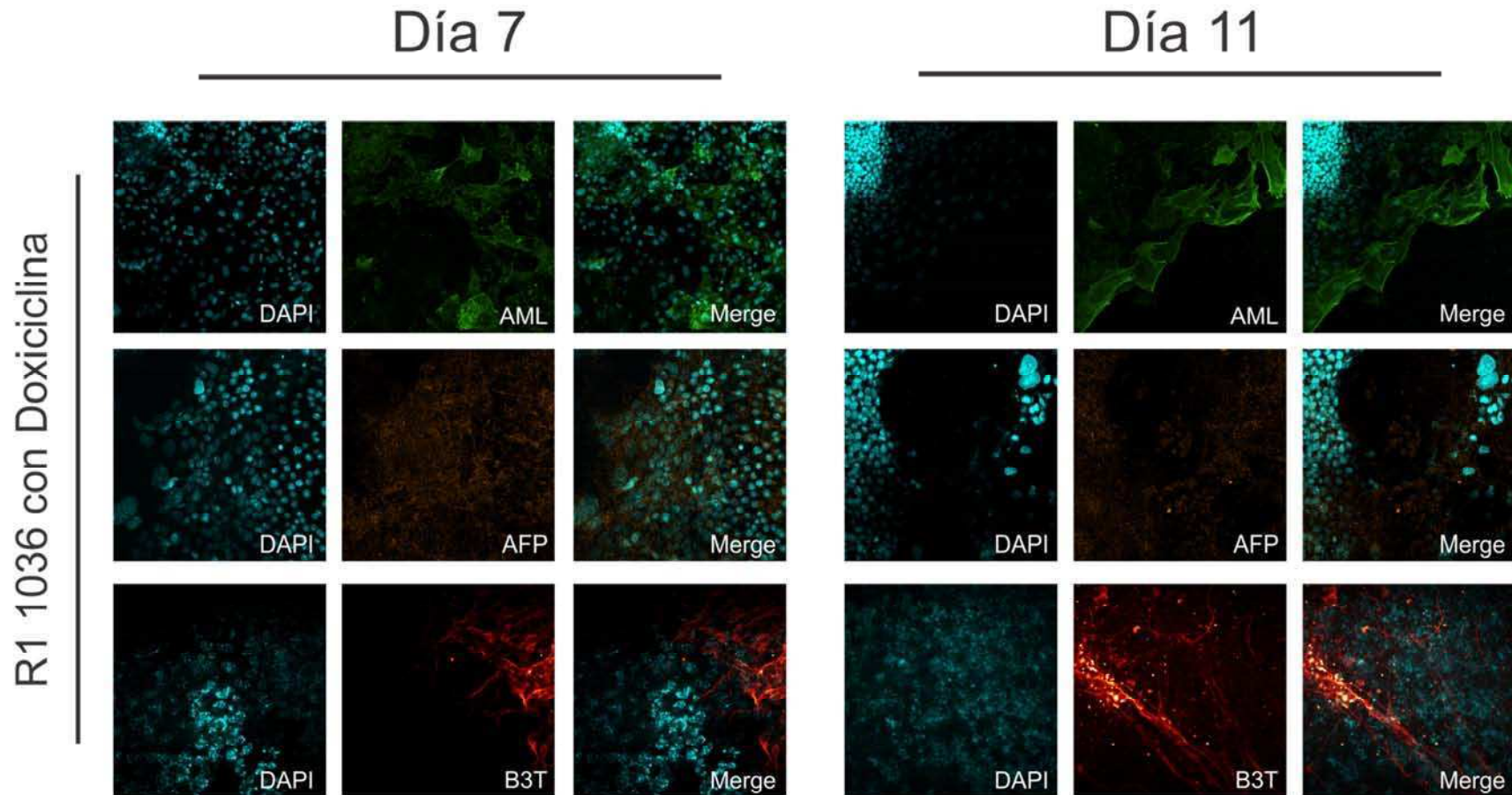


Figura R.20: Inmunofluorescencia confocal de cuerpos embrioides derivados de células R1 1036 diferenciados en presencia de doxiciclina 100 ng/ml. En las fotos se muestran cuerpos embrioides representativos correspondientes al día post-adherencia indicado en el borde superior de la figura. Las células se marcaron con los anticuerpos específicos mencionados en la columna del centro de cada panel. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Aumento: para AML y AFP 400X, para B3T 600X.

4. Regulación de la expresión de Prmt8 por los factores de pluripotencia

En el estudio de CHIP on chip realizado por Kim y colaboradores se reportó que Prmt8 es capaz de reclutar en su promotor los factores de transcripción del estado indiferenciado. Sin embargo, estos datos fueron presentados en el marco de un trabajo del tipo *whole genome* y no fueron validados posteriormente. Es por eso que decidimos intentar profundizar en la regulación del promotor de esta metiltransferasa. Como primera aproximación, realizamos un estudio *in silico* de los sitios putativos de unión de factores de transcripción de pluripotencia a dicho promotor, analizando las primeras 5000 pares de bases río arriba del +1 de transcripción. Para ello, utilizamos la herramienta Matinspector de Genomatix (www.genomatix.de/matinspector.html) y basándonos en las matrices *general core promoter elements* y *vertebrates*. Como se esquematiza en la Tabla R1 y Figura R.21, esta búsqueda arrojó que existen múltiples sitios individuales para Oct4, Nanog y Sox2 y cuatro sitios para los tres factores en conjunto.

Con el propósito de estudiar si los factores mencionados regulan la expresión de Prmt8, utilizamos un abordaje experimental de análisis de expresión en un sistema heterólogo. Elegimos la línea celular normal mamaria HC11, dado que no expresa Prmt8, ni los factores Oct4, Sox2 y Nanog. Por otra parte, estas células tienen alta eficiencia de transfección, lo que nos permitiría transfectar vectores de expresión codificantes de los factores mencionados y evaluar los niveles endógenos de Prmt8. Sin embargo, si bien obtuvimos una primera idea de la regulación que ocurría, los niveles de transfección no resultaron suficientes para sacar conclusiones claras. Por esta razón, decidimos cambiar de abordaje, por uno con mayor eficiencia. Para ello, obtuvimos partículas virales mediante transfección de células empaquetadoras de la línea HEK 293T (ver materiales y métodos). Transdujimos células de la línea HC11 con estas partículas virales conteniendo los transgenes OCT4 (pMXs-hOCT4), NANOG (pMXs-hNANOG) o una combinación de Oct4, Sox2 y Klf4 (STEMCCA). Este último es uno de los vectores que se utilizan de rutina en la reprogramación de células

diferenciadas en iPSC. Como control transdujimos las HC11 con partículas virales que llevan el transgen de la proteína fluorescente verde, GFP (pLKO3G).

Prmt8					
#	Desde	Hasta	Similitud al consenso		Secuencia
Nanog					
1	129	147	0.946		atgcatg AATG tctacatg
2	1732	1750	0.959		atctgtg AATG ttgtcct
3	2193	2211	0.966		cacactt AATG ggctctga
4	2205	2223	0.954		tgtgttg AATG gcacactt
5	3026	3044	0.961		ctgttg AATG ggaaaggg
6	3601	3619	0.960		gggcatg AATG agcagtct
Oct 4					
1	472	490	0.815		ggcctag GCAT accctctt
2	839	857	0.821		ttctct GCAT aaaagcct
3	1321	1339	0.835		ttcagtg GCAT ctcacaac
4	1450	1468	0.867		ggta caGCAT cacagaac
5	2073	2091	0.942		gcag ctGCAT ctgcacac
6	2558	2576	0.961		ctcttt GCAT gagatca
Sitio conjunto Oct4, Nanog, Sox2					
1	717	735	0.794		agggtct GCA agcaattg
2	1111	1129	0.801		agagttt GAC ctgaa ct
3	2979	2997	0.822		tgagttg GCAT agca act
4	3507	3525	0.808		cata actGCAT ctaa aaa

Tabla R.1. Análisis *in silico* del promotor de Prmt8 en busca de secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción Nanog, Oct4 y Sox2. Se analizaron 5 kpb hacia la región 5' del sitio de inicio de la transcripción, tomándose la posición más lejana a dicho sitio como posición "0". Se presentan las posiciones, las secuencias encontradas y el grado de similitud a la secuencia consenso de cada factor. En las secuencias, en mayúscula figuran los sitios fundamentales para la unión de los diferentes factores y en rojo otras secuencias que también resultan importantes para dicha unión.

Promotor Prmt8

-5000 / +500

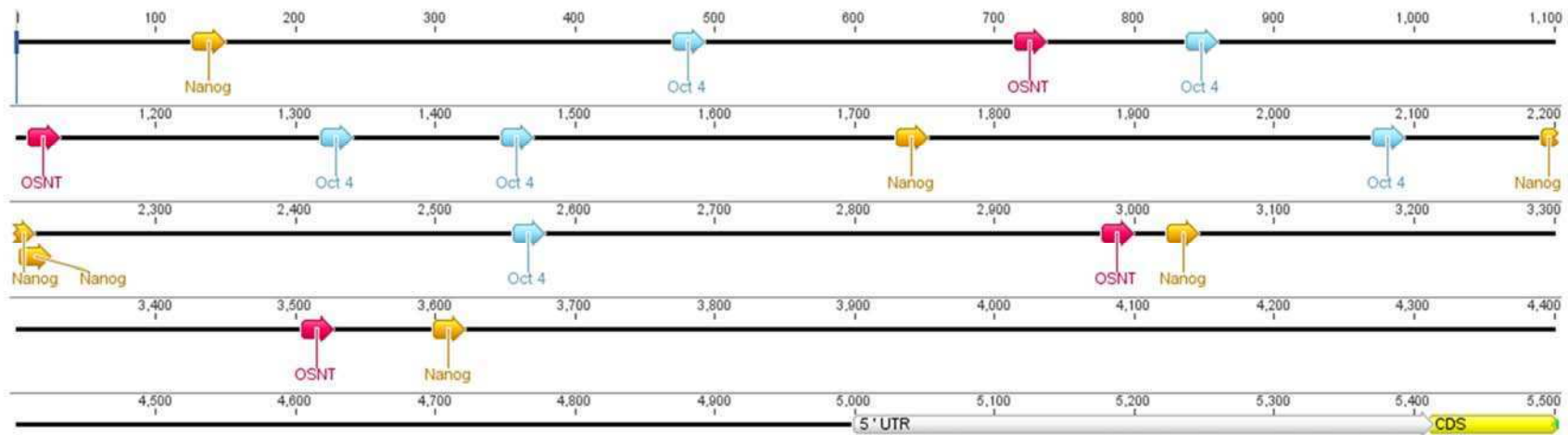


Figura R.21: Representación de la región promotora del gen Prmt8, tomando 5 kpb, el sitio de inicio de la transcripción, la región 5' UTR (5' *Untranslated Region*, región 5' no traducible), y la secuencia codificante (CDS, en amarillo), además de los posibles sitios de unión para los factores estudiados. Para dicho análisis utilizamos el software Geneious Pro.

En la Figura R.22A se muestran los niveles de expresión de los transgenes introducidos, con el fin de confirmar que estos se estén expresando. Al analizar la expresión de Prmt8 observamos que en las células transducidas con Oct4 o Nanog la misma se induce unas 25 veces mientras que la inducción es mucho mayor cuando se utiliza el vector STEMCCA. Como control de que esta inducción es específica de Prmt8 medimos además, los niveles de expresión de Prmt1. Si bien Genomatix predice algunos sitios de unión para los factores de transcripción de pluripotencia en el promotor de Prmt1 según los datos del trabajo de Kim estos factores no se unen al mismo, por lo cual los niveles de transcripción de Prmt1 no deberían cambiar con la introducción de los transgenes. Efectivamente, como muestra la figura R.22B, los niveles de expresión de Prmt1 no varían apreciablemente en las células transducidas.

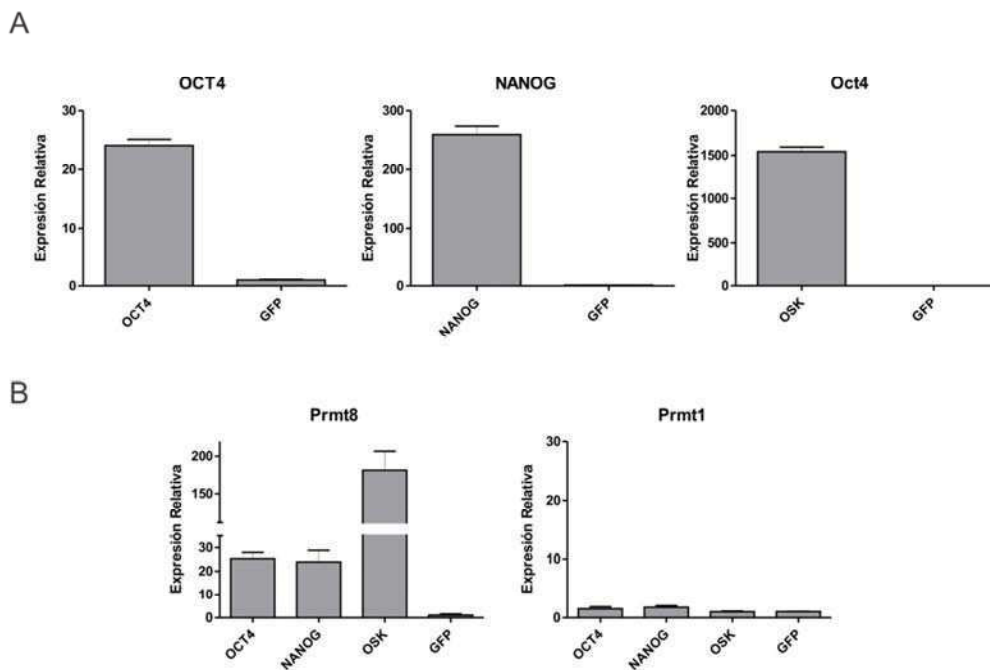


Figura R.22: Expresión de Prmt8 en células HC11. Se transdujeron células HC11 con partículas virales conteniendo vectores de expresión para OCT4, NANOG o una combinación de Oct4, Sox2 y Klf4. A éstas se le midió la expresión de los genes mencionados arriba de cada gráfico individual mediante RT-qPCR. La misma se normalizó a la expresión de GAPDH y se relativizó al control transducido con un vector que codifica para GFP.

Por otra parte, con el propósito de analizar con mayor resolución las regiones del promotor que gobiernan la transcripción de este gen, planeamos realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Para ello, diseñamos oligonucleótidos que flanquean los sitios de unión de los factores de pluripotencia, predichos por el análisis *in silico*. Nos encontramos en la etapa de puesta a punto de esta técnica, que está insumiendo más tiempo del planeado, por lo que no pudimos incluir los resultados en este trabajo.

Discusión

El establecimiento en 1981 de las primeras líneas de células madre embrionarias de ratón produjo un gran avance en el campo de la biología del desarrollo. Estas células posibilitaron el estudio en profundidad de un estadio celular de gran interés como es la pluripotencia. Desde entonces, se lograron grandes avances en el entendimiento de la biología molecular de estas células que culminaron, en el año 2006, con la generación de las células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos de ratón. Por otro lado, en 1998, se estableció por primera vez el cultivo de ESCs humanas. Este hecho despertó gran interés tanto en la comunidad científica como en la sociedad en general debido a las perspectivas de utilizar células para desarrollar terapias de medicina regenerativa. Debido a que las ESCs son derivadas de embriones, la fuente de obtención de hESCs siempre resultó un obstáculo a resolver si lo que se busca es crear una nueva generación de tratamientos. En 2007, el experimento de reprogramación que Yamanaka había realizado con fibroblastos murinos un año antes, se repitió exitosamente en células de origen humano.

Resta todavía comprender mucho sobre la bioquímica y la biología molecular que caracteriza a las células madre pluripotentes, tanto embrionarias como inducidas. En ese sentido, en los últimos años se consolidó a la estructura de la cromatina como un parámetro imprescindible a ser modulado para mantener dichas propiedades. La cromatina de las células pluripotentes posee características únicas que incluyen una conformación abierta y una asociación hiperdinámica de las proteínas que la conforman, lo cual refleja la plasticidad del genoma de las células pluripotentes y contribuye al mantenimiento del estado indiferenciado y la auto-renovación (Mattout & Meshorer, 2010). Distintas metodologías permitieron observar la baja proporción de focos de heterocromatina en el estado indiferenciado, mientras que éstos aumentan a medida que las células se diferencian. Los niveles de metilación en el ADN de células pluripotentes, por otro lado, son mucho menores que en su contraparte diferenciada.

El objetivo principal de este trabajo fue contribuir a la búsqueda de factores relacionados con la estructura de la cromatina que pudieran ser importantes para el mantenimiento de las propiedades básicas de las ESCs. Para ello, nuestra estrategia se

basó en realizar una primera búsqueda de enzimas con conocida actividad remodeladora de la cromatina cuya expresión fuera modulada durante la diferenciación *in vitro*. Como explicamos previamente, elegimos los genes a estudiar basados en datos de unión de factores de transcripción de pluripotencia a los promotores correspondientes. En un principio, supusimos que era probable que distintos grupos de enzimas se regularan en conjunto según su actividad. Por ejemplo, dado que las ESCs contienen un mayor porcentaje de su genoma acetilado, una posibilidad consiste en que muchas acetilasas se sub-expresen durante la diferenciación a la vez que la expresión de las deacetilasas se incremente. Sin embargo, no logramos identificar fenómenos de regulación conjunta sino modulaciones individuales. Los niveles de expresión de la mayoría de las enzimas analizadas que se modularon durante este ensayo disminuyeron, lo cual es compatible con la teoría de una transcripción permisiva en células indiferenciadas. No obstante, podemos destacar casos donde los niveles de RNA mensajeros no cambiaron apreciablemente o inclusive se indujeron con la diferenciación celular. Tal es el caso de GTF3C4 en mESCs y de ciertas HDACs en hESCs. Dos casos muy llamativos en células humanas son los de JARID2 y BMI-1. JARID2 es una demetilasa de histonas para la cual no se conocía regulación ni rol alguno en ESCs al momento de iniciar este trabajo. En 2010, sin embargo, se encontró que JARID es quien recluta el complejo represor Polycomb (PRC) al DNA resultando así, indispensable para la correcta diferenciación celular (Landeira et al., 2010; Pasini et al., 2010). Nosotros encontramos, en este trabajo, que JARID2 se regula negativamente progresiva y consistentemente durante la diferenciación *in vitro*. BMI-1, por otra parte, forma parte integral del PRC-2 y su inducción es necesaria para la diferenciación hacia el linaje hematopoyético. Nuestros resultados indican que este gen se induce fuertemente con la diferenciación, datos avalados por resultados similares recientemente publicados utilizando mESCs como modelo de estudio (Ding et al., 2012).

De este *screening* obtuvimos una serie de genes que pueden cumplir alguna función en el mantenimiento de las propiedades de células embrionarias y que actualmente son objeto de nuevas investigaciones de nuestro grupo de trabajo. En

particular, nos llamó la atención la fuerte modulación en la expresión de una proteína metiltransferasa de argininas, Prmt8. Esta enzima, que hasta el momento solo se encontró presente en el sistema nervioso central del ratón, se expresa también en células indiferenciadas pero sus niveles disminuyen entre un 80 y un 90% al segundo día de diferenciación *in vitro*. Cabe destacar que esta cinética no se observa en la línea de iPSC establecida previamente en nuestro laboratorio, donde la disminución de la expresión de Prmt8 es gradual, pero sí en dos líneas de mESCs derivadas en forma independiente.

Prmt8 es una proteína poco estudiada hasta el momento, con gran homología de secuencia aminoacídica con otra metiltransferasa de expresión ubicua, Prmt1. Las dos enzimas difieren principalmente en su porción amino terminal donde Prmt8 posee 76 aminoácidos más que su gen parálogo. Algunos estudios proponen que esta porción le confiere a Prmt8 un nivel de regulación exclusivo. En particular, el clivaje del residuo n-terminal aumenta, *in vitro*, la actividad de esta enzima. Más aún, esta región de Prmt8 posee un aminoácido pasible de ser modificado por miristoilación, lo cual llevó a suponer que esta enzima se localiza en la membrana plasmática (Sayegh, Webb, Cheng, Bedford, & Clarke, 2007b). Sin embargo, estos ensayos se realizaron con proteínas de fusión que unen la metiltransferasa a GST o GFP, respectivamente. En 2009, el grupo de Kousaka y colaboradores encontró, utilizando un anticuerpo producido por ellos, que la expresión de Prmt8 se restringe al sistema nervioso central y, en particular, al núcleo de neuronas (Kousaka et al., 2009). Aunque se sabe con qué proteínas interactúa, poco se sabe de la función de Prmt8 en el sistema nervioso (Pahlich et al., 2008).

Debido a que, además de las células pluripotentes, esta proteína solo se expresa en neuronas, evaluamos la posibilidad de que Prmt8 sea importante para la diferenciación hacia el linaje neural. En este sentido, hipotetizamos que durante la salida del estado indiferenciado tal vez se necesaria que Prmt8 disminuya pero que posteriormente, cuando las células comienzan a comprometerse con los linajes correspondientes, es posible que esta enzima vuelva a expresarse en células del tejido nervioso a la vez que se mantiene silenciada en otros tipos celulares. Para probar esta

hipótesis, sometimos a ESCs *wild type* a un protocolo de diferenciación dirigido hacia precursores neuronales. Al medir la expresión del mensajero de Prmt8 en distintos días de este protocolo y compararlo con células indiferenciadas encontramos que, contrariamente a lo que creíamos, los niveles de esta enzima no se recuperan. Esta observación puede deberse a múltiples factores. En primer lugar, es posible que el protocolo ensayado no haya alcanzado un número suficiente de células capaces de expresar Prmt8 como para detectar su expresión. Por otro lado, en el trabajo de Kousaka se reporta la aparición de esta enzima en el cerebro a partir del tercer día post-natal (P3) y un máximo de expresión en el día P28. Es probable que el protocolo utilizado no logre alcanzar el grado de diferenciación celular necesario para recuperar los niveles en la expresión de Prmt8. Por último, cabe la posibilidad que los niveles de transcripción de este gen en las neuronas sean mucho menores a los existentes en ESCs, y que exista algún mecanismo de regulación postranscripcional de la traducción que aumente la formación de proteína a partir de los niveles de mensajero existente lo que haría innecesario que la transcripción de este gen vuelva a aumentar.

Con el fin de estudiar la relevancia de Prmt8 en células pluripotentes, decidimos modificar genéticamente células de la línea R1 para que expresen de manera inducible un shRNA contra el RNA mensajero de Prmt8. En este trabajo mostramos que la línea R1 1036 en presencia del inductor doxiciclina sub-expresa el mensajero de Prmt8 pero no el de Prmt1. Debido a que los anticuerpos comerciales disponibles para Prmt8 reconocen un péptido que es común a ambas enzimas, en este trabajo no pudimos confirmar que los niveles de la proteína Prmt8 hayan disminuido significativamente. Aunque realizamos un análisis de inmunofluorescencia en células 1036 cultivadas con y sin doxiciclina utilizando un anticuerpo contra Prmt8 no logramos observar diferencias de intensidad o localización en la marca. Más aun, es probable que lo que estemos detectando con este anticuerpo es Prmt1 y no Prmt8 debido a que se encuentra reportado que los niveles de la primera son muy superiores a los de la segunda. Por otro lado, observamos que luego de la inducción el shRNA, las colonias de la línea 1036 son más grandes, simétricas y refringentes que las colonias de células de la misma línea no tratadas con doxiciclina. Más aún, estas células parecen

crecer más rápido teniendo que ser repicadas más frecuentemente. Esto no ocurre en la línea R1 parental, donde independientemente de la presencia de doxiciclina en el medio, las células poseen la misma morfología y aparentemente igual tasa de duplicación. En este momento nos encontramos analizando si las células que sub-expresan Prmt8 proliferan más que las que expresan esta enzima normalmente.

Las células de la línea 1036 cultivadas durante 48 horas con doxiciclina no parecen presentar diferencias de expresión de marcadores típicos del estado indiferenciado como Oct4, SSEA-1 o Nanog. Sin embargo, sí detectamos una leve diferencia de localización del marcador Nanog en las células que sub-expresan Prmt8. Se encuentra reportado que las células de mESCs son heterogéneas en cuanto a sus niveles de Nanog (Kalmar et al., 2009; Singh et al., 2007). Utilizando microscopía confocal no logramos observar estas diferencias de expresión pero sí se aprecia que en las células de la periferia de la colonia, Nanog se encuentra predominantemente citoplasmático, mientras que en el centro de la colonia se encuentra mayormente nuclear. No obstante, notamos que en las células tratadas con doxiciclina esta heterogeneidad en la localización de la marca disminuye, encontrándose mayor número de células con Nanog predominantemente nuclear independientemente de su posición en la colonia. Este fenómeno podría explicar las diferencias morfológicas que notamos siempre que se induce el shRNA, produciendo colonias de mejor aspecto debido a que todas sus células se encuentran en un estadio indiferenciado similar, probablemente determinado por la homogeneidad en los niveles y localización subcelular de Nanog.

Luego de estudiar la influencia de Prmt8 en la auto-renovación de las mESCs, continuamos analizando si la disminución en los niveles de esta proteína tiene algún efecto sobre la capacidad de diferenciarse de las células embrionarias. Para ello, sometimos a células 1036 cultivadas o no en presencia de doxiciclina a un protocolo de diferenciación *in vitro* no dirigido y analizamos la presencia y localización de diversos marcadores de diferenciación, mediante microscopía confocal. Al analizar el marcador de endodermo alfa-fetoproteína no observamos diferencia alguna entre tratamientos. Cabe destacar que la presencia de este marcador, en conjunto con la presencia de

actina de músculo liso, marcador de mesodermo, y de beta III- tubulina, marcador de ectodermo, en las muestras de la línea R1 1036 indica que esta línea tiene el potencial de diferenciarse a células derivadas de las tres capas germinales, al menos *in vitro*. Observamos que los cuerpos embrioides de día 7 proveniente de células 1036 a las cuales no se les indujo el shRNA, presentan la marca clásica del marcador AML. Esta marca en forma de cúmulos deslocalizados es la que observamos habitualmente cuando se diferencian *in vitro* ESCs *wild type*. Sin embargo, a día 11 los cuerpos embrioides de este tratamiento comienzan a presentar un patrón de tinción completamente distinto, exclusivo del citoplasma y en forma de fibras alargadas en algunas células de la periferia de los cuerpos embrioides, aunque además retienen la marcación original. Por otro lado, los cuerpos embrioides de día 7 derivados de células 1036 tratadas con doxiciclina presentan una marca más conspicua y en forma de cúmulos de AML en el centro, pero a ese tiempo, ya se ven células con la marca en forma de fibras en los bordes de los mismos. A día 11 prácticamente todos los cuerpos presentaron un borde de células marcadas de esta forma y muy pocos de ellos la marca anterior. Algo similar se observa con el marcador B3T, el cuál se expresa exclusivamente en neuronas luego de que las neuritas se diferencian en dendritas y axones. En los cuerpos de la línea 1036 sin doxiciclina observamos una marca tenue en día 7 que se incrementa al día 11. Sin embargo, esta marca no presenta una localización precisa. En contraste, los cuerpos derivados en presencia de doxiciclina presentan, desde el día 7, una marca definida que se asemeja a la fibras axonales. Esto es llamativo, dado que dichos cuerpos embrioides son deficientes en Prmt8 cuya expresión en el tejido adulto está, precisamente, restringida a neuronas.

El protocolo de diferenciación mediante la formación de cuerpos embrioides es, como dijimos anteriormente, no dirigido. El estado indiferenciado *in vitro* es un artificio creado y mantenido por los investigadores, que no tiene su correlato en el mundo natural. En el animal, durante el desarrollo, solo se pueden encontrar células pluripotentes en el macizo celular interno del blastocisto durante un breve período de tiempo. Lo que se intenta con el protocolo de *hanging drop* es liberar a la célula de las señales que las mantienen “congeladas” en estado indiferenciado, y proveerles una

batería de estímulos no específicos para que comiencen su camino hacia la diferenciación. Sin embargo, al no haber en este protocolo un estímulo específico que las conduzca hacia un tipo celular determinado, el linaje de destino de las células depende exclusivamente del balance entre la estocasticidad de expresión de factores de transcripción, el nicho que la circunda y su estado epigenético. Es por eso que, utilizando este protocolo, resulta difícil saber si al final del mismo hemos obtenido un tipo celular determinado, completamente diferenciado, y en qué proporciones. No obstante, las células genéticamente modificadas utilizadas en este trabajo parecen diferenciarse hacia tipos celulares que no se alcanzaban con las células parentales. No podemos descartar que esto sea un artificio de la introducción del transgen en sí, pero hay dos hechos que nos apoyan en nuestra hipótesis. En primer lugar, la línea celular 1036 proviene de un *pool* de células y no de un clon, lo cual mitiga la posibilidad que al insertarse el shRNA haya interrumpido un elemento génico que influya en las propiedades de la línea. Segundo, las células mantenidas y diferenciadas en presencia de doxiciclina parecerían alcanzar dichos tipos celulares en cuestión más rápidamente que las células control. Por último, creemos que el hecho de que los cuerpos embrioides 1036 sin doxiciclina terminen presentando la marca de AML que explicamos anteriormente se puede deber a cierto *leaking* del sistema inducible Tet-On, debido a que para un óptimo control de este sistema, deberíamos utilizar SFB libre de tetraciclina.

Finalmente, decidimos estudiar si el gen *Prmt8* es regulado por los factores de transcripción de pluripotencia. Como mencionamos anteriormente, el trabajo de Kim y colaboradores provee datos de la unión de estos factores de transcripción a sitios de todo el genoma (Kim et al., 2008). En dicho trabajo, se encontró que *Nanog* se une a más de 1200 promotores, *Oct4* a más de 780 y *Sox2* a 819. Además de estos tres factores de transcripción existen otros considerados importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado. *Dax1*, *Nac1*, *Klf4*, *Myc*, *Zfp281* y *Rex1* son otros factores que se expresan en ESCs y que fueron incluidos en ese análisis. Según ese trabajo, el promotor de *Prmt8* es capaz de reclutar 6 de los 9 factores de transcripción

estudiados, siendo parte de un grupo de 111 genes que unen esa cantidad de factores y constituyendo, así, uno de los 200 genes putativamente más regulados por los mismos. Aquí nosotros encontramos, además, que el promotor de esta enzima posee más de 20 sitios de unión predichos para factores de transcripción de la pluripotencia, de los cuales 9 corresponden a Oct4, 6 a Nanog, 1 a Sox2 y 4 a una secuencia de unión compuesta para estos tres más Tcf3 y Sall4. Debido a que el trabajo de Kim y colaboradores no estudia si la unión de dichos factores efectivamente modula la transcripción de Prmt8, en este trabajo intentamos analizar la actividad de su promotor en un sistema heterólogo que no expresa Oct4, Sox2, Nanog ni la metiltransferasa. Los resultados de dicho experimento nos permitieron concluir que tanto Oct4 y Nanog individualmente como una combinación de Oct4, Sox2 y Klf4 son capaces de inducir la expresión de Prmt8 en las células de epitelio normal mamario de ratón HC11. Sin embargo, se observa que los niveles de transcripción de Prmt8 aumentan más cuando se introduce la combinación de factores que cuando Oct4 o Nanog se introducen individualmente. Como mencionamos previamente, en muy pocos casos la introducción y expresión forzada de estos factores alcanzó para activar la expresión endógena de los mismos. Este hecho no nos sorprendió dado que durante la reprogramación de fibroblastos, los niveles de Oct4, Sox2 y Nanog endógenos tardan varios días en inducirse. Si bien este experimento no nos permite concluir sobre cuáles de los factores de transcripción gobiernan la expresión de Prmt8 y en qué medida lo hacen, sí insinúan que al menos Oct4 y Nanog inducen su transcripción. Para un estudio más detallado de los elementos regulatorios del promotor involucrados en la regulación, planeamos realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina y construcciones reporteras con regiones del promotor de Prmt8 dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa. Planeamos cotransfectar estas construcciones en un sistema heterólogo junto con los vectores codificantes de los factores de transcripción utilizados en este trabajo.

Los resultados mostrados en este trabajo de tesis muestran que Prmt8 posee altos niveles de transcripción en ESCs y sugieren que éstos son producto de la actividad

regulatoria de factores de transcripción típicos del estado indiferenciado como Oct4, Sox2 y Nanog. Además estos niveles transcripcionales disminuyen considerable y sostenidamente durante la diferenciación de estas células mediante un protocolo no dirigido. La diferenciación dirigida de ESCs hacia el linaje neural no logra revertir esta disminución, al menos en los días ensayados. Por otro lado, el silenciamiento de Prmt8 en una línea de mESCs no tiene efectos aparentes sobre la expresión de genes marcadores del estado indiferenciado pero sí sobre la morfología de estas células, las cuales originan colonias más grandes, simétricas y refringentes. Por último, hemos probado que las células que sub-expresan la metiltransferasa son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia células derivados de las tres capas germinales pero que, además, la ausencia de Prmt8 parecería favorecer la aparición de un tipo celular de origen mesodérmico. En conjunto, estas evidencias proponen que Prmt8 podría tener algún rol en la determinación del destino celular más que sobre el mantenimiento del estado indiferenciado. Aún resta realizar ensayos que permitan ahondar en el mecanismo por el cual esta enzima podría ejercer su función y confirmar la hipótesis propuesta.

Bibliografía

- Ahmed, K., Dehghani, H., Rugg-Gunn, P., Fussner, E., Rossant, J., & Bazett-Jones, D. P. (2010). Global Chromatin Architecture Reflects Pluripotency and Lineage Commitment in the Early Mouse Embryo. (A. Imhof, Ed.) *PLoS ONE*, *5*(5), 13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20479880>
- Andersson, M. K., Ståhlberg, A., Arvidsson, Y., Olofsson, A., Semb, H., Stenman, G., Nilsson, O., et al. (2008). The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC cell biology*, *9*, 37. doi:10.1186/1471-2121-9-37
- Andrulis, E. D., Neiman, A. M., Zappulla, D. C., & Sternglanz, R. (1998). Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*, *394*(6693), 592–5. doi:10.1038/29100
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell*, *33*(1), 1–13. doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013
- Bedford, M. T., & Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular Cell*, *18*(3), 263–72. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.003
- Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, *128*(4), 669–81. doi:10.1016/j.cell.2007.01.033
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, *125*(2), 315–26. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041
- Boyer, L. a, Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947–56. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020
- Boyer, L. a, Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. a, Lee, T. I., Levine, S. S., et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, *441*(7091), 349–53. doi:10.1038/nature04733
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., & Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, *210*(1), 30–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364425>
- Callihan, P., Mumaw, J., Machacek, D. W., Stice, S. L., & Hooks, S. B. (2011). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation by G protein coupled receptors. *Pharmacology therapeutics*, *129*(3), 290–306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073897>
- Chamberlain, S. J., Yee, D., & Magnuson, T. (2008). Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cells*, *26*(6), 1496–1505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403752>

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, *113*(5), 643–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787505>
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., & Li, E. (2003). Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(16), 5594–5605. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/23/16/5594.short>
- Cycle, C., Bioscience, L., Institutes, N., Wiederschain, D., & Ave, M. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation ND OS NO ST ND ES OS ST. *Cell Cycle*, (February), 498–504.
- Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic Treatments for Cognitive Impairments. *Neuropsychopharmacology*, *37*(1), 1–14. doi:10.1038/npp.2011.85
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., & Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development*, *22*(7), 832–853. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ding, X., Lin, Q., Ensenat-Waser, R., Rose-John, S., & Zenke, M. (2012). Polycomb group protein Bmi1 promotes hematopoietic cell development from embryonic stem cells. *Stem cells and development*, *21*(1), 121–32. doi:10.1089/scd.2010.0539
- Efroni, S., Dutttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoepfner, D. J., Dash, C., Bazett-Jones, D. P., et al. (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell stem cell*, *2*(5), 437–47. doi:10.1016/j.stem.2008.03.021
- Endoh, M., Endo, T. a, Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A. P., et al. (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development (Cambridge, England)*, *135*(8), 1513–24. doi:10.1242/dev.014340
- Epsztejn-Litman, S., Feldman, N., Abu-Remaileh, M., Shufaro, Y., Gerson, A., Ueda, J., Deplus, R., et al. (2008). De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(11), 1176–1183. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2581722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Evans, A. L., Faial, T., Gilchrist, M. J., Down, T., Vallier, L., Pedersen, R. a, Wardle, F. C., et al. (2012). Genomic targets of Brachyury (T) in differentiating mouse embryonic stem cells. *PloS one*, *7*(3), e33346. doi:10.1371/journal.pone.0033346

- Evans, M. K. M. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7242681>
- Fazio, T. G., Huff, J. T., & Panning, B. (2008). An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell*, 134(1), 162–74. doi:10.1016/j.cell.2008.05.031
- Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448–453. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540920>
- Gan, Q., Yoshida, T., McDonald, O. G., & Owens, G. K. (2007). Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(1), 2–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023513>
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948–951. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18463634>
- Hawkins, R. D., Hon, G. C., Lee, L. K., Ngo, Q., Lister, R., Pelizzola, M., Edsall, L. E., et al. (2010). Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell stem cell*, 6(5), 479–491. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2867844&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Henriksen, J. R., Løkke, C., Hammerø, M., Geerts, D., Versteeg, R., Flaegstad, T., & Einvik, C. (2007). Comparison of RNAi efficiency mediated by tetracycline-responsive H1 and U6 promoter variants in mammalian cell lines. *Nucleic acids research*, 35(9), e67. doi:10.1093/nar/gkm193
- Hiyama, E., & Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*, 96(7), 1020–4. doi:10.1038/sj.bjc.6603671
- Ho, L., Ronan, J. L., Wu, J., Staahl, B. T., Chen, L., Kuo, A., Lessard, J., et al. (2008). An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency BIOLOGY.
- Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2002). Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(6), 741–748. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473349>
- Hosen, N., Yamane, T., Muijtjens, M., Pham, K., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2007). Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(7), 1635–44. doi:10.1634/stemcells.2006-0229

- Humphrey, R., Beattie, G., & Lopez, A. (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem ...*, (Clc), 522–530. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.22-4-522/full>
- Hung, C.-M., & Li, C. (2004). Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians. *Gene*, 340(2), 179–187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475159>
- James, D., Levine, A. J., Besser, D., & Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 132(6), 1273–82. doi:10.1242/dev.01706
- Jirmanova, L., Afanassieff, M., Gobert-Gosse, S., Markossian, S., & Savatier, P. (2002). Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*, 21(36), 5515–5528. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165850>
- Kalmar, T., Lim, C., Hayward, P., Muñoz-Descalzo, S., Nichols, J., Garcia-Ojalvo, J., & Martinez Arias, A. (2009). Regulated Fluctuations in Nanog Expression Mediate Cell Fate Decisions in Embryonic Stem Cells. (M. A. Goodell, Ed.) *PLoS Biology*, 7(7), 16. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2700273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kielman, M. F., Rindapää, M., Gaspar, C., Van Poppel, N., Breukel, C., Van Leeuwen, S., Taketo, M. M., et al. (2002). Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nature Genetics*, 32(4), 594–605. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426568>
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., & Orkin, S. H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, 132(6), 1049–61. doi:10.1016/j.cell.2008.02.039
- Kousaka, a, Mori, Y., Koyama, Y., Taneda, T., Miyata, S., & Tohyama, M. (2009). The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS. *Neuroscience*, 163(4), 1146–57. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.06.061
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(5), 389–98. doi:10.1263/jbb.103.389
- Landeira, D., Sauer, S., Poot, R., Dvorkina, M., Mazzarella, L., Jørgensen, H. F., Pereira, C. F., et al. (2010). Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nature cell biology*, 12(6), 618–24. doi:10.1038/ncb2065
- Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., & Bedford, M. T. (2005). PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry*, 280(38), 32890–6. doi:10.1074/jbc.M506944200

- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., et al. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, *125*(2), 301–313. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/7048/>
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics*, *38*(4), 431–40. doi:10.1038/ng1760
- Losino, N., Luzzani, C., Solari, C., Boffi, J., Tisserand, M. L., Sevlever, G., Baraňao, L., et al. (2011). Maintenance of murine embryonic stem cells' self-renewal and pluripotency with increase in proliferation rate by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Stem Cells and Development*, *20*(8), 1439–1449. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21126164>
- Luzzani, C., Solari, C., Losino, N., Ariel, W., Romorini, L., Bluguermann, C., Sevlever, G., et al. (2011). Modulation of chromatin modifying factors' gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *410*(4), 816–22. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.070
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology* :, *78*(12), 7634–7638.
- Martino, G., & Pluchino, S. (2007). Neural stem cells: guardians of the brain. *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762897>
- Maserati, M., Walentuk, M., Dai, X., Holston, O., Adams, D., & Mager, J. (2011). Wdr74 Is Required for Blastocyst Formation in the Mouse. (J. V Schmidt, Ed.) *PLoS ONE*, *6*(7), 9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3143152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mattout, A., & Meshorer, E. (2010). Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(3), 334–341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226651>
- Methods and Applications Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide*. (n.d.).
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., et al. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., et al. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on

- the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814708>
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)*, 134(4), 635–46. doi:10.1242/dev.02787
- Numbers, C. (2010). TRIzol[®] Reagent, (15596026), 18–21.
- Ohtsuka, S., & Dalton, S. (2008). Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Therapy*, 15(2), 74–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989701>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–257. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–7. doi:10.1038/nature05934
- Pahlich, S., Zakaryan, R. P., & Gehring, H. (2008). Identification of proteins interacting with protein arginine methyltransferase 8: the Ewing sarcoma (EWS) protein binds independent of its methylation state. *Proteins*, 72(4), 1125–1137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320585>
- Park, S.-H., Park, S. H., Kook, M.-C., Kim, E.-Y., Park, S., & Lim, J. H. (2004). Ultrastructure of human embryonic stem cells and spontaneous and retinoic acid-induced differentiating cells. *Ultrastructural Pathology*, 28(4), 229–238. Retrieved from <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/01913120490515595>
- Pasini, D., Cloos, P. a C., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J.-P., Johansen, J. V, Bak, M., et al. (2010). JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature*, 464(7286), 306–10. doi:10.1038/nature08788
- Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Michael, J., & Ruley, H. E. (2000). Arginine N - Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development , but Cells Deficient in the Enzyme Are Viable Arginine N-Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development , but Cells Deficient in the En. doi:10.1128/MCB.20.13.4859-4869.2000.Updated
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W. M., Solovei, I., Brugman, W., Gräf, S., et al. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular Cell*, 38(4), 603–613. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513434>
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057–1068. doi:10.1038/nbt.1685

- Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E., & Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, *452*(7184), 243–247. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272965>
- Richards, M., Fong, C.-Y., Chan, W.-K., Wong, P.-C., & Bongso, A. (2002). *Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells*. *Nature Biotechnology* (Vol. 20, pp. 933–936). Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12161760>
- Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, *26*(47), 6715–6723. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934480>
- Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., & Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*, *229*(2), 259–74. doi:10.1002/dvdy.10430
- Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2007a). Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain. *The Journal of biological chemistry*, *282*(50), 36444–53. doi:10.1074/jbc.M704650200
- Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2007b). Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain. *The Journal of biological chemistry*, *282*(50), 36444–53. doi:10.1074/jbc.M704650200
- Shin, K.-J., Wall, E. a, Zavzavadjian, J. R., Santat, L. a, Liu, J., Hwang, J.-I., Rebres, R., et al. (2006). A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(37), 13759–64. doi:10.1073/pnas.0606179103
- Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E., & Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells*, *25*(10), 2534–2542. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615266>
- Sliva, K., & Schnierle, B. S. (2010). Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology journal*, *7*, 248. doi:10.1186/1743-422X-7-248
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, *336*(6200), 688–690. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3143917>
- Solari, C., Losino, N., Luzzani, C., Waisman, A., Bluguermann, C., Questa, M., Sevrer, G., et al. (2011). Induced pluripotent stem cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Biochemical and biophysical research communications*, *410*(2), 252–7. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.126

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Thomson, J. a. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., et al. (2006). Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to cells devoted to molecular cellular mechanisms*, *11*(7), 805–814. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824199>
- Wang, Y.-C., & Li, C. (2012). Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *The FEBS journal*, *279*, 932–945. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08490.x
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, *25*(6), 681–6. doi:10.1038/nbt1310
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., et al. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, *336*(6200), 684–687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3143916>
- Xu, R., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T., & Thomson, J. A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods*, *2*(3), 185–190. doi:10.1038/NMETH744
- Xu, R.-H., Sampsel-Barron, T. L., Gu, F., Root, S., Peck, R. M., Pan, G., Yu, J., et al. (2008). NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell stem cell*, *3*(2), 196–206. doi:10.1016/j.stem.2008.07.001
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, *115*(3), 281–292. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636556>
- Ying, Q.-L., & Smith, A. G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods in Enzymology*, *365*(17), 327–341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696356>

- Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., & Smith, A. (2003). *Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture*. *Nature Biotechnology* (Vol. 21, pp. 183–186). Nature Publishing Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524553>
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., et al. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, *453*(7194), 519–23. doi:10.1038/nature06968
- Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakanuma, Y., Yokota, T., Asashima, M., & Koide, H. (2004). Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(3), 475–481. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03025373>
- Zhou, V. W., Goren, A., & Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics*, *12*(1), 7–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21116306>