



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

# **Regulación y relevancia de genes del sistema de defensa frente a estrés oxidativo en células madre pluripotentes**

**María Victoria Petrone Parcero**

Trabajo de tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Directora: Dra. Alejandra Guberman

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

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

26 de marzo de 2021

Buenos Aires, Argentina

## RESUMEN

### “Regulación y relevancia de genes del sistema de defensa frente a estrés oxidativo en células madre pluripotentes”

Las células madre pueden dividirse preservando su identidad y diferenciarse a distintos tipos celulares. En particular, las células madre embrionarias (CME) derivan del macizo celular interno del blastocisto y son pluripotentes, lo que significa que pueden dar origen a células derivadas de las tres capas germinales. Los factores de transcripción (FT) Oct4, Sox2 y Nanog son esenciales para mantener las propiedades fundamentales de células madre pluripotentes (CMP) dado que inducen genes necesarios para preservar el estado indiferenciado y reprimen otros involucrados en procesos de diferenciación. Las CMP poseen un conjunto de mecanismos que aseguran su estabilidad genómica, evitando la propagación de daños genéticos, crítico en CME, ya que son las células que en el embrión dan lugar al individuo, incluyendo la línea germinal. Parte fundamental de estos mecanismos de protección es el sistema de defensa frente al estrés oxidativo, cuya actividad está exacerbada en CMP y disminuye a lo largo de la diferenciación. Si bien su función y composición están muy estudiadas, aún no se conoce en profundidad la regulación de los genes involucrados en este sistema en CMP.

En base a la hipótesis de que la expresión de algunos componentes de este sistema es regulada por los FT de pluripotencia, nos propusimos estudiar la expresión y regulación de ciertos genes clave. A partir de un primer *screening* detectamos algunos genes cuya transcripción resultó modulada en la diferenciación, tanto en líneas de CME como en CMP inducidas (CMPi), otro modelo de CMP. En esta tesis nos enfocamos en el gen de Sod1, perteneciente a la familia de las Sod, primera línea de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno; el gen de la Glutatión reductasa (Gsr), que cataliza la formación de glutatión reducido, crítico para la resistencia al estrés oxidativo y el mantenimiento de un ambiente reductor; y el gen de Hemo oxigenasa 1 (HO-1), responsable del catabolismo del grupo hemo y con un posible rol en la diferenciación de CMP y la generación de CMPi, además de su conocido efecto citoprotector.

Para estudiar la regulación de estos genes por los FT de CMP utilizamos diferentes abordajes complementarios: analizamos su expresión en CME indiferenciadas y sometidas a diferenciación; mediante análisis bioinformáticos estudiamos la existencia de sitios de unión para estos FT y su interacción en regiones regulatorias de estos genes en CMP; evaluamos el efecto del silenciamiento de los FT mediante *short hairpin RNA*, sobre los niveles de ARNm y finalmente, analizamos el efecto de la expresión de dichos FT en sistemas heterólogos, tanto mediante ensayos de trans-activación sobre construcciones reporteras, como sobre el gen endógeno en una línea celular que expresa de manera inducible el FT Oct4. Encontramos que el gen de Sod1 es inducido por Oct4, Sox2 y Nanog, el de Gsr regulado negativamente por estos tres FT y el de HO-1, reprimido por Oct4.

Por otro lado, se especula que además de su función enzimática clásica, HO-1 podría tener una función nuclear. Dado que detectamos HO-1 en el núcleo de CME y en base a su propuesto rol durante la diferenciación, hipotetizamos que está involucrada en la regulación génica que impacta en la diferenciación. En la última parte de este trabajo comenzamos a explorar este posible rol de HO-1 mediante análisis de su efecto sobre los FT de pluripotencia y sobre la organización dinámica de la cromatina en CME. Nuestros resultados preliminares sugieren que HO-1 podría tener un efecto sobre la distribución subnuclear de la proteína asociada a heterocromatina HP1. Finalmente, comenzamos a generar mediante CRISPR/Cas9, una línea de CME *knockout* para HO-1 que será una valiosa herramienta para dilucidar su función en el contexto de las CM.

En síntesis, en esta tesis encontramos que los FT de pluripotencia regulan la expresión de importantes componentes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo, resaltando una conexión entre la homeostasis redox y la identidad celular. Notablemente, esta relación no pareciera ser consecuencia de un mecanismo general, dado que detectamos genes de este sistema que se inducen y otros que se reprimen por los FT de CMP. Por otra parte, comenzamos a explorar el rol de HO-1 en CME y a generar una herramienta que será valiosa para este estudio.

La posibilidad de disponer en el futuro de terapias basadas en este tipo de células depende en gran medida de su habilidad para mantener un genoma intacto y de la calidad de las células diferenciadas que derivan de éstas. A través del estudio aquí planteado, esperamos poder realizar un aporte a este promisorio campo.

## ABSTRACT

### **“Regulation and relevance of genes involved in the stress oxidative defense system in embryonic stem cells”**

Stem cells have the ability to self-renew while preserving their identity and can also differentiate into specific cell-types. Particularly, embryonic stem cells (ES cells) derive from the blastocyst inner cell mass and are pluripotent stem cells (PS cells), which means that they are able to differentiate into all derivatives of the three primary germ layers. The transcription factors (TFs) Oct4, Sox2 and Nanog, are essential to maintain PS cells fundamental properties by inducing key genes to preserve the pluripotent state and repressing others involved in differentiation processes. PS cells have a set of mechanisms that ensure genomic stability avoiding damage propagation, which is critical to preserve the germ line and embryo development. A fundamental component of these protective mechanisms is the oxidative stress defense system; which activity is enhanced in PS cells and diminishes along the differentiation process. Even though its composition and function are well known, the regulation of the genes involved in the PS cells defense system has been poorly studied.

Based on the hypothesis that the expression of some components of this system is regulated by the pluripotency TFs, we investigated the expression and regulation of some key genes of the oxidative stress system. Over a first screening, we detected some genes modulated along differentiation, both in ES cell lines and in induced PS (iPS) cells, another PS cells model. In this thesis we focused on the Super oxide dismutase 1 (Sod1) gene, member of the Sod family that constitutes the first defense line against reactive oxygen species; the Glutathione-disulfide Reductase (Gsr) gene, which encodes the enzyme that catalyzes GSH formation, a critical molecule for oxidative stress resistance and the maintenance of a reducing environment; the Heme oxygenase 1 (HO-1) gene, responsible of heme catabolism and a with a proposed role during PS cells differentiation and iPS cells generation, beyond its well-known cytoprotective effect.

To study the possible regulation of these genes by the pluripotency TFs, we used different and complementary approaches: we analyzed their expression in undifferentiated ES cells and in ES cells subjected to differentiation protocols; by bioinformatic analysis, we

studied the existence of binding sites for these TFs and their interaction with regulatory regions of these genes in PS cells; we evaluated the effect of their down-regulation by a short hairpin RNA approach, on mRNA levels; and finally, we analyzed the effect of overexpressing these TFs in heterologous systems, both by trans-activation assays on reporter constructions, and on the endogenous gene in a cell line that expresses Oct4 in an inducible manner. We found that Sod1 gene is induced by Oct4, Sox2 and Nanog, Gsr gene is negatively modulated by these TFs and HO-1 gene is repressed by Oct4.

On the other hand, it is speculated that in addition to its classical enzymatic function, HO-1 could have a nuclear function. Given that we have detected HO-1 signal in ES cell's nucleus and based on its proposed role during the differentiation, we hypothesized that it has a role in gene regulation that impacts in differentiation. In the last part of this work, we started to explore this putative nuclear function through analysis of HO-1 effect over pluripotency TFs and over chromatin dynamical organization in ES cells. Our preliminary results suggest that HO-1 might influence the subnuclear distribution of HP1, a protein associated to heterochromatin. Further, using CRISPR/Cas9 technology, we also started to generate a HO-1 knockout ES cell line that would be a valuable tool to elucidate HO-1 function in the context of ES cells.

In summary, in the present work we found that the pluripotency TFs modulate the expression of relevant components of the oxidative stress defense system, highlighting the connection between redox homeostasis and cellular identity. Interestingly, this link does not seem to be consequence of a general mechanism given the fact that we have detected genes of this system that are induced and others, repressed by pluripotency TFs. Moreover, we started to explore the HO-1 role in ES cells and to generate a valuable tool for this research.

The possibility of having PS cells-based therapies in the future depends overall in their ability to keep an intact genome and also in the quality of differentiated cells obtained. We hope that our results contribute to this promising field.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>6</b>
<b>PUBLICACIONES Y FINANCIAMIENTO</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>Células madre</b>	<b>12</b>
Origen y clasificación de las células madre	12
Bases moleculares del mantenimiento del estado indiferenciado y la pluripotencia	16
Niveles de regulación génica	21
<b>Sistema de defensa frente al estrés oxidativo</b>	<b>27</b>
Especies reactivas del oxígeno en células madre	27
Defensa frente al estrés oxidativo en CMP	30
Superóxido dismutasa 1	31
Glutación reductasa	33
Hemo-oxigenasa	35
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>Parte I: Sod1</b>	<b>41</b>
Expresión del gen de Sod1 en CME	41
Análisis de la existencia de sitios de unión putativos para los FT de CMP y de su interacción en la región promotora del gen de Sod1	43
Efecto de los FT de CMP sobre la actividad de la región promotora de Sod1	45
Efecto de la disminución de la expresión de los FT de CMP sobre la expresión de Sod1	47

<b>Parte II: Gsr</b>	<b>50</b>
Expresión del gen de Gsr en CME	50
Análisis de la existencia de sitios de unión putativos para los FT de CMP y de su interacción en la región promotora del gen de Gsr	51
Modulación del gen de Gsr en condición de silenciamiento de los FT de pluripotencia	54
<b>Parte III: HO-1</b>	<b>56</b>
1. Caracterización de la expresión y estudio de la regulación de HO-1 en CME	57
Expresión de HO-1 en CME en estado indiferenciado y durante la diferenciación	57
Análisis de la existencia de sitios de unión putativos para los FT de CMP en la región promotora del gen de HO-1	60
Modulación de HO-1 en condiciones de silenciamiento de los FT de pluripotencia	61
Análisis de la interacción de los FT de CMP en la región promotora del gen de HO-1	62
Efecto de los FT de CMP sobre la actividad de la región promotora de HO-1	63
Efecto de la inducción de la expresión de Oct4 en un sistema heterólogo sobre la expresión de HO-1	64
1. Exploración del rol nuclear de HO-1	67
Efecto del aumento de HO-1 sobre los niveles de expresión de los FT de pluripotencia	68
<i>Efecto de la sobreexpresión de HO-1 sobre los niveles de los FT de pluripotencia mediante inducción farmacológica</i>	68
<i>Efecto de la sobreexpresión de HO-1 mediante transfección transitoria sobre los niveles de los FT de pluripotencia</i>	71
Efecto del aumento de HO-1 sobre la arquitectura de la cromatina	74
Generación de la línea de CME HO-1 knockout	77
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>97</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>99</b>
<b>Cultivo celular</b>	<b>99</b>
Congelamiento y descongelamiento de células	100
Extracción de ADN genómico para la detección de Micoplasma por PCR	101
Transfección de líneas celulares con PEI	102
<b>Técnicas para análisis de la expresión génica</b>	<b>103</b>
Extracción y cuantificación de ARN	103
Retrotranscripción	104
RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	104
Lista de <i>primers</i> utilizados	106



<b>Detección de proteínas</b>	<b>107</b>
Inmunofluorescencia	107
Western Blot	107
Anticuerpos	108
<b>Análisis de toxicidad del tratamiento con hemina</b>	<b>108</b>
Ensayo de MTT	108
Tinción con Cristal Violeta	109
<b>Construcción del vector pSod1-luc</b>	<b>109</b>
Descripción del vector pGL3-Basic	110
Diseño de <i>primers</i> para clonado del promotor de Sod1	110
PCR para obtención de los fragmentos del promotor	111
Clonado en el vector pGL3-Basic	112
<b>Generación de la línea de CME <i>knockout</i> para HO-1 tecnología CRISPR/Cas9</b>	<b>114</b>
<b>Estudio de la regulación génica por los factores de transcripción de CMP</b>	<b>115</b>
Modulación de los FT en CME	115
Modulación por inducción de diferenciación	115
Silenciamiento mediante el uso de short hairpin RNA	115
Análisis del efecto de la expresión ectópica de los FT en un sistema heterólogo sobre construcciones reporteras	116
<b>Microscopía confocal</b>	<b>117</b>
Preparación de las células para microscopía confocal	117
Obtención de imágenes por microscopía confocal	117
Análisis de imágenes	117
<b>Análisis Estadístico</b>	<b>118</b>
<b>Técnicas microbiológicas</b>	<b>118</b>
Preparación de bacterias ultracompetentes	118
Transformación de bacterias: método de golpe de calor ( <i>Heat Shock</i> )	119
Purificación de ADN plasmídico en escala pequeña (Miniprep)	119
Purificación de ADN plasmídico a media escala (Midiprep)	119
<b>Soluciones y medios de cultivo</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>122</b>

## PUBLICACIONES Y FINANCIAMIENTO

Los resultados de este trabajo de Tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

“Superoxide dismutase 1 expression is modulated by the core pluripotency transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog in embryonic stem cells.” Claudia Solari, María Victoria Petrone, Camila Vazquez Echegaray, María Soledad Cosentino, Ariel Waismana, Marcos Francia, Lino Barañao, Santiago Miriuka, Alejandra Guberman. *Mech Dev.* 2018; 154:116-121. doi:10.1016/j.mod.2018.06.004.

“The pluripotency transcription factor Nanog represses glutathione reductase gene expression in mouse embryonic stem cells.” Claudia Solari, María Victoria Petrone, Ayelén Toro, Camila Vazquez Echegaray, María Soledad Cosentino, Ariel Waisman, Marcos Francia, Lino Barañao, Santiago Miriuka, Alejandra Guberman. *BMC Res Notes.* 2019; 12(1). doi:10.1186/s13104-019-4411-0.

Financiamiento:

Universidad de Buenos Aires: UBACYT 20020160100025BA

CONICET: PIP 112 201101 00243

ANPCyT: PICT-2016-0828

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN Complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína Morfogénica del Hueso
BSA	Seroalbúmina Bovina
Cat	Catalasa
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CM	Células Madre
CME	Células Madre Embrionarias
CMPI	Células Madre Pluripotentes Inducidas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNMTs	Metiltransferasa de ADN
dNTPS	desoxi-ribonucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético

FT	Factor de Transcripción
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Agua destilada
H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub>	Agua Milli Q
HO-1	Hemo oxigenasa 1
IF	Inmunofluorescencia
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
LIFR	Receptor de LIF
Luc	Luciferasa
MCI	Macizo Celular Interno
MEF	Fibroblastos Embrionarios Murinos
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
ROS	Especies reactivas del oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
SEM	Error estándar de la media (Standar Error of the Mean)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
UFC	Unidades formadoras de colonias

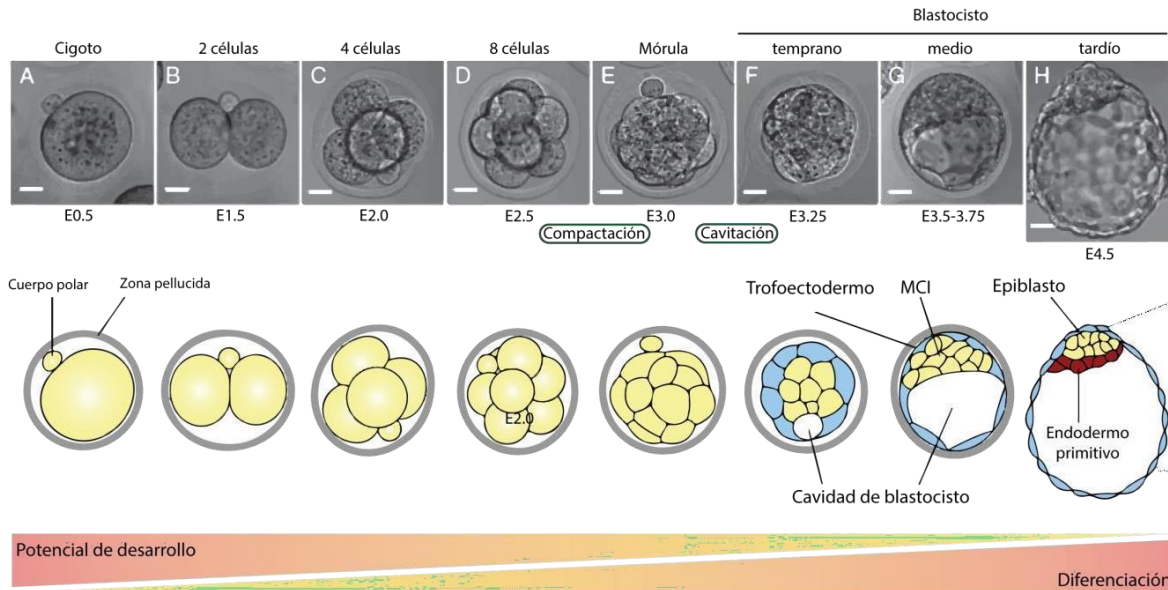
## Células madre

Las células madre poseen dos propiedades fundamentales: la capacidad de propagarse dando lugar a células iguales a la que les dio origen, definida como propiedad de auto-renovación, y por otra parte, pueden diferenciarse dando lugar a células especializadas, denominada capacidad de diferenciación. Existen varios tipos de células madre que se definen en función de su potencial, es decir, la variedad y cantidad de tipos celulares más especializados a los que puede diferenciarse. Particularmente, como describimos más adelante, en este trabajo de tesis nos enfocamos en un tipo de célula madre que posee la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares del organismo, denominadas células madre pluripotentes (CMP), por lo que su propiedad de diferenciación en este caso se denomina pluripotencia. Estas propiedades hacen que las células madre sean particularmente atractivas no sólo en el campo de la biología del desarrollo sino también debido a su posible aplicación en terapias regenerativas.

## Origen y clasificación de las células madre

En mamíferos, la unión entre un oocito y un espermatozoide da origen al cigoto, una célula que por sucesivas divisiones mitóticas da lugar a todas las células del cuerpo. Esta serie de divisiones, denominada clivaje, no aumenta el volumen citoplasmático, sino que genera pequeñas células nucleadas llamadas blastómeros. Hasta la división de ocho células, éstas son **totipotentes** ya que pueden dar lugar a todos los tipos celulares, tanto los embrionarios como los extraembrionarios. Al estadio de entre 12 y 16 blastómeros se lo denomina mórula. Luego, mediante un proceso denominado cavitación, se forma una cavidad, el blastocele, siendo la estructura resultante el blastocisto. En este estadio solamente se encuentran presentes dos tipos de células, aquellas pertenecientes al trofoectoblasto (o trofoectodermo) y aquellas pertenecientes al macizo celular interno (MCI). Las primeras dan origen a los tejidos extraembrionarios, específicamente a la porción fetal de la placenta, mientras que las células

del MCI son las que generan el saco vitelino y al embrión en sí. Este es el primer evento de diferenciación celular en el embrión de mamíferos (figura I.1) [1].



**Figura I.1. Desarrollo embrionario de ratón desde la fecundación hasta el estadio de blastocisto, previo a su implantación.** En la parte superior se muestran imágenes de microscopía de campo claro de distintas etapas del desarrollo embrionario temprano de ratón y los correspondientes días desde la fecundación (E0). Debajo se muestra una representación de dichas imágenes, identificando los distintos tipos celulares. La escala en las imágenes representa 20  $\mu\text{m}$ . Adaptada de Saiz y Plusa [2].

La primera segregación que sufren las células del MCI hace que éste se divida en hipoblasto y epiblasto. Las células del hipoblasto se delaminan desde el MCI hacia el blastocelo, donde dan lugar al endodermo extraembrionario o primitivo, que luego forma el saco vitelino; por otra parte, las células del MCI situadas entre el hipoblasto y el trofoblasto componen el epiblasto. Algunas células del epiblasto dan lugar a la cavidad amniótica, mientras que el resto van a formar parte del epiblasto embrionario. Este último contiene todas las células que van a generar al embrión en sí (figura I.2). Las células del MCI, si bien dan origen a todos los tipos celulares que van a formar a un individuo completo, no pueden diferenciarse a tejido extraembrionario, por lo cual se denominan **pluripotentes**, siendo

capaces de generar células derivadas de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo.

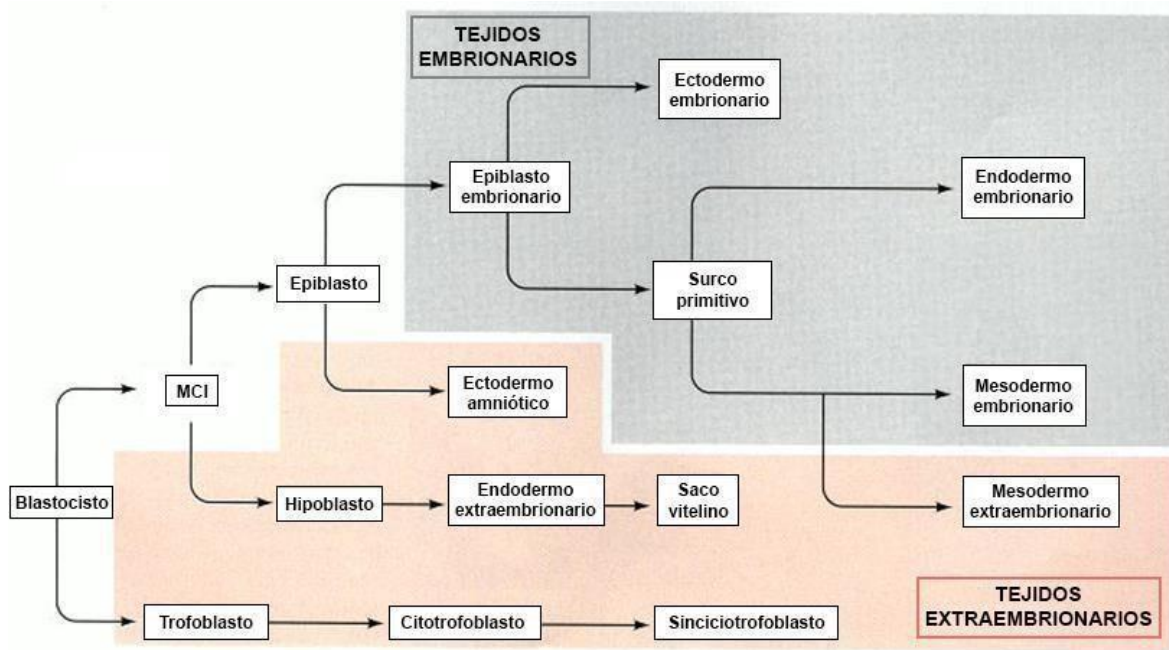
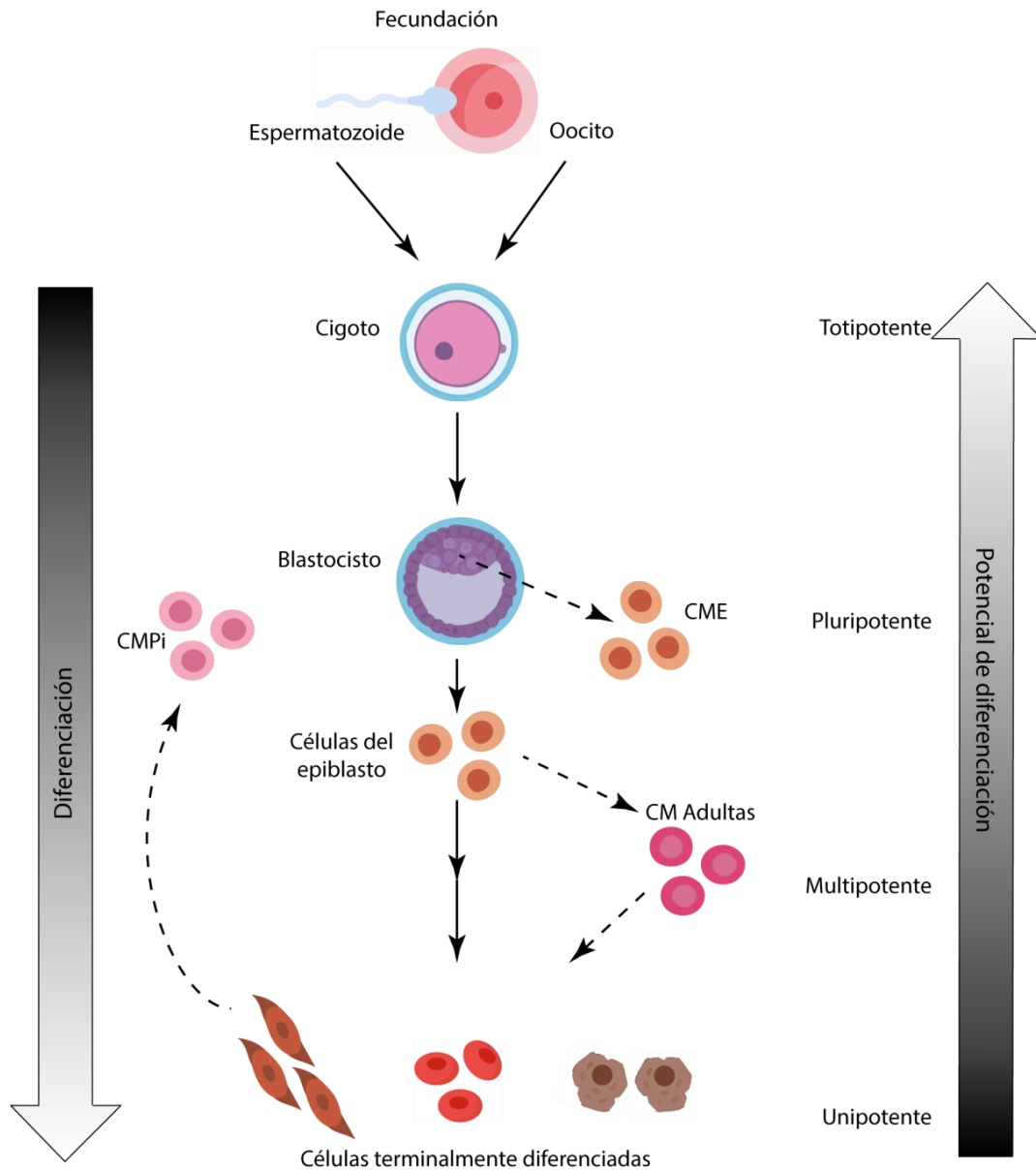


Figura I.2. Esquema de los distintos linajes celulares durante el desarrollo de mamífero. El cigoto totipotente da lugar al blastocisto que va a generar las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo. Adaptada de Gilbert [1].

Avanzado el desarrollo, las células van diferenciándose y toman compromiso con diferentes linajes celulares. El proceso de diferenciación celular y compromiso hacia un determinado linaje 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, los cambios en la bioquímica, estructura y función que resultan en tipos celulares específicos. La diferenciación involucra cambios tanto en la apariencia como en la función. Las células de cada capa embrionaria son **multipotentes** ya que pueden solamente dar origen a células de su propio linaje, es decir, a un número más limitado de tipos celulares. Ejemplos de éstas son

las células madre hematopoyéticas, que dan lugar a las células sanguíneas. Las células que tienen la capacidad de diferenciarse en un único tipo celular se denominan **unipotentes** (figura I.3).



**Figura I.3. Tipos de células madre y su potencial de diferenciación.** Estadios de la diferenciación celular y su potencial de diferenciación durante el desarrollo. Los términos totipotencia, pluripotencia, multipotencia y unipotencia se utilizan para definir el potencial de diferenciación de las células madre. Adaptada de Hochedlinger y Jaenisch [3].



Las células del MCI pueden aislarse y ser cultivadas *in vitro*. A estas células se las llamó células madre embrionarias (CME) y fueron aisladas y cultivadas *in vitro* por primera vez hace ya varias décadas [4], [5]. Las líneas de CME son generadas a partir del MCI de blastocistos pre-implantatorios y fueron derivadas de roedores [5], primates [6] y seres humanos [7], [8].

Las CME pueden ser propagadas indefinidamente en estado indiferenciado, manteniendo la capacidad de diferenciarse a casi todos los tipos celulares ante determinados estímulos. Es por esto mismo que se utilizan como modelo para estudiar el desarrollo embrionario y para dilucidar los mecanismos y las señales que permiten a una célula pluripotente llegar a formar cualquier célula terminalmente diferenciada del organismo.

Las CME representan las CMP más estudiadas debido a las propiedades ya mencionadas anteriormente. Pero, en el año 2006, el grupo de Yamanaka reportó otro tipo de CMP, las células madre pluripotentes inducidas (CMPi), que fueron generadas mediante la desdiferenciación de células somáticas, particularmente fibroblastos de ratón, hacia un estado de pluripotencia [9]. Para lograr esto, mediante la expresión ectópica de genes como Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, se logró inducir los genes endógenos responsables de la pluripotencia logrando una reprogramación celular. Las CMPi son capaces de diferenciarse a células de las tres capas germinales *in vitro* y de formar teratomas, que son tumores en los cuales se encuentran representadas las tres capas germinales, y es una de las metodologías utilizadas para evaluar la pluripotencia *in vivo*. Al año siguiente del desarrollo de las CMPi de ratón, se logró reprogramar fibroblastos adultos humanos [10].

El enorme potencial de las CMP las hace una herramienta invaluable para el desarrollo de modelos de enfermedades, estudio de fármacos y futuras terapias regenerativas. Su estudio es fundamental para su aplicación clínica.

## **Bases moleculares del mantenimiento del estado indiferenciado y la pluripotencia**

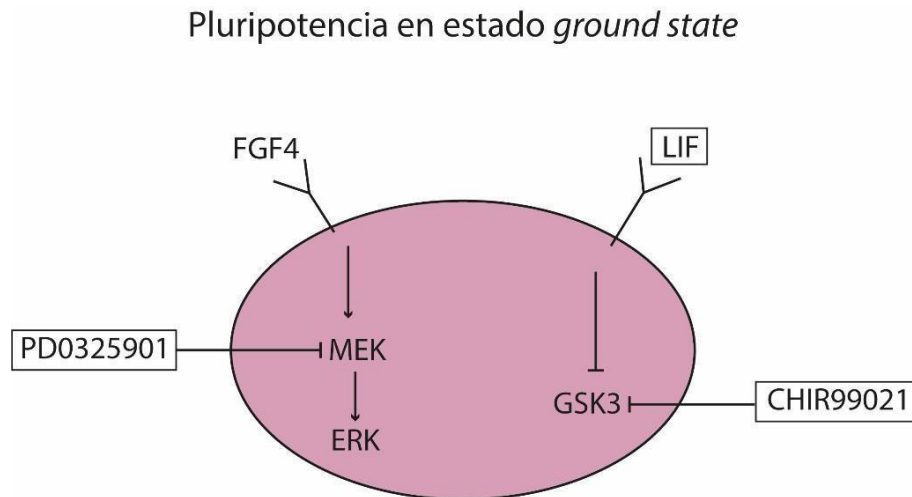
Como ya mencionamos, hace varias décadas que se derivaron por primera vez CME a partir del MCI de blastocistos de ratón y pudo mantenerse la pluripotencia en cultivo celular [4], [5]. Estas células retienen la identidad del epiblasto pre-implantatorio y pueden ser

totalmente reincorporadas al desarrollo normal si se introducen nuevamente en blastocistos [11]. Sin embargo, las CME ya no se pueden derivar del epiblasto post-implantatorio [12]. En cambio, se puede establecer un tipo alternativo de línea de células pluripotentes, denominadas células madre derivadas del epiblasto post-implantatorio (EpiSC) [13], [14], las cuales ya no son capaces de reincorporarse al desarrollo mediante la inyección de un blastocisto. Los diferentes caracteres pluripotentes de las CME y EpiSC y, en consecuencia, del epiblasto anterior y posterior a la implantación, se distinguen por los términos "*naïve*" y "*primed*" [15].

Las primeras CME fueron mantenidas en cultivo sobre fibroblastos (*feeder layer*), sin conocer la identidad de los factores que secretaban estas células y las mantenían en estado indiferenciado. Años más tarde, se descubrió que la citoquina *leukemia inhibitory factor* (LIF), que en el embrión es secretada por el trofoblasto, podía reemplazar a las *feeder layer*, manteniendo las CME en presencia de suero fetal bovino (SFB) en placas pre-tratadas con gelatina [16], [17]. LIF mantiene el estado indiferenciado en parte al inactivar a la enzima *glycogen synthase kinase-3* (GSK3), la cual normalmente reprime la expresión de los FT Nanog y c-Myc, necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado. Por otra parte, se descubrió que el SFB contenía BMP4, otro factor clave para el mantenimiento de la pluripotencia. Esta molécula inhibe la vía de ERK, que se activa por FGF4 y promueve la diferenciación hacia linajes neurales [18]. La condición SFB/LIF permite preservar la pluripotencia de CME en cultivo de una manera más simple que el cultivo en presencia de *feeder layer*. De todos modos, hay que tener en cuenta que las células en estos cultivos son una población heterogénea en términos de expresión de ciertos genes de pluripotencia como Nanog, Stella, Rex1, Esrrb y Klf4 [19], [20].

En los últimos años se encontró que, combinando la inhibición de la vía de MEK/ERK y la de GSK3, podían propagarse CME en ausencia de BMP4 o incluso LIF [21], [22]. Actualmente se utiliza ampliamente este sistema que comprende dos inhibidores selectivos ("2i") que se dirigen a MEK y GSK3 (PD0325921 y CHIR99021, respectivamente). Las CME cultivadas en 2i son en gran medida homogéneas en términos de expresión génica y morfología, especialmente si también se agrega LIF [23]. De esta manera, las CMP cultivadas en estas

condiciones permanecen en un estado *ground state* de pluripotencia, y representan la inmortalización *in vitro* del epiblasto *naïve* del embrión de ratón (figura I.4) [15].



**Figura I.4. Mantenimiento de la pluripotencia en estado *ground state* en cultivo celular.** FGF4 activa de manera autócrina la diferenciación por medio de la vía ERK. El cultivo de CMP en presencia de LIF y 2i (los dos inhibidores, PD0325901 y CHIR99021) mantiene la pluripotencia en estado *ground state* al inhibir las vías de diferenciación de ERK y GSK3. Adaptada de Hirai *et al* [18].

Estas evidencias, entre otras, demuestran que el mantenimiento del estado de pluripotencia resulta de una serie de eventos coordinados en los cuales se activan no sólo vías de señalización que promueven el mantenimiento de la pluripotencia, sino también cascadas que finalizan en la inhibición de la diferenciación.

Las vías de señalización mencionadas terminan definiendo los programas de expresión génica mediante los factores de transcripción (FT) involucrados en el mantenimiento de la identidad celular de las CMP: Oct4, Sox2 y Nanog [24]–[26]. Estos FT conforman el *core* de pluripotencia y actúan en conjunto induciendo genes requeridos para el mantenimiento de la pluripotencia y reprimiendo genes que promueven la diferenciación [27], [28].

El factor de transcripción Nanog fue descubierto por dos importantes grupos simultáneamente en el año 2003 [29], [30]. Este FT es el responsable de la pluripotencia en el

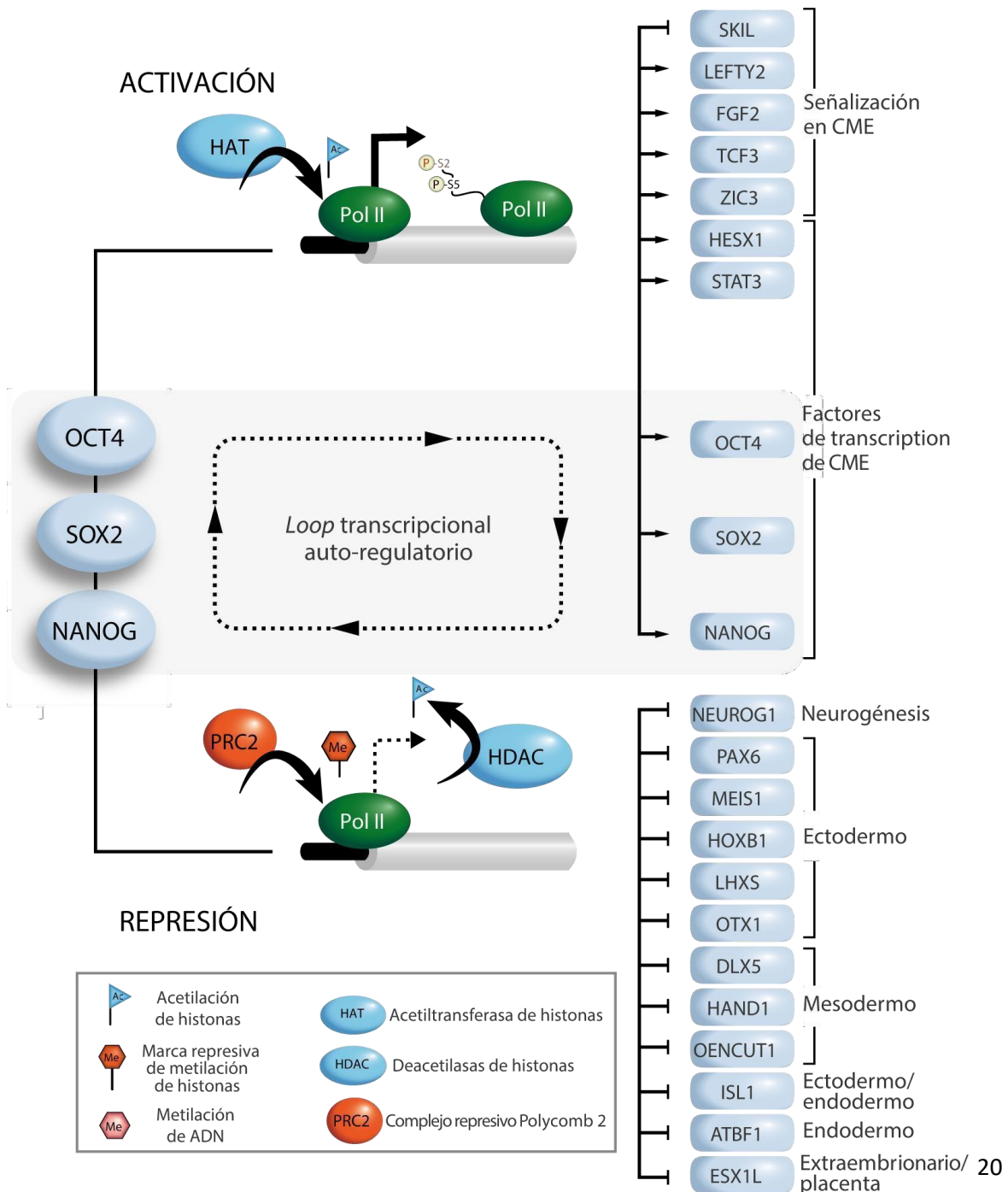
MCI y en las CME, ya que es capaz de mantener la auto-renovación de las CME de una manera independiente de LIF. En el mismo sentido, el MCI no genera células del epiblasto en embriones que no expresan Nanog [29], [30]. Este FT es responsable de la adquisición de la pluripotencia tanto en el embrión en desarrollo como durante la reprogramación [31].

El factor de transcripción Oct4 (*Octamer transcription factor 4*) pertenece a una familia de FT que poseen un dominio llamado POU, responsable de la unión al ADN. En particular, al silenciar Oct4 las CME se diferencian a trofoectodermo, el linaje celular que provee células trofoblásticas para la placenta en desarrollo [32]. Por otro lado, la sobreexpresión de Oct4 en CME genera la diferenciación a una población mezclada de células que expresan marcadores tanto de endodermo como de mesodermo [26]. Esto implica que Oct4 es una molécula regulatoria muy importante en la decisión del destino celular durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Oct4, a su vez, regula transcripcionalmente genes involucrados en múltiples funciones celulares siendo uno de los más estudiados Sox2 (*SRY-type high mobility group box2*), otro de los FT del core de CMP.

En mamíferos, la familia de factores de transcripción Sox comprende aproximadamente veinte miembros que comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado conocido como *high mobility group* (HMG). Estos factores de transcripción han demostrado ser cruciales durante todos los estadios del desarrollo embrionario [33]. Sox2 ha sido el miembro más estudiado de esta familia. Como mencionamos antes, interactúa con Oct4 formando un heterodímero que regula la expresión de genes necesarios para mantener el estado pluripotente. La delección de Sox2 en CME genera la diferenciación hacia el linaje de trofoectodermo, fenotipo celular similar al obtenido con la delección de Oct4 [25]. A su vez, tanto Sox2 como Oct4, resultan esenciales en el desarrollo; la inactivación de uno u otro resulta en letalidad embrionaria durante el estadio pre-implantatorio [34], [35]. Asimismo, estos factores son necesarios para la generación de CMPi como así también para la auto-renovación y el mantenimiento de la pluripotencia en CME.

Estos tres FT, además de controlar en conjunto y con otros FT los genes mencionados, se regulan entre sí y se auto-regulan, formando una red auto-regulada e interconectada que mantiene la identidad de CMP [24].

En la figura I.5 se representan los dos grandes grupos de genes regulados por estos FT. Por un lado se encuentran aquellos genes que son transcritos activamente en CME, entre los que se encuentran factores de transcripción, componentes de vías de transducción de señales y enzimas modificadoras de la cromatina que en conjunto mantienen el estado indiferenciado pluripotente. Por otro lado, el segundo grupo está compuesto por genes relacionados con la diferenciación hacia los distintos linajes, por lo que su expresión es reprimida en el estado indiferenciado y se induce durante la diferenciación celular.

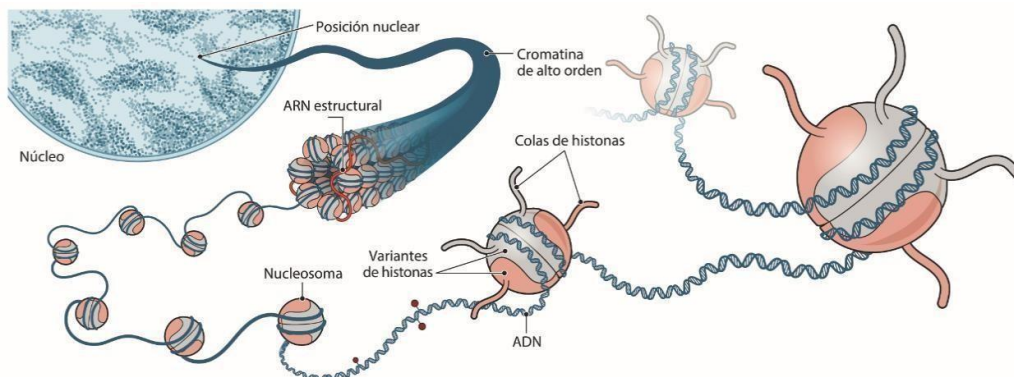


**Figura I.5. Red transcripcional del estado indiferenciado.** Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog forman un nodo transcripcional que mantiene la identidad de CME, activando la transcripción de genes asociados con la auto-renovación y pluripotencia, y reprimido la de aquellos genes involucrados en la diferenciación celular. Estos FT colaboran tanto con activadores como con represores de la cromatina induciendo o inhibiendo la expresión génica. Además, Oct4, Sox2 y Nanog auto-regulan su expresión. Adaptada de Hochedlinger & Jaenisch [36].

## Niveles de regulación génica

Si bien existe una gran variedad de fenotipos celulares, la gran mayoría de las células de un animal comparte el mismo material genético. La complejidad que presentan los animales pluricelulares requiere de una regulación estricta de la expresión génica para dirigir con especificidad el compromiso celular a los distintos linajes durante el desarrollo del embrión. Los programas transcripcionales, la regulación epigenética y las vías de señalización cooperan dentro del contexto genómico de la cromatina controlando el destino celular.

La cromatina es una estructura compleja de ADN, histonas y otros componentes proteicos, que posee distintos niveles de organización. Las histonas forman los nucleosomas, alrededor de los cuales se envuelve el ADN y se consideran los bloques de construcción de la cromatina (figura I.6). Cada nucleosoma consiste en un octámero de histonas, conteniendo dos de cada una de las cuatro histonas clásicas H2A, H2B, H3 y H4. En particular, la regulación epigenética de los genes ocurre en un gran número de niveles, los cuales incluyen la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, el empaquetamiento y rearrreglo de los nucleosomas, las estructuras de cromatina de alto orden y la interacción dinámica entre la cromatina y la lámina nuclear [37], [38].



**Figura 1.6. Organización jerárquica de la cromatina en un núcleo en interfase.** Diversos factores colaboran en la condensación de la cromatina a cada nivel. El conjunto de nucleosomas se pliega en estructuras de alto orden, donde participan ARNs no codificantes estructurales. A la derecha se observa un esquema de un nucleosoma, comprendido por la hebra de ADN envuelta alrededor de un octámero de histonas. Adaptada de Yadav *et al* [37].

La organización de la cromatina dentro del espacio nuclear es un factor determinante en la regulación génica. Los niveles jerárquicos mediante los cuales se organiza la arquitectura genómica controlan la transcripción, modulando la accesibilidad y proximidad de los genes y elementos regulatorios. Por muchos años, la atención fue puesta en el estudio de la expresión génica y las proteínas asociadas a este proceso. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha logrado un giro en este enfoque que logró una nueva perspectiva respecto a la importancia que tiene la cromatina, contemplando su organización y su dinámica, como pilares fundamentales en la regulación de la expresión génica.

Uno de los niveles a los que ocurre la regulación de la expresión génica es a través de elementos regulatorios que se encuentran dispersos en el mismo ADN, dentro de las regiones no codificantes del genoma; éstos son los *enhancers*, *silencers* e *insulators* [39], [40]. Los *enhancers* son regiones de ADN no codificante que aumentan la transcripción de un gen, independientemente de su distancia y orientación relativa al promotor. Estos elementos regulatorios actúan por medio de la unión de diferentes factores de transcripción y cofactores, que interactúan con la ARN polimerasa II promoviendo la transcripción de un gen [40]. Además, los *enhancers* pueden funcionar a distancias variables del promotor al cual regulan, desde unas pocas bases hasta millones de pares de bases de distancia [41]. Los *insulators*, por su parte, son secuencias de ADN que median uniones entre dos sitios usualmente alejados en el genoma, generando un *loop* de interacción mediado por las proteínas CTCF y cohesina. En un nivel mayor de regulación, el núcleo en interfase se organiza en territorios cromosómicos, los cuales presentan posiciones preferenciales dentro del núcleo que dependen de cada tipo celular y que están conservadas entre distintas especies [41]. Estos territorios pueden organizarse en regiones con expresión activa y regiones con expresión reprimida, estas últimas muchas veces encontradas cercanas a la lámina nuclear.

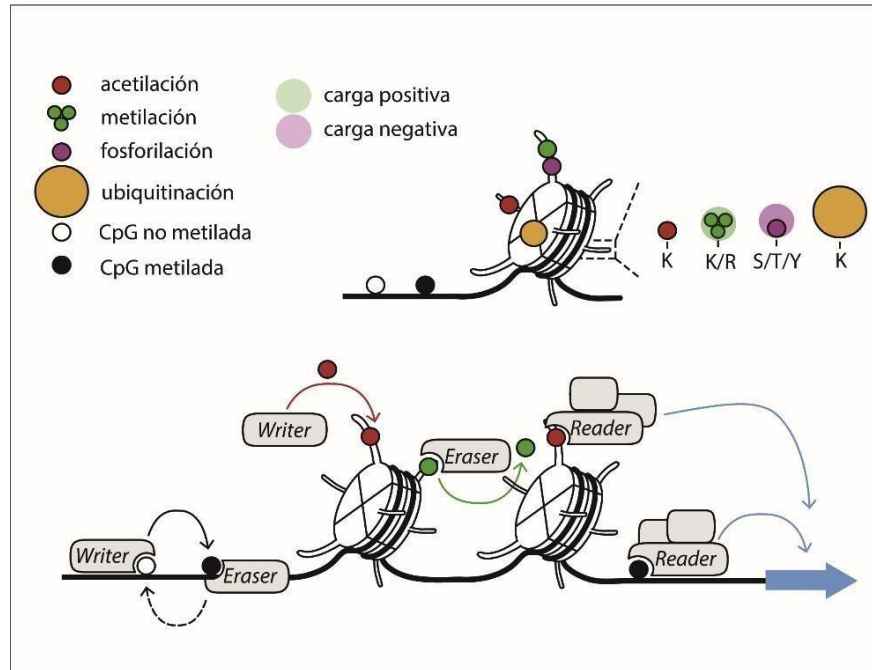
Las alteraciones de la estructura de la cromatina que no afectan a la secuencia genómica se definen como modificaciones epigenéticas. Estos patrones epigenéticos incluyen

la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales (PTM, por su sigla en inglés) de las histonas, también denominadas marcas de histonas, el empaquetamiento y reordenamiento de nucleosomas, las estructuras de cromatina de orden superior y la interacción dinámica entre la cromatina y la lámina nuclear. Por ejemplo, las PTM incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, entre otras, en diferentes aminoácidos de las colas N-terminales de las histonas y tienen efectos que pueden ser tanto activadores como inhibidores sobre la transcripción (figura 1.7). La metilación del ADN en citosinas de dinucleótidos de citosina y guanina (islas CpG) está mediada por ADN metiltransferasas (DNMT) y suele ser represiva. Esta metilación del ADN suele ser un patrón epigenético más estable y heredable, que puede persistir durante varias generaciones de células [42].

Como mencionamos anteriormente, todas las células de un animal se originan a partir de una única célula y comparten el mismo genoma; sin embargo, muestran diferentes fenotipos y realizan diversas funciones. Esto es posible durante el desarrollo, principalmente por medios epigenéticos, ya que el material genético permanece intacto [43], adquiriendo las células cambios estables en sus epigenomas [38].

Este nivel de regulación transcripcional epigenética incluye la participación de diversos componentes, entre ellos, muchas enzimas modificadoras de histonas diferentes, incluidas las *writers* que generan las modificaciones, las *erasers* que las eliminan y las *readers*, que reconocen las marcas distribuidas a través del genoma e interactúan con proteínas catalíticas (figura 1.7) [44]. Una función de las modificaciones de las histonas es coordinar la relación entre los remodeladores de cromatina y la maquinaria transcripcional para la regulación de la expresión génica. Estas marcas funcionan en conjunto con las variantes de las histonas, el remodelado de la cromatina, la metilación del ADN y las chaperonas de histonas.-





**Figura I.7. Esquema de un nucleosoma y sus posibles modificaciones epigenéticas.** La cromatina se encuentra sujeta a varias modificaciones químicas. Los nucleosomas son modificados enzimáticamente en múltiples posiciones. Proteínas especializadas (*writers*, *erasers* y *readers*) tienen un rol central en la incorporación, eliminación y lectura de dichas modificaciones, que son reversibles y crean una plataforma altamente dinámica para el reclutamiento de diversos factores que regulan el acceso a la información genética. Adaptada de Villaseñor y Babubec [45].

Numerosos trabajos revelaron la relevancia de las múltiples vías epigenéticas en el mantenimiento del estado indiferenciado y la diferenciación de CME. Se encontró que existen factores específicos que mantienen a la cromatina en un estado abierto y accesible para la activación transcripcional, denominada cromatina activa, y por otra parte, reguladores que contribuyen al silenciamiento de genes específicos de linaje hasta el desencadenamiento de la diferenciación celular, formando así una cromatina en estado reprimido o pausado, según el caso y como describiremos más adelante [42], [46], [47].

Existen múltiples tipos de marcas de cromatina activa e inactiva y diferentes complejos que las regulan. Por ejemplo, la marca represiva de H3K27me3, que silencia genes de desarrollo en CMP, está regulada por el complejo de proteínas Polycomb (PcG) [48]. Los genes *target* de las proteínas PcG tienden a ser co-ocupados por los FT Oct4, Sox2 y Nanog, actuando en conjunto para la represión de los genes de diferenciación. Por estas razones,

estos complejos cumplen un rol esencial en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la auto-renovación y la diferenciación de CMP [49]. Por otro lado, la marca de transcripción activa H3K4me3 es realizada por el complejo Trithorax (TrxG). Se ha demostrado que este complejo actúa junto con Oct4, Sox2 y Nanog regulando positivamente la transcripción génica en CME de ratón [50]. También existen regiones de la cromatina que poseen ambas marcas a la vez y se conocen como dominios bivalentes, los cuales se encontraron en CME de ratón y humanas [50]. La mayoría de los dominios bivalentes están presentes en genes asociados con el desarrollo y se cree que podrían conducir a la inducción rápida éstos cuando se induce la diferenciación, por lo que este estado de la cromatina se conoce como pausado. Ante señales específicas que promueven la diferenciación, la mayoría de los dominios bivalentes pasan a ser monovalentes conteniendo únicamente marcas asociadas a represión o a inducción dependiendo del tipo celular al cual se diferencien, por lo que se reprimen o inducen rápidamente [51].

Durante la diferenciación celular ocurren diversos cambios en la estructura y organización del genoma que afectan los programas de expresión génica. Estos cambios pueden ir desde el empaquetamiento a gran escala de cromosomas enteros hasta la reorganización de las interacciones locales entre secuencias *enhancer* y los promotores de los genes, mediados por la unión de factores de transcripción y la formación de bucles (*loops*) de la cromatina. Estos eventos, a los que se denomina en su conjunto 'estructuras de cromatina de alto orden', también se encuentran influenciados por la especificidad de los contactos con otras estructuras nucleares, como por ejemplo la lámina nuclear. Estos contactos físicos que se generan acercan factores y cofactores que se encuentran unidos a distintas secuencias, facilitando así la formación y correcto funcionamiento de complejos necesarios para la actividad transcripcional. De esta manera, estas estructuras moldean la conformación tridimensional del genoma en forma dinámica, pudiendo modificarse en distintos estadios de actividad transcripcional y durante la diferenciación celular.

Analizando la organización del genoma a nivel global, los cromosomas en el núcleo de las células en interfase no se encuentran entremezclados entre sí al azar, sino que se disponen en estructuras discretas denominadas territorios cromosómicos. Éstos presentan posiciones preferenciales dentro del núcleo que dependen de cada tipo celular, y que están conservadas

entre distintas especies [41]. Por otra parte, se postula que los territorios cromosómicos están rodeados por regiones nucleares denominadas compartimentos inter-cromosómicos, en donde se ubicarían las fábricas de ARN, estructuras multi-enzimáticas de ARN polimerasas donde tiene lugar la transcripción génica [52].

Tradicionalmente, la cromatina ha sido dividida en eucromatina, generalmente permisiva y asociada a una forma laxa y heterocromatina, distinguida por la presencia de dominios compactos que incluyen zonas transcripcionalmente silenciadas. Se propone que proteínas de la familia de la proteína asociada a heterocromatina 1 (HP1) contribuyen a este silenciamiento por su capacidad de expandirse a grandes regiones del genoma, compactar la cromatina y reclutar otras moléculas relevantes para la represión transcripcional [53], limitando el acceso de los FT para interactuar con el ADN [54].

Las CMP presentan una configuración de la cromatina principalmente abierta y ampliamente dispersa que se reorganiza extensamente dando lugar a la formación de grandes dominios compactos ante señales de diferenciación [55]. Asimismo, proteínas como HP1, muestran una unión a la cromatina hiperdinámica y más flexible en CMP, respecto a células diferenciadas [56], [57]. Estas observaciones son consistentes con el concepto de que para el mantenimiento e incluso la inducción de la pluripotencia, se requiere una estructura de la cromatina abierta que permita la plasticidad sin cambios drásticos en la organización y posicionamiento de los cromosomas [58]. En este sentido, las alteraciones en la expresión de proteínas remodeladoras de la cromatina en CME determinan una acumulación de cromatina compacta, interrupción de la auto-renovación y disminución del potencial de diferenciación [42].

Muchos de los procesos que ocurren en el núcleo, tales como la replicación del ADN, la transcripción o el posterior procesamiento del ARN, dependen de la acción concertada de diferentes proteínas y otras moléculas. Estudios recientes postularon que muchos de estos procesos ocurren dentro de condensados que compartimentan y concentran proteínas y moléculas de ARN que son requeridas para los distintos procesos en *loci* específicos y que no se encuentran homogéneamente distribuidos dentro del espacio subnuclear [59]. Estos

condensados que se forman tienen características comunes y propiedades emergentes que le dan a la célula capacidades regulatorias más allá de los mecanismos moleculares clásicos.

Estos condensados o compartimentos no tienen membranas, son sumamente diversos en cuanto a sus propiedades físicas, a su dimensión, su composición molecular, su localización subcelular y sus funciones. A estos focos (*foci*, del latín) se los denominó de diferentes maneras: cuerpos nucleares, gránulos, agregados y *puncta*, entre otras. Los nucléolos y los *foci* de heterocromatina son ejemplos conocidos de este tipo de estructura [60]. Se ha reportado que intervienen en diversos procesos nucleares como por ejemplo en la organización de la cromatina [61] y en la regulación de la transcripción [62], entre otros.

En síntesis, para poder estudiar la regulación génica, es necesario analizar de manera integral los múltiples aspectos mencionados en este apartado ya que la compleja interacción entre todos estos parámetros es lo que, en conjunto, determina los diversos programas de expresión génica y en última instancia, define la identidad celular.

## Sistema de defensa frente al estrés oxidativo

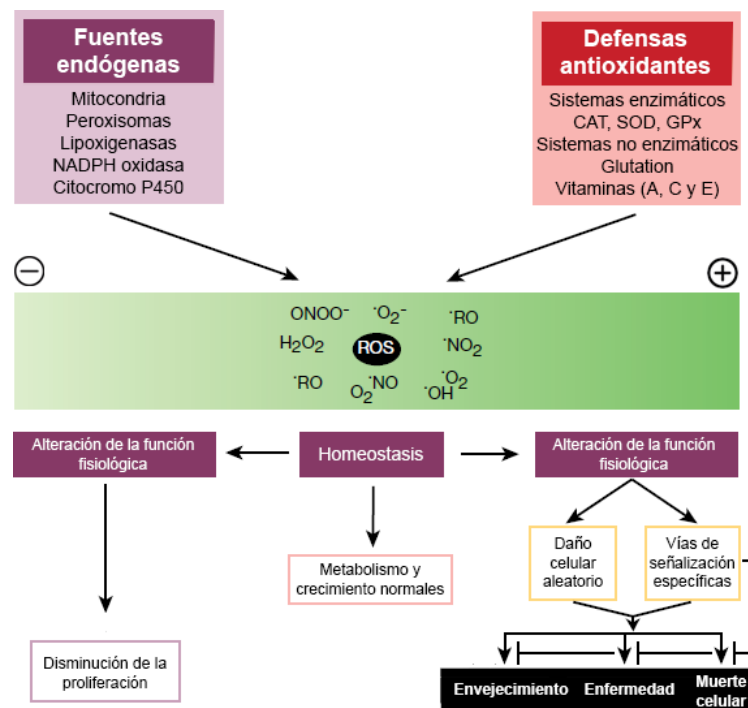
*“Living with the risk of oxidative stress is a price that aerobic organisms must pay for more efficient bioenergetics”* [63]

Un desbalance entre agentes oxidantes, particularmente especies reactivas del oxígeno (ROS), y agentes antioxidantes, en favor de los oxidantes, puede llevar al daño celular. Esto es conocido como estrés oxidativo. Las ROS son producidas continuamente como productos del metabolismo aeróbico, pero pueden ser generadas a una tasa mayor bajo condiciones anormales. La célula mantiene un entorno reductor mediante una defensa antioxidante que involucra una combinación de estrategias, tanto enzimáticas, como no enzimáticas.

## Especies reactivas del oxígeno en células madre

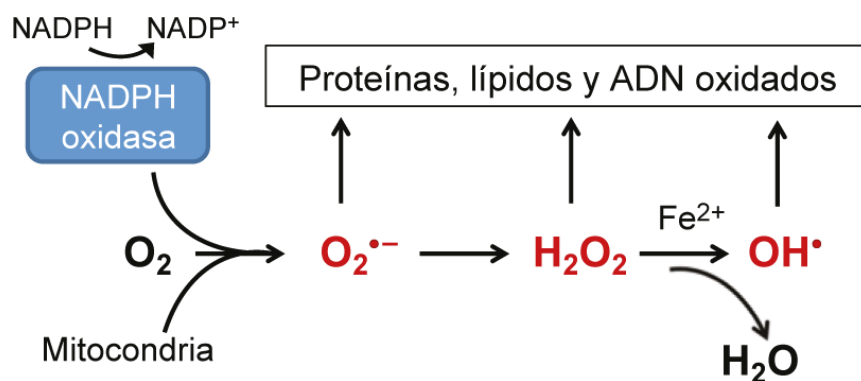
Las ROS son radicales libres y moléculas no radicalarias derivados del  $O_2$  e incluyen especies como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estas moléculas están involucradas en la señalización celular, jugando un papel importante como segundos mensajeros en muchas vías de transducción de señales. Su homeostasis es vital para el mantenimiento de las distintas funciones como proliferación, diferenciación y apoptosis. Sin embargo, como ya mencionamos, un aumento en su producción da como resultado estrés oxidativo, determinado por el desbalance entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los oxidantes, alterando la homeostasis de óxido-reducción celular. En este caso, las ROS producen daño a distintos componentes celulares, como proteínas, lípidos y ADN (figura I.8) [64].



**Figura I.8. Fuentes que dan origen a las ROS y respuestas celulares generadas.** Los oxidantes se generan producto del metabolismo intracelular en mitocondrias y peroxisomas, entre otros compartimentos subcelulares y por agentes externos. La defensa enzimática incluye a las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) que regulan los niveles de ROS, manteniendo la homeostasis celular. Niveles de ROS por debajo del rango fisiológico tienen como consecuencia problemas en funciones celulares básicas como la proliferación celular. Por otro lado, un aumento de ROS puede causar daño celular, llevar a envejecimiento celular y enfermedades asociadas e incluso muerte celular. Adaptada de [65].

La mayor parte de la producción de ROS intracelular proviene de la mitocondria (figura I.9). La producción de radicales superóxido en la mitocondria ocurre principalmente en dos puntos de la cadena de transporte de electrones: el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (Ubiquinona-Citocromo C reductasa). Bajo condiciones metabólicas normales, el complejo III es el sitio principal de producción de las ROS [66]. La producción de ROS es contrarrestada por un sistema de defensa complejo que incluye la familia de enzimas superóxido dismutasas (SOD), la catalasa y las glutatión peroxidasas. SOD cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno, mientras que la catalasa y la glutatión peroxidasa convierten el peróxido de hidrógeno en agua. Además, la familia de enzimas denominada peroxirredoxinas también interviene en este sistema de defensa [67]. Una gran variedad de compuestos pequeños, de bajo peso molecular, también son muy importantes. Estos incluyen varias vitaminas, entre las que se encuentra el ascorbato, piruvato, flavonoides, carotenoides y glutatión. Como ya mencionamos, el balance entre la producción de ROS y la defensa antioxidante determina el grado de estrés oxidativo. Las consecuencias de este estrés incluyen la modificación de proteínas celulares, lípidos y ADN, por lo cual, el sistema de defensa resulta fundamental para la integridad celular.



**Figura I.9. Generación y eliminación de ROS.** Las ROS, que incluyen al anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (mostrados en rojo), son producidas normalmente por el metabolismo celular. Bajo condiciones de estrés oxidativo, las ROS acumuladas oxidan y dañan varios componentes celulares. Adaptada de Bigarella *et al* [68].

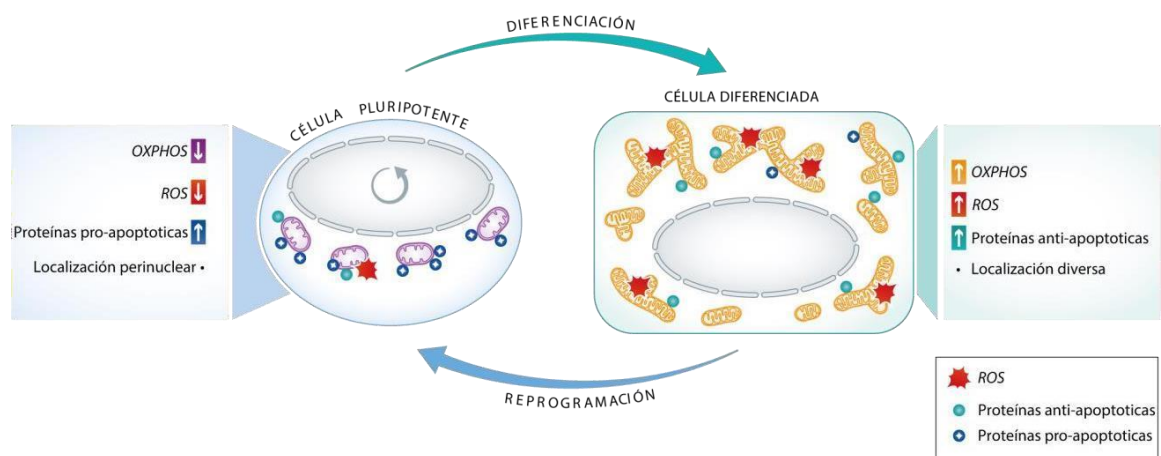
## Defensa frente al estrés oxidativo en CMP

Un pequeño número de CME da origen a todos los tejidos del embrión en desarrollo. Tal importante tarea implica que las CME deban contar con mecanismos extremadamente eficientes como para defenderse de diferentes situaciones de estrés y para prevenir y reparar posibles daños al ADN. Dado que, como ya mencionamos, las especies reactivas del oxígeno son una gran fuente de daño al ADN ya que son producidas constantemente como productos del metabolismo, las CME deben tener una maquinaria finamente regulada para evitar este tipo de daño y así poder mantener la estabilidad genómica. Los diferentes estadios celulares requieren programas metabólicos específicos para las demandas bioenergéticas particulares de cada uno de ellos, con lo cual, las demandas energéticas de las células madre y su progenie son distintas. Las células ya diferenciadas presentan menor tasa de replicación, y en consecuencia poseen menor demanda anabólica que las células pluripotentes; sin embargo, sí requieren gran cantidad de energía para sustentar los procesos de homeostasis celular y las funciones especializadas que aumentan al diferenciarse.

La producción de energía en el desarrollo temprano de mamíferos depende de muchos factores, incluyendo disponibilidad del sustrato, captación y tensión de oxígeno. Todas las células producen energía en forma de ATP en diferentes proporciones, ya sea en la glucólisis o en la fosforilación oxidativa, siendo un balance entre estos dos procesos controlado por factores intra y extracelulares, según el estadio específico del desarrollo en el cual se encuentre la célula. Existen células que dependen mayormente de la glucólisis, sin embargo, células en un ambiente rico en oxígeno obtienen energía de manera más eficiente mediante fosforilación oxidativa. Durante la pre-implantación de embriones murinos, el ATP es mayormente producido por fosforilación oxidativa [69]. Luego, el embrión empieza a aumentar su metabolismo glucolítico, por lo cual, obtienen energía de ambos procesos, glucólisis y fosforilación oxidativa con un aumento en la captación de glucosa y un ambiente reducido en oxígeno como lo es el del blastocisto implantatorio [70].

En CME y en CMPi, el número de mitocondrias y la biogénesis mitocondrial son bajas, mientras que durante la diferenciación se produce un aumento tanto en la proliferación y la actividad mitocondrial [71], [72] asociados con una mayor demanda de ATP [73], [74], como

en los niveles de ROS [74] (figura I.13). Asimismo, existen evidencias de que altos niveles de ROS promueven la diferenciación en CME [75], [76], sin embargo, en progenitores neurales las ROS son necesarias para mantener la auto-renovación [68]. Esto demuestra la fuerte influencia del metabolismo celular y la cantidad de ROS en el balance entre la auto-renovación y la diferenciación en diferentes tipos de células madre.



**Figura I.13. Plasticidad mitocondrial durante la diferenciación y la reprogramación.** Las mitocondrias sobrellevan varios cambios durante la diferenciación de CMP y también durante la reprogramación a CMP. Estos cambios van a tener un impacto sobre la actividad redox de la célula dado que cambia la morfología y localización mitocondrial, además de aumentar la cantidad de ROS. Adaptada de Lisowski *et al* [77].

En síntesis, las CME no sólo presentan un sistema de reparación del ADN altamente efectivo sino también una alta actividad de las diferentes enzimas antioxidantes [73]. Debido a la importancia de asegurar la estabilidad del genoma celular, las CME son un blanco de estudio a la hora de investigar y tratar de dilucidar los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

### Superóxido dismutasa 1

Las enzimas superóxido dismutasas son la primera y más importante línea del sistema de defensa enzimático frente a las ROS y en particular, los radicales superóxido [78]. En



mamíferos, han sido identificadas tres isoformas distintas de SOD ADN: dos de ellas poseen cobre y zinc en su centro catalítico y están localizadas en diferentes compartimentos intracelulares (CuZn-SOD o Sod1) y en el medio extracelular (EC-SOD o Sod3). Sod1 fue la primera superóxido dismutasa en ser caracterizada en organismos eucariotas; es la isoforma más abundante de esta enzima y realiza la mayor parte de la actividad de superóxido dismutasa en la célula [79], convirtiendo anión superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Se encuentra principalmente en el citosol, aunque también se la ha encontrado en núcleo, microsomas y en el espacio intermembrana de mitocondrias [80]–[82]. Sod3 es un homotetrámero con alta afinidad por la heparina; fue detectada por primera vez en plasma, linfa y fluido cerebroespinal de humanos [83]. La tercera isoforma de las SODs usa manganeso como cofactor y ha sido localizada en las mitocondrias de células aeróbicas (Mn-SOD o Sod2) [84]. Es un monotetrámero que juega un importante rol en promover la diferenciación celular y tumorigénesis [85] y en la protección contra la toxicidad pulmonar inducida por hiperoxia [86]. La distribución de Sod1 y Sod2 es generalizada, representando la actividad de Sod1 un 70% de la actividad total de la célula, mientras que la expresión de Sod3 está restringida a ciertos tejidos como pulmones, riñón y tejido adiposo [87].

La mayor cantidad de aniones superóxido generada en la célula proviene de la mitocondria [88] y Sod2 tiene un rol clave en eliminarlos. Sin embargo, al menos la mitad de la producción de superóxido puede llegar hasta el citoplasma celular [89]. Los aniones superóxido también son generados en el citosol, a partir de la actividad de enzimas como la citocromo P450 y la NADPH oxidasa, entre otras [90], [91]. Esto evidencia el rol protector crítico que también tiene la enzima Sod1.

Si bien los ratones *KO* para Sod1 son viables [92], muestran daño oxidativo en diversos componentes celulares [79] y también distintos fenotipos que se ven severamente afectados en su calidad de vida, tales como fertilidad reducida en hembras, degeneración de la mácula, tumores de hígado y pérdida de masa muscular asociada a envejecimiento [93]–[95]. Además, los ratones Sod1 *-/-* tienen reducida su esperanza de vida en un 30%, siendo esta reducción asociada a una gran incidencia de hepatocarcinogénesis [96]. Alteraciones en el nivel de expresión del gen de Sod1 o en la actividad catalítica de la proteína están asociadas con varias fisiologías patológicas tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [94], envejecimiento y

enfermedades asociadas a éste [87]. Considerando el rol que tiene Sod1 en estas patologías, es necesario un mayor entendimiento en la regulación de su expresión.

Si bien existen algunos estudios que abordan la relación entre Sod1 y CMP, la mayoría tienen puesto el foco en poder generar un modelo de enfermedad para ELA, como por ejemplo derivando astrocitos y neuronas motoras a partir de CME [97]–[99]. Dado que aún no se conoce en profundidad la regulación génica de Sod1 en CMP, consideramos fundamental su estudio.

### *Glutación reductasa*

Como mencionamos previamente el sistema de defensa está compuesto por diferentes enzimas y pequeñas moléculas, como vitaminas antioxidantes y glutación. Uno de los componentes clave de este sistema es la enzima glutación reductasa (Gsr), dado que cataliza la reducción de glutación disulfuro (GSSG) para formar glutación (GSH) en su forma sulfhidrilo. Esta molécula es esencial para la resistencia al estrés oxidativo, para el mantenimiento del ambiente reductor en el interior de las células y también como co-sustrato de otras enzimas antioxidantes esenciales para la disminución de las ROS generadas en el proceso de respiración celular. Además, GSH cumple un rol en transducción de señales [100], expresión génica [101], apoptosis [102] y proliferación celular [103].

En mamíferos, Gsr se encuentra en todos los tejidos; su actividad es mayor en riñones, intestino delgado, hígado, glándulas endocrinas y pulmones; la menor actividad se registra en corazón, músculos y eritrocitos. Aunque en la célula se encuentra mayoritariamente en el citosol, también es detectada en mitocondria, núcleo y microsomas [104].

Gsr es una enzima homodimérica que se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución y ha sido identificada en plantas, bacterias, hongos y en todas las especies de mamíferos [105]. Dado que todas las especies en las cuales se identificó Gsr son aeróbicas, esto implicaría que es importante para la supervivencia en un ambiente rico en oxígeno [106]; asimismo, no se ha reportado ningún *KO* ocurrido de manera natural, lo que destaca su

relevancia. Pretsch *et al.* [107] reportaron la generación de una línea de ratones hipomórficos para Gsr que exhibían una sustancial disminución en su actividad.

En lo que respecta a CMP, ya hemos mencionado que, tanto los niveles de ROS [74] como la cantidad y actividad de mitocondrias aumentan durante la diferenciación [71], que las ROS tienen un rol clave en el balance entre auto-renovación y pluripotencia [68] y que los niveles adecuados de ROS y GSH son clave en la homeostasis redox [108]. Gsr es la enzima responsable de lograr esto. Ha sido reportado que la expresión de esta enzima se encuentra aumentada los primeros días de la diferenciación en CMP humanas y que disminuye a partir del día 7 de la diferenciación [72], [74]. En un trabajo donde estudiaron los patrones de expresión de todos los componentes que intervienen en mantener los niveles de GSH durante la embriogénesis [109], encontraron que en embriones de día 7, los niveles de ARNm de Gsr eran altos, para luego bajar a niveles similares a los de un individuo adulto a día 18, postulando que podría cumplir una función esencial en la ontogenia murina. Recientemente se reveló, mediante el uso de una línea de ratones deficientes para Gsr, que esta disrupción temprana del sistema GSH impacta negativamente en el desarrollo pulmonar, la diferenciación celular hacia dicho linaje y en las respuestas hiperóxicas [110].

Toda esta evidencia resalta lo importante de estudiar en mayor profundidad el posible rol de Gsr en el desarrollo y su regulación durante la diferenciación de CMP.

## *Hemo-oxigenasa*

Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es una proteína de 32 kDa que fue identificada como una enzima microsomal inducible, responsable de la degradación del grupo hemo, dando como productos de la reacción monóxido de carbono (CO),  $\text{Fe}^{2+}$  y biliverdina (BV), que por acción de la biliverdin reductasa (BVR) da lugar a bilirrubina (BR) [111].

Los productos de esta reacción enzimática ejercen un rol citoprotector, manteniendo la homeostasis celular. Por ejemplo, la BV y la BR proveen a las células de una alta capacidad antioxidante, eliminando las especies reactivas de oxígeno (ROS); la producción de  $\text{Fe}^{2+}$  favorece la sobreexpresión de ferritina, que secuestra el hierro libre y confiere propiedades antioxidantes y citoprotectoras [112]. Asimismo, el CO también ha sido estudiado por sus propiedades citoprotectoras, siendo una molécula anti-oxidante, anti-inflamatoria, anti-proliferativa y anti-apoptótica [113]. Diversos factores pro-oxidativos inducen la expresión de HO-1 en respuesta al estrés celular, como el aumento de los niveles de hemo, la luz ultravioleta, los lipopolisacáridos, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el estrés térmico, los metales pesados, las citoquinas proinflamatorias, el óxido nítrico, y el etanol, entre otros [114].

Dada la multiplicidad de funciones que poseen los productos de la reacción que cataliza HO-1 en las células, las mutaciones en el gen HO-1 que darían lugar a una proteína trunca o deficiente, tendrían graves consecuencias en el desarrollo embrionario. Solamente se conoce un caso de deficiencia de HO-1 en humanos que mostró hemólisis intra-vascular, coagulación deficiente, fragmentación de eritrocitos, bajos niveles de BR en plasma y deposición de  $\text{Fe}^{2+}$  en hígado y riñones [115]. Se ha logrado generar ratones doble *KO* para el gen de HO-1; sin embargo, sólo llega a sobrevivir un 1-8% de la descendencia y éstos desarrollan anemia por deficiencia de hierro hacia la semana 20-25 y dejan de ganar peso. Además, dado que el metabolismo del hierro se encuentra alterado, éste comienza a acumularse en los tejidos, lo cual genera estrés oxidativo en hígado y riñones y una enfermedad inflamatoria crónica progresiva [116]. A su vez, las células de estos ratones *KO* muestran mayor susceptibilidad al daño por estrés oxidativo [117].

En el contexto de células madre, la mayoría de las publicaciones evalúan los efectos de HO-1 en células madre mesenquimales (CMM) que, a diferencia de las CMP, son células multipotentes. Por ejemplo, hay reportes que indican que la sobreexpresión de HO-1 aumenta

el éxito de los trasplantes de células mesenquimales de medula ósea [118] y relacionan a HO-1 con un aumento de la supervivencia y de la diferenciación osteogénica de las mismas [119]. También se vieron efectos similares en CMMs donde la expresión de HO-1 había sido inducida, llevando a mejorar el resultado de trasplantes de corazón [120], [121], pulmón [122] y riñón [123]. Si bien se ha reportado que HO-1 inhibe la maduración de adipocitos y osteoclastos y, por otra parte, promueve la maduración de células hematopoyéticas [124], aún no se ha estudiado cuál es el rol específico de HO-1 en estos tipos celulares.

Respecto al rol de HO-1 en CMP, en los últimos años surgieron trabajos sumamente relevantes. Se encontró que durante la diferenciación de CME murinas, como consecuencia de la exposición a óxido nítrico, aumentan los niveles de HO-1 [125] y que HO-1 tendría un efecto citoprotector frente a condiciones de hipoxia [126]. Por otra parte, se reportó que CMPi KO para HO-1 son más susceptibles a sufrir muerte celular inducida por estrés oxidativo. Asimismo, cuando estas células son sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigido, los niveles de Oct4 decaen más rápidamente y poseen mayor fosforilación de Erk1/2, ambos parámetros asociados a la diferenciación de CME, sugiriendo un rol protector contra la diferenciación para HO-1 [127]. Suliman *et al.* [128] postulan al sistema HO-1/CO como un factor esencial en la diferenciación de CME y la consecuente maduración de estas células a células cardíacas funcionales, a través de la producción de ROS mitocondrial, requeridas para la diferenciación al linaje cardíaco. A su vez, también reportan que al silenciar HO-1, encuentran menor cantidad de focos contráctiles al diferenciar CME mediante formación de cuerpos embrioides. Por otro lado, también se ha reportado que CME KO para HO-1, muestran un aumento en la expresión de marcadores de mesodermo y más específicamente, de células de músculo liso, en tiempos cortos de un protocolo de diferenciación no dirigido, postulando un posible rol de HO-1 como regulador de la expresión de dichos genes [129]. Stepniewski *et al* [130] reportaron que fibroblastos KO para HO-1 muestran una menor eficiencia de reprogramación y que la inducción farmacológica de HO-1 resulta en un aumento del número de colonias de CMPi. Por otro lado, también reportan que la falta de HO-1 disminuye la diferenciación hacia linaje cardíaco, tanto a partir de CMPi como de CME KO para HO-1.

Estudiar la relevancia y la regulación de la expresión de HO-1 en CMP aportará información muy valiosa para la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en

la diferenciación. De esta manera podrá contribuirse a la optimización tanto de protocolos de diferenciación hacia un linaje de interés, como para aumentar la eficiencia de obtención de CMPi, hechos fundamentales para la futura aplicación de las CMP en el área de la medicina regenerativa.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Un complejo sistema celular preserva la integridad y estabilidad genómica y se encuentra exacerbado en CMP, evitando la propagación de daños genéticos a células hijas. Uno de sus componentes es el sistema de defensa frente al estrés oxidativo, integrado por una serie de proteínas que actúan de manera coordinada manteniendo la homeostasis redox celular. Su función es fundamental para el mantenimiento de las propiedades de las CMP y para ciertos procesos de diferenciación, sin embargo, la regulación de la expresión de sus componentes y su relación con los FT de pluripotencia no ha sido explorada en profundidad. Nuestro **objetivo general** es estudiar la regulación de genes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo que puedan ser relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación.

En base a los antecedentes presentados en la introducción, planteamos la siguiente hipótesis:

**Hipótesis 1:** Algunos componentes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo son relevantes para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de estas células y su expresión es regulada por los FT esenciales de CMP, Oct4, Sox2 y Nanog (FT de CMP).

Para estudiar esta hipótesis, según publicaciones de nuestro grupo y de otros, seleccionamos genes a estudiar y nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar si los genes de Sod1, Gsr y HO-1 son regulados por los FT de CMP.

Para esto utilizamos los siguientes abordajes experimentales:

- 1.1. disminución de la expresión de los FT de CMP mediante *short hairpin RNAs (shRNA)* específicos en CME y análisis de expresión génica.
- 1.2. ensayo de transactivación de construcciones reporteras en un sistema heterólogo.

1.3. expresión ectópica de los FT de CMP en un sistema heterólogo y análisis de expresión del gen endógeno.

En base a resultados que obtuvimos durante la primera parte de esta tesis surgió una nueva hipótesis:

**Hipótesis 2:** HO-1 tiene una función nuclear en CMP y está involucrada en la regulación de genes relevantes para la diferenciación.

Para estudiarla nos propusimos los siguientes objetivos:

2. Evaluar el efecto del aumento de HO-1:

2.1. sobre la expresión de los FT de CMP.

2.2. sobre la distribución de la proteína asociada a heterocromatina HP1.

En ambos casos, para aumentar la expresión de HO-1 utilizaremos dos abordajes experimentales: tratamiento de CMP con hemina para su inducción farmacológica y transfección transitoria de un vector de expresión.

3. Generar una línea de CME *knockout* para HO-1 mediante la tecnología CRISPR/Cas9, para complementar los estudios anteriores y continuar explorando el rol de HO-1 en CME.



## RESULTADOS

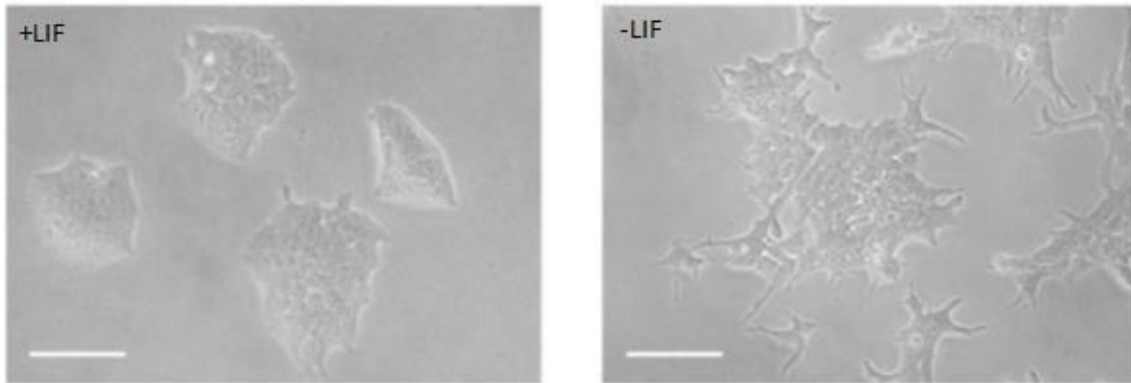
Todas las células poseen un conjunto de mecanismos que aseguran la estabilidad genómica. Particularmente en las CMP estos mecanismos se encuentran exacerbados, lo cual es fundamental para evitar la propagación de daños genéticos. Considerando que estas células dan origen a un individuo, incluyendo la línea germinal, un daño en el ADN en este estadio podría tener graves consecuencias.

Como ya hemos desarrollado en la introducción, uno de estos mecanismos involucra un complejo sistema de defensa frente al estrés oxidativo que mantiene los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en un rango fisiológico. Se sabe que la actividad antioxidante disminuye a lo largo de la diferenciación [64], [74], [131], pero aún no se conoce en profundidad la regulación de la expresión de muchos de los componentes de este sistema de defensa en CMP. Es por esto que en nuestro laboratorio, decidimos estudiar la expresión de algunas enzimas seleccionadas, tanto en CME en estado indiferenciado como a lo largo del proceso de diferenciación. Nuestra hipótesis general es que algunos genes que son modulados durante la diferenciación pueden ser regulados por factores de transcripción específicos de CMP y relevantes para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de estas células. Bajo esta hipótesis, previamente estudiamos el gen de Sod2 y encontramos que disminuye su expresión a lo largo de la diferenciación de CME y que su expresión es inducida por los FT fundamentales de pluripotencia Oct4 y Nanog [132].

En base a los antecedentes descriptos, a lo largo de esta tesis doctoral nos propusimos estudiar la regulación de otros genes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo en CME. En la primera y segunda parte de esta tesis, nos enfocamos en dos genes que surgieron de un análisis previo, realizado en nuestro laboratorio durante la tesis doctoral de Claudia Solari [132], el gen de Sod1 y el de Gsr. En la tercera y última parte, abordamos el estudio de la regulación del gen de HO-1, Hmox1, otro de los componentes del sistema de defensa, seleccionado por evidencias de su relevancia en CME [124], [129], [130] que surgieron durante el desarrollo de esta tesis y finalmente comenzamos a explorar una posible función nuclear de HO-1.

### Expresión del gen de Sod1 en CME

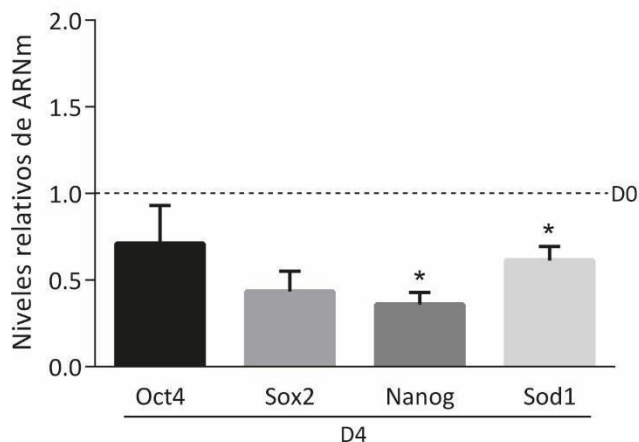
Como mencionamos en la introducción, el mantenimiento de las CME en estado indiferenciado es una condición artificial que se logra en cultivo mediante el agregado de factores que sostienen en el tiempo la pluripotencia, y que en un contexto natural como es el embrión, corresponde a un estado transitorio. Específicamente, la citoquina LIF, que en el embrión es producida por las células del trofoectodermo, es la molécula que mantiene el estado de pluripotencia en CME de ratón y que fue descubierta por el grupo de Austin Smith en el año 1988 [16]. Posteriormente se encontró que, si además de LIF, se agregan dos inhibidores al medio de cultivo, de MEK y GSK3B, PD0325921 y CHIR99021, respectivamente y denominados en conjunto “2i”, las células se mantienen en un estado de pluripotencia denominado *naïve*, equivalente a un estadio del embrión preimplantatorio [15] y son en gran medida homogéneas en términos de expresión génica y morfología [23]. En nuestro laboratorio cultivamos de rutina a las células en presencia de LIF o LIF + 2i y para inducir la diferenciación utilizamos distintos protocolos. El más simple consiste en el cultivo de las células adheridas a la placa cubierta con gelatina, al igual que para el mantenimiento en estado indiferenciado, pero en un medio de cultivo en ausencia de LIF y 2i. Esta diferenciación se define como “no dirigida” porque no se dirige hacia un tipo celular específico, sino que simplemente se suprimen las señales que fuerzan el mantenimiento del estado indiferenciado, por lo que las células se diferencian espontáneamente hacia diversos tipos celulares. La diferenciación no dirigida es muy utilizada para evaluar si las células en estudio son pluripotentes, ya que para esto debe investigarse su capacidad de generar células derivadas de las tres capas germinales, y es muy útil también para estudiar mecanismos generales involucrados en la salida del estado indiferenciado. En la figura R.1 se puede ver una imagen representativa de las CME en estado indiferenciado y luego de cuatro días de diferenciación.



**Figura R.1. Morfología de CME indiferenciadas y a los 4 días de diferenciación no dirigida.** CME de la línea R1 en estado indiferenciado, cultivadas en presencia de LIF (izquierda) o en ausencia de LIF durante cuatro días (derecha). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Para abordar el estudio de la regulación del gen de Sod1, estudiamos mediante RT-qPCR, los niveles de ARNm de CME cultivadas en presencia de LIF, como control, y en ausencia de LIF por 4 días. Para validar el protocolo de diferenciación utilizado, medimos además los niveles de ARNm de los FT de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog que disminuyen durante la diferenciación. Como detallamos en la sección Materiales y Métodos, relativizamos los resultados al estado indiferenciado, y utilizamos la expresión de Gapdh y Pgk1 como genes *housekeeping* para normalizar los niveles de expresión de estos genes.

Como se muestra en la figura R.2, observamos que los niveles de ARNm de Nanog disminuyen significativamente al día 4 de la diferenciación indicando que las células se diferenciaron. Es interesante mencionar que, si bien la expresión de este FT disminuye rápidamente al inicio de la diferenciación, los niveles de Oct4 y Sox2 pueden mantenerse constantes durante los primeros días [133]. Notablemente, los niveles de ARNm de Sod1 resultaron menores en las células diferenciadas durante 4 días respecto a la condición control.



**Figura R.2. Los niveles de ARNm de Sod1 disminuyen durante la diferenciación en CME.**

Las CME de la línea R1 fueron cultivadas bajo condiciones estándar, en presencia o en ausencia de LIF por cuatro días. Luego se extrajo el RNA y se analizaron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los valores obtenidos fueron normalizados a la media geométrica de los ARNm de los genes *housekeeping* Gapdh y Pgc1 y relativizados a la condición control en presencia de LIF (D0, línea de puntos). El resultado se muestra como la media  $\pm$

SEM de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (D0) ( $p < 0.05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar.

## **Análisis de la existencia de sitios de unión putativos para los FT de CMP y de su interacción en la región promotora del gen de Sod1**

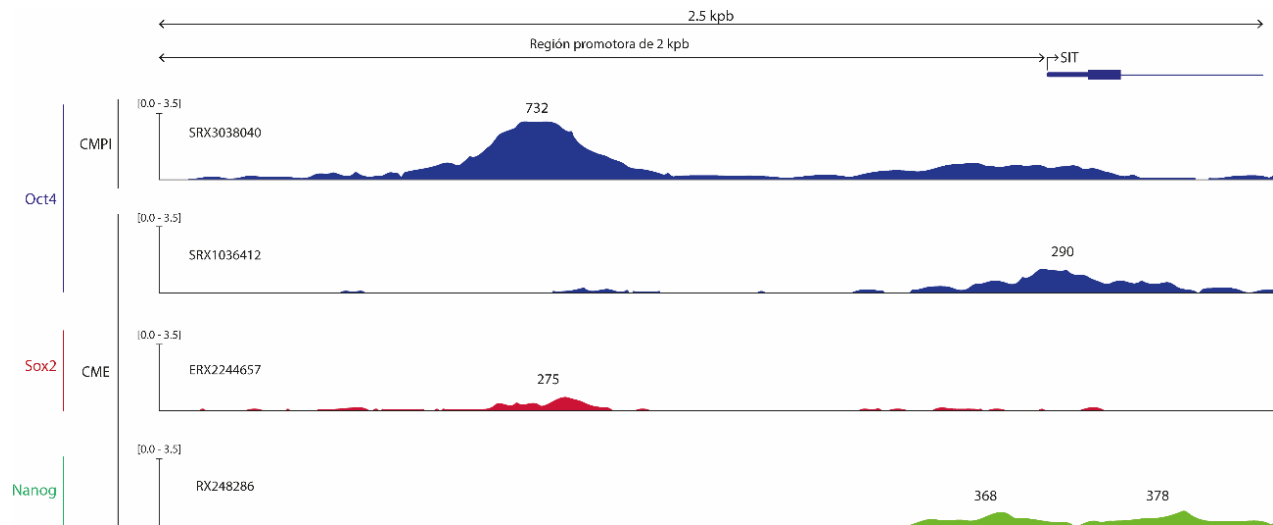
Dado que encontramos que el gen de Sod1 se reprime durante la diferenciación, nos propusimos estudiar si podía ser regulado por los FT esenciales para mantener el estado indiferenciado, Oct4, Sox2 y Nanog. En primer lugar analizamos la presencia de sitios de unión para estos FT en una región de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Para esto utilizamos como herramienta bioinformática el software *MatInspector* de *Genomatix* [134]. Como mostramos en la tabla R1, encontramos varios sitios de unión putativos para los FT, lo que indica que es posible que puedan regular este gen mediante interacción con estas secuencias consenso.

Factor de transcripción	Posición		Secuencia
	Desde	Hasta	
Oct4	-521	-539	gccccctGCATgacagaca
	-764	-782	agtgctGCATttggtggc
	-1179	-1197	ttcattACATttcaaag
	-1415	-1433	tgccctcaGCATccctagta
	-2185	-2203	gatgtatGCATgagctctt
Nanog	-1450	-1468	agctgggAATGgtggggca
	-1650	-1668	ggtaggAATGagcaaagg
	-1863	-1881	catctgtAATGggaataa
	-2761	-2779	gccccttAATGgtcacgct
	-3996	-4014	ctaagtgAATGccaaaatc
Sox2	-3092	-3116	tttggACAAaggcccttggctggg
Stem*	-1068	-1086	taaatGCAAgaccaagg
	-4569	-4587	ttattACATaataagta

**Tabla R.1.** El promotor de Sod1 posee sitios de unión putativos para los FT de CMP. En la tabla se indica la posición de los sitios de unión putativos para los FT de CMP en una región de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen de Sod1. <https://www.genomatix.de/matinspector>. En letras mayúsculas y de color rojo se muestra la secuencia consenso. \*Sitio de unión compuesto para Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 (Tcf7l1) y Sall4b.

A continuación, con el propósito de investigar si efectivamente los FT de pluripotencia interactúan con estas regiones realizamos otro análisis utilizando la herramienta ChIP-Atlas [135]. Con ella, se pueden buscar datos de experimentos de ChIP-seq realizados por otros grupos, mirando en particular ChIPs contra el FT o proteína de interés y también especificar el modelo celular que se usó para dicho experimento. Luego, esa información se visualiza en el programa *Integrative Genome Viewer* [136], en el cual se puede buscar el *locus* del gen de interés y explorar si en esa región hay lecturas de unión ('pegado') del FT. Analizando el *locus* del gen de Sod1 en experimentos en que se había inmunoprecipitado con anticuerpos que reconocen a Oct4, Sox2 y Nanog, encontramos lecturas en la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción, en varios experimentos realizados no solo en CME sino también en CMPi, células que, como mencionamos en la Introducción, son muy similares a las CME en cuanto a la expresión génica, perfil epigenético y potencial de diferenciación (figura R.3). Esto

evidencia que efectivamente estos FT interactúan con regiones regulatorias del *locus* genómico de Sod1 en CMP.



**Figura R.3. Los FT de CMP interactúan con regiones del *locus* de Sod1.** Se muestran los resultados del análisis obtenido mediante CHIP-Atlas sobre el *locus* genómico del gen de Sod1 a partir de datos provenientes de experimentos independientes de CHIP-seq en CMPi y en CME. Los picos y los números arriba corresponden al número de lecturas significativas de las regiones que fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo contra Oct4, Sox2 o Nanog, según se indica a la izquierda de la figura. Los números del eje Y indican la cantidad de lecturas normalizadas al total de lecturas mapeadas. El número a la izquierda de cada panel corresponde a la identificación del experimento del cual provienen los datos. SIT: sitio de inicio de la transcripción.

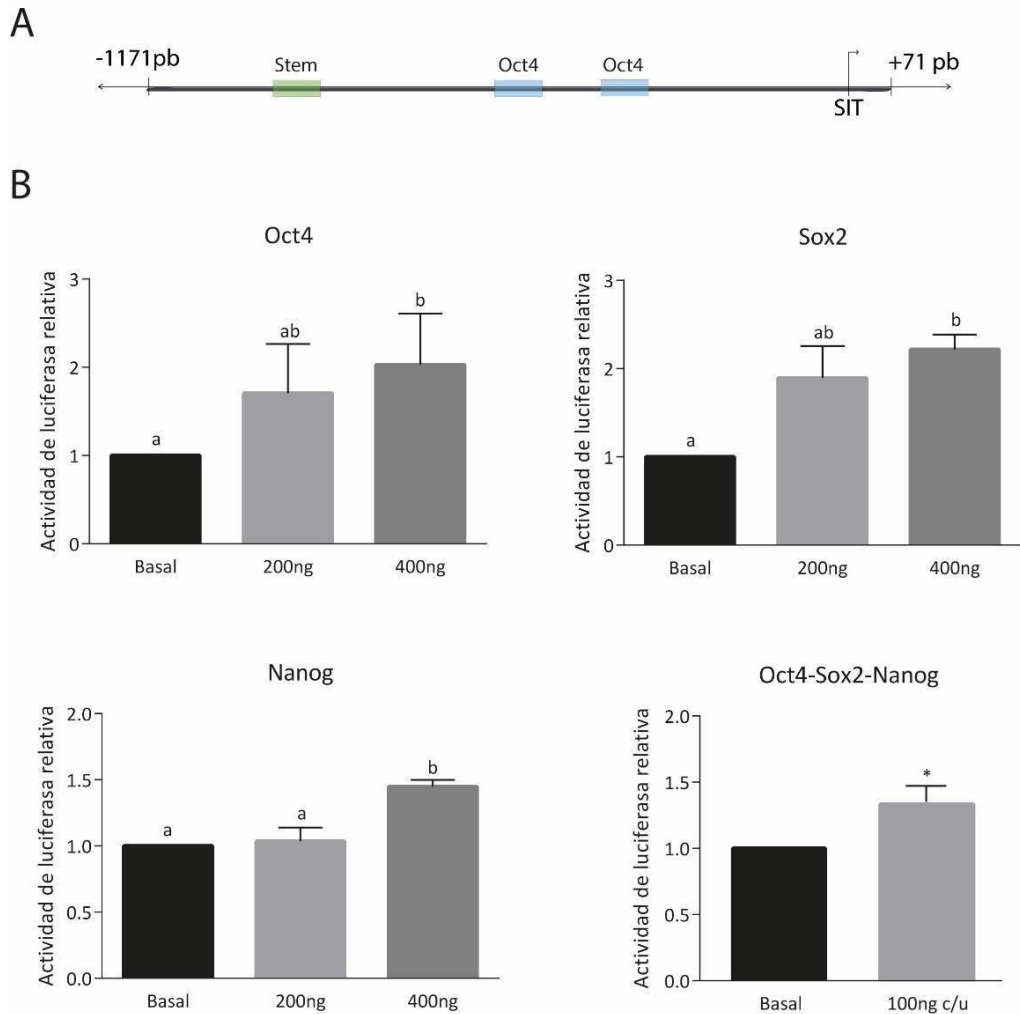
## Efecto de los FT de CMP sobre la actividad de la región promotora de Sod1

Con el propósito de estudiar su posible regulación por los FT fundamentales de CMP, y basándonos en la información obtenida en el análisis *in silico*, generamos un vector reportero que denominamos pSod1-luc, conteniendo una región de 1171 Kpb del promotor de Sod1, que incluye dos sitios putativos de unión para Oct4 y un sitio *Stem*, río arriba de una secuencia codificante para la proteína luciferasa de luciérnaga (figura R3.A). En la sección Materiales y Métodos describimos en detalle de la generación de esta construcción.

Para estudiar el efecto de estos FT sobre el vector reportero realizamos un ensayo de trans-activación en un sistema heterólogo, la línea de fibroblastos embrionarios de ratón

(MEF) NIH/3T3. Dado que esta línea no expresa dichos FT, ésta representa un sistema muy útil para estudiar el efecto de estos factores en un sistema más definido. En todos los casos co-transfectamos el vector reportero junto con el vector pRL-TK, que codifica para enzima luciferasa de *Renilla reniformis*, cuya actividad se utiliza para normalizar los niveles de transfección (más detalles en la sección Materiales y Métodos). Para evaluar si los FT de pluripotencia estimulan la transcripción del gen reportero en la construcción generada, co-transfectamos las células con vectores codificantes para Oct4, Sox2 y/o Nanog o el vector vacío y determinamos la actividad luciferasa. Como se muestra en la figura R.4, observamos que cada uno de los tres factores de transcripción produjo un aumento de la actividad de luciferasa respecto al vector vacío que determina la actividad basal. Asimismo, en la condición en la que co-transfectamos los tres FT simultáneamente detectamos inducción de la construcción reportera con 100 ng de cada vector. Es interesante mencionar que transfectando cada vector de manera individual no detectamos efecto en la condición de 200 ng, por lo tanto este resultado podría sugerir un efecto sinérgico o al menos aditivo, lo que es esperable dado el modo de acción de estos FT que en muchos casos actúan en conjunto.

Estos resultados indican que estos FT estimulan la transcripción a partir de la región promotora de Sod1 clonada en este vector y que podrían inducir la expresión del gen de Sod1.



**Figura R.4. Los FT de CMP producen un aumento en la actividad de luciferasa de la construcción reportera pSod1-Luc.**

(A) Esquema del fragmento clonado en el vector pSod1-Luc que incluye los sitios de unión encontrados. SIT: Sitio de Inicio de la Transcripción. (B) Células MEF de la línea NIH/3T3 fueron transfectadas con pSod1-Luc, pRL-TK y diferentes cantidades de los vectores pMXs-Nanog, pMXs-Oct4, pMXs-Sox2, según se indica, o con ninguno (Basal). El análisis de la actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* de pSod1-Luc fue normalizada a la actividad de luciferasa de *Renilla reniformis* y relativizada a la condición basal. El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones y el asterisco, diferencias significativas respecto al basal ( $p < 0.05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar. Las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas mediante prueba de Tukey.

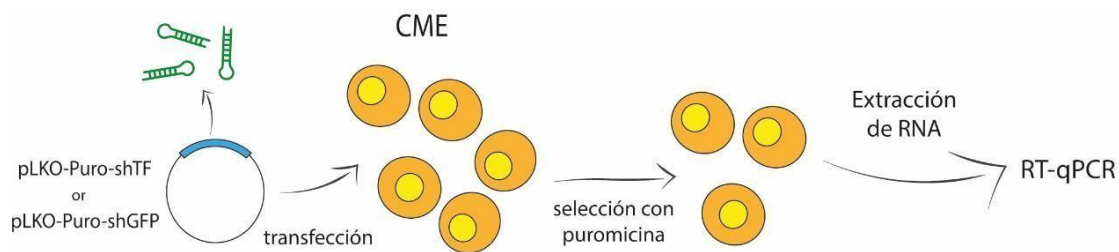
## Efecto de la disminución de la expresión de los FT de CMP sobre la expresión de Sod1

A continuación, en base a los resultados que fuimos obteniendo, nos propusimos modular la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog mediante la estrategia de *shRNA* en CME y



estudiar su efecto sobre los niveles de ARNm de Sod1. Este abordaje es complementario al uso de la construcción reportera ya que disminuimos la expresión de los FT en lugar de expresarlos ectópicamente, y por otra parte, a diferencia de la construcción reportera, nos permite estudiar la regulación del gen en su contexto endógeno.

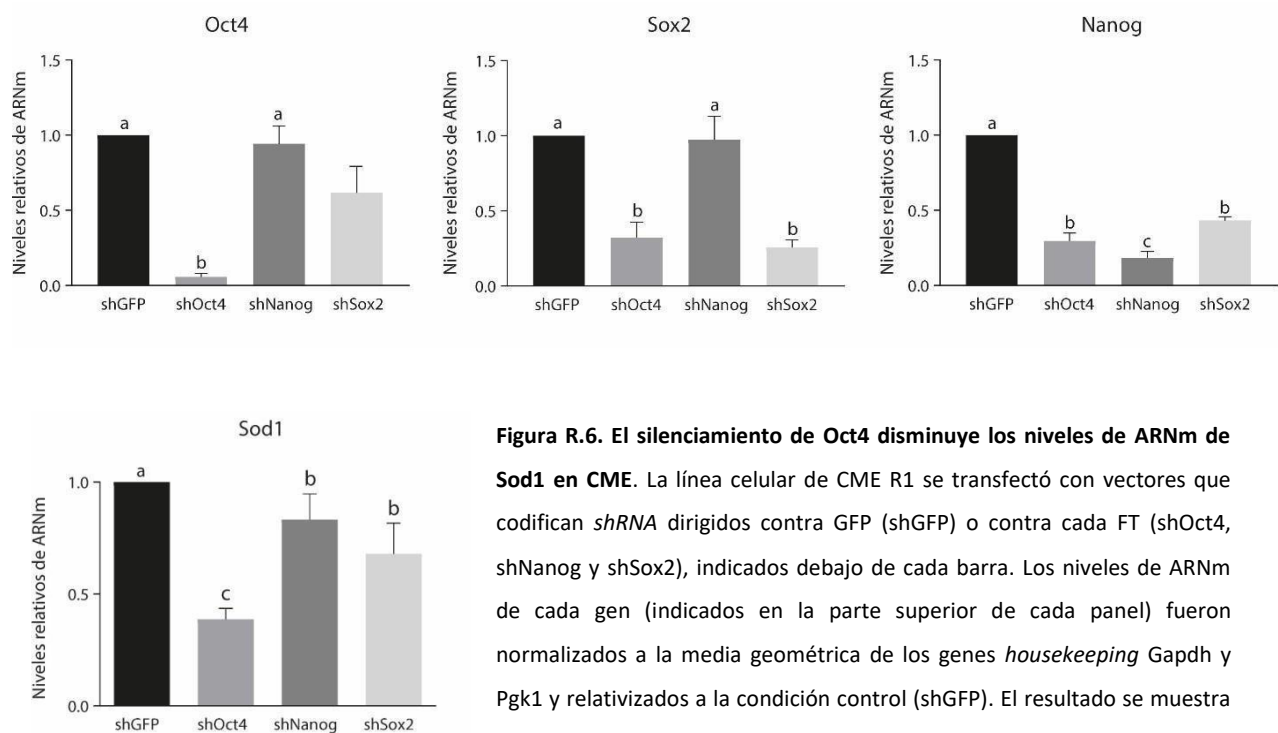
Para esto, transfectamos las CME con vectores conteniendo secuencias que permiten la transcripción de moléculas de *shRNA* dirigidas contra Oct4, Sox2, Nanog y también contra GFP, a modo de control. A las 24 horas de ser transfectadas, tratamos a las células con puromicina, con el fin de seleccionar aquellas que fueron transfectadas, debido a que el vector confiere resistencia a este antibiótico. Luego de 48 horas, extrajimos ARN total y analizamos los niveles de cada ARNm mediante RT-qPCR (figura R.5).



**Figura R.5.** Metodología utilizada para el estudio de la modulación del gen Sod1 por los FT de CMP mediante silenciamiento de éstos por *shRNA* en CME.

En primer lugar, verificamos la funcionalidad del sistema experimental estudiando los niveles de ARNm de cada uno de los factores. Como se observa en la figura R.6, cada *shRNA* produjo una importante disminución de los niveles de su correspondiente ARNm blanco. Asimismo, observamos que los niveles de ARNm de Nanog y de Sox2 también disminuyeron al transfectar con shOct4 y los de Nanog al transfectar el shSox2. Estos resultados eran esperados debido a que estos FT se regulan entre sí, por lo tanto, analizándolos en la ventana temporal adecuada pueden llegar a detectarse efectos regulatorios consecuencia de la disminución del FT blanco del *shRNA* específico. Habiendo comprobado el correcto funcionamiento de nuestro sistema, es decir, que cada *shRNA* disminuye la expresión de su

blanco específico, analizamos los niveles de ARNm de Sod1. Como se muestra en la figura R6, detectamos que los niveles del ARNm de Sod1 disminuyeron en todas las condiciones respecto al control, con un mayor efecto en las células transfectadas con shOct4. Especulamos que esta diferencia entre la respuesta a los distintos *shRNA* puede ser consecuencia de lo que comentamos anteriormente. En la ventana temporal analizada detectamos que la transfección de shOct4 es la que produce un mayor cambio en los niveles globales de estos tres FT.



**Figura R.6. El silenciamiento de Oct4 disminuye los niveles de ARNm de Sod1 en CME.**

La línea celular de CME R1 se transfectó con vectores que codifican *shRNA* dirigidos contra GFP (shGFP) o contra cada FT (shOct4, shNanog y shSox2), indicados debajo de cada barra. Los niveles de ARNm de cada gen (indicados en la parte superior de cada panel) fueron normalizados a la media geométrica de los genes *housekeeping* Gapdh y Pgk1 y relativizados a la condición control (shGFP). El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar. Las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas mediante prueba de Tukey.

Estos resultados, de manera consistente con los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de Sod1 durante la diferenciación y en el análisis de la construcción reportera pSod1-Luc, sugieren que los FT de CMP podrían inducir la expresión de Sod1, indicando la existencia de una relación entre estos factores y el sistema de defensa frente al estrés oxidativo en CME.

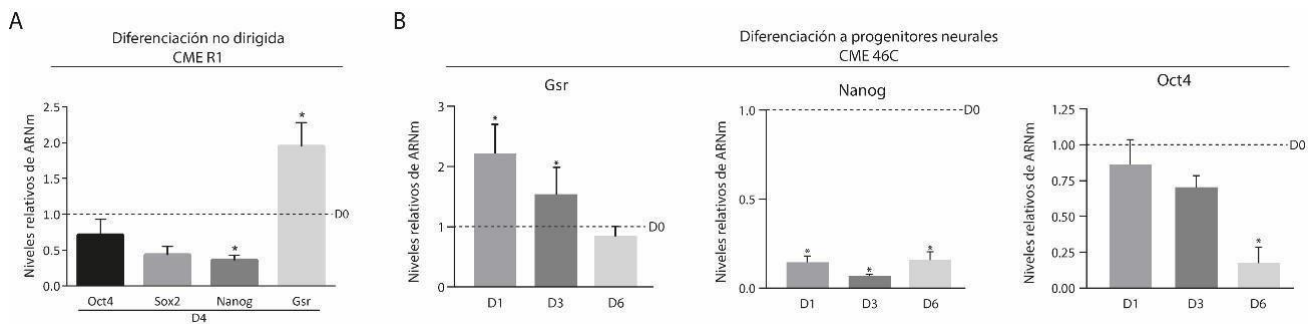
### Expresión del gen de Gsr en CME

A continuación, nos propusimos explorar si los FT de pluripotencia regulan el gen de Gsr. Como ya mencionamos, esta enzima es responsable de mantener los niveles de GSH/GSSG, siendo GSH una molécula fundamental en la homeostasis redox celular [108].

En primer lugar, estudiamos su expresión en CME en estado indiferenciado y luego de la diferenciación. Para esto, analizamos los niveles de ARNm del gen de Gsr, mediante RT-qPCR, usando el protocolo de diferenciación no dirigido descrito previamente. Es interesante mencionar que, si bien los FT disminuyen cuando las CME se diferencian, no lo hacen todos con la misma dinámica temporal. Particularmente, a día 4 de la diferenciación ya se puede ver que Nanog disminuyó su nivel de expresión significativamente y que de hecho lo hace en las primeras 24 horas de diferenciación [137], no así Oct4 y Sox2 cuyos valores, si bien muestran una tendencia a disminuir, pueden presentar niveles variables y que esa disminución no sea aún significativa.

Como se muestra en la figura R.6, y de forma contraria a lo que esperábamos, dado que el sistema de defensa frente a las ROS se encuentra exacerbado en el estado indiferenciado y disminuye en la diferenciación, observamos que los niveles de ARNm del gen Gsr aumentaron significativamente al día 4 de la diferenciación. Si bien los niveles de ARNm de Oct4 resultaron similares al control y los de Sox2 mostraron una suave tendencia, los de Nanog disminuyeron significativamente, confirmando que las células comenzaron a diferenciarse. Con este resultado, advertimos que los niveles de ARNm de Gsr presentaban un patrón opuesto a los de Nanog, lo que nos resultó interesante. Más aún, el análisis de la expresión de Gsr y de Nanog a lo largo de otro protocolo de diferenciación realizado en el laboratorio, dirigido a progenitores neurales, también mostró una relación inversa en la expresión de estos genes en los puntos más tempranos de la diferenciación (figura R.7B). Específicamente, Gsr aumentó su

expresión a día 1 y 3 respecto a las células indiferenciadas (día 0) y Nanog disminuyó a partir del día 1. Sin embargo, Oct4 no presentó disminución significativa hasta el día 6. La diferenciación hacia progenitores neurales se realizó en línea reportera de CME 46C. Estas células expresan la proteína fluorescente GFP bajo control del promotor de Sox1, marcador de neuroectodermo [138], lo cual nos permite monitorear la correcta diferenciación hacia ese linaje mediante análisis de la fluorescencia.



**Figura R.7. Los niveles de ARNm de Gsr aumentan durante la diferenciación en CME.** Las CME de la línea indicada en la figura fueron cultivadas bajo condiciones estándar (D0) o sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigida (A) o dirigida a progenitores neurales (B). Se extrajo ARN a días 0 (D0) y a los días indicados en cada caso luego de la inducción de la diferenciación y los niveles de expresión de cada gen fueron medidos por RT-qPCR. Los niveles de ARNm fueron normalizados a la media geométrica de los genes *housekeeping* *Gapdh* y *Pgk1* y relativizados a la condición control (D0: línea de puntos). Adaptados de [139]. Todos los resultados de la figura se muestran como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (D0) ( $p < 0.05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar.

## Análisis de la existencia de sitios de unión putativos para los FT de CMP y de su interacción en la región promotora del gen de Gsr

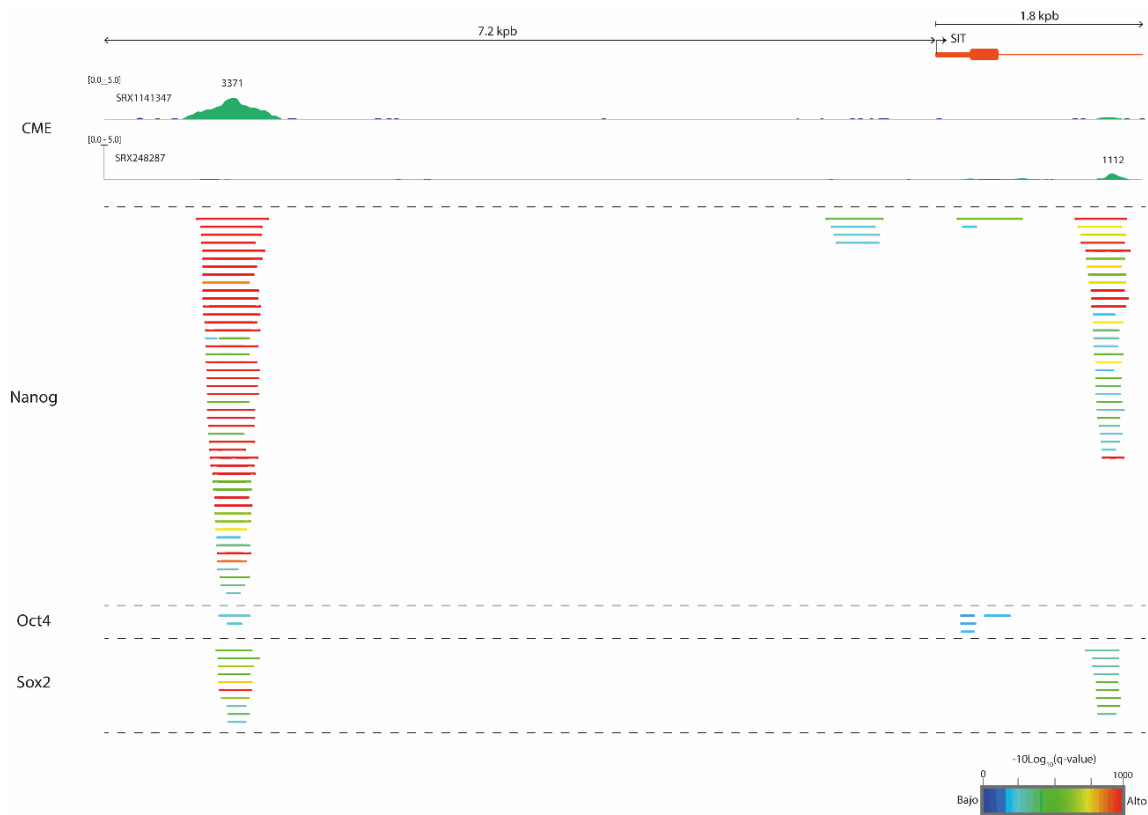
Como habíamos observado previamente, el *locus* de *Gsr* contiene sitios de unión para los FT de pluripotencia. En la tabla R.2 se muestra la cantidad de sitios de unión putativos para dichos FT, su posición y las secuencias consenso detectadas.

Factor de transcripción	Posición		Secuencia
	Desde	Hasta	
Oct4	-1872	-1890	gccactgGCATtaaaggtg
	-2369	-2387	cttattgGCATatctaaag
	-2434	-2452	atctttaACATtacaatcta
	-2570	-2588	cacgtgtGCATgcatgtgc
	-3322	-3340	gagatgtGCATgctgggaa
	-3730	-3748	gctgtatGCATgaatcctg
	-3768	-3786	cttgttGCATttataata
	-3868	-3886	catctatGCATggcctctg
Nanog	-523	-541	aatcattAATGgttcccaa
	-808	-826	gccgctgAATGtttaaaag
	-1421	-1439	taacctgAATGgatgatag
	-2387	-2405	tggaattAATGgatgcaac
	-2531	-2549	tagatgtAATGggttttt
	-2552	-2570	tagtgtgAATGtgtgtgtg
	-3405	-3423	caacttAATGtgcaagc
	-3612	-3630	gcaaggAATGgggagaag
Sox2	-4777	-4801	ggctaACAAagttgctcctcttt
Stem*	-3906	-3924	agtgtgGCAGaaaaatgc

**Tabla R.2. El promotor de Gsr posee sitios de unión putativos para los FT de CMP.** Tabla de la ubicación de sitios de unión putativos para los FT de CMP en una región de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen (+1) de Gsr. <https://www.genomatix.de/matinspector>. En letras mayúsculas y de color rojo se muestra la secuencia consenso. \*Sitio de unión compuesto para Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 (Tcf7l1) y Sall4b.

Para estudiar si hay evidencias de interacción física de Nanog con el *locus* de Gsr, analizamos datos de experimentos de ChIP-seq realizados en CME y que se encuentran accesibles, nuevamente mediante la herramienta ChIP-Atlas [135]. Investigamos el *locus* del gen de Gsr en experimentos en que se había inmunoprecipitado con anticuerpos que reconocen Nanog y encontramos lecturas de unión de este FT, tanto en la región inmediatamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción (SIT) como en el primer intrón (figura R.8A). También detectamos una gran cantidad de lecturas significativas de pegado de Nanog alrededor de las 6,5 kpb río arriba del SIT (R.8B). Esto evidencia la interacción de este FT en el *locus* genómico del gen Gsr en CME, probablemente en regiones regulatorias.

Como se muestra en la figura, detectamos datos que muestran también lecturas de pegado de Oct4 y Sox2 en CME; sin embargo, destacamos que la unión de Nanog se ve reflejada en una cantidad de datos mucho mayor que para los otros FT y además con una intensidad de pegado más alta.

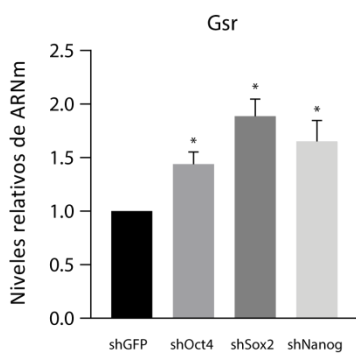
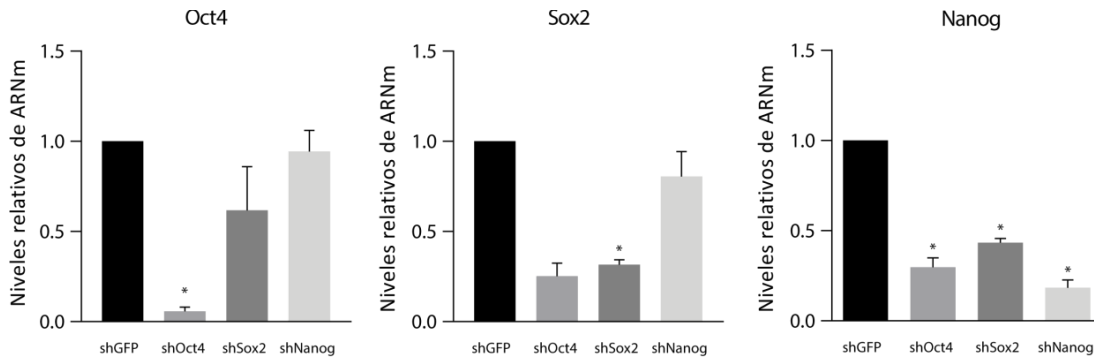


**Figura R.8. Los FT de CMP interactúan con regiones del *locus* de *Gsr* en CME.** (A) Se muestran los resultados del análisis obtenido mediante ChIP-Atlas sobre *locus* genómico del gen de *Gsr* a partir de datos provenientes de experimentos independientes de ChIP-seq. Los picos y los números arriba corresponden a las lecturas significativas de las regiones que fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo contra Nanog. Los números del eje Y indican la cantidad de lecturas normalizadas al total de lecturas mapeadas (“*reads per million mapped reads*”). SIT: sitio de inicio de la transcripción. (B) Se muestra una región más extensa que en el panel A y resultados de experimentos de ChIP-seq con anticuerpos contra Nanog, Oct4 o Sox2, según se indica a la izquierda de la figura. Cada uno de los rectángulos corresponde a un experimento diferente y muestra las regiones genómicas con lecturas significativas de ChIP-seq para los FT indicados. La escala de colores indica la cantidad de lecturas significativas

## Modulación del gen de Gsr en condición de silenciamiento de los FT de pluripotencia

El patrón de expresión opuesto entre Nanog y Gsr observado en ambos protocolos de diferenciación y la evidencia de una mayor interacción de este FT en el *locus* genómico de Gsr en CME con respecto a los otros FT, originalmente nos llevó a estudiar si la disminución de la expresión de Nanog, mediante la estrategia de *shRNA* descrita previamente, afectaba los niveles de ARNm de Gsr en CME. Sin embargo, posteriormente encontramos que en etapas en que no variaban los niveles de Oct4 y Sox2, sí lo hacían otros parámetros como su distribución y dinámica de interacción con la cromatina [137]. Este hallazgo nos permitió inferir que, aunque los niveles de expresión de los otros FT no sigan el mismo patrón, y que no se detecte su disminución durante etapas tempranas cuando Gsr aumenta, la función de Oct4 y Sox2 sí podría estar viéndose afectada. Por esta razón, decidimos ampliar el estudio, evaluando la modulación del gen de Gsr en condición de silenciamiento para Oct4 y Sox2, además de silenciamiento de Nanog.

Como describimos anteriormente, transfectamos CME con vectores que codifican para un *shRNA* dirigido contra cada uno de los FT (*shOct4*, *shSox2* y *shNanog*, respectivamente) y por otra parte otro contra GFP, a modo de control; seleccionamos las células transfectadas y luego analizamos la expresión de los genes mediante RT-qPCR. Como mostramos en la figura 9, los niveles de ARNm de cada FT disminuyeron con su *shRNA* específico validando el sistema y, de manera coincidente con lo observado en la diferenciación, los niveles de ARNm de Gsr aumentaron significativamente al silenciar Nanog, como así también al silenciar Oct4 o Sox2.



**Figura R.9. El silenciamiento de los FT de CMP aumenta los niveles de ARNm**

**de Gsr en CME.** La línea celular de CME R1 se transfectó con vectores que codifican *shRNA* dirigidos contra GFP (shGFP) o contra cada FT (shOct4, shNanog y shSox2), indicados debajo de cada barra. Los niveles de ARNm de cada gen (indicados en la parte superior de cada panel) fueron normalizados a la media geométrica de los genes *housekeeping* *Gapdh* y *Pgk1* y relativizados a la condición control (shGFP). El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar.

Nuestros resultados sugieren que los FT de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog regulan negativamente la transcripción del gen de Gsr, sumando evidencia a la existencia de una relación regulatoria entre los FT de pluripotencia y el sistema de defensa frente al estrés oxidativo.



## Parte III: HO-1

Buscando otros posibles genes relacionados con la defensa frente al estrés oxidativo cuya regulación no hubiese sido aún estudiada en CMP, surgió el gen Hemo oxigenasa (HO) cuya principal función es intervenir en el catabolismo oxidativo del grupo hemo. Como mencionamos previamente, una de sus isoformas, HO-1, se destaca por sus funciones citoprotectoras, anti-inflamatorias, inmunomodulatorias y pro-angiogénicas. Si bien se describió inicialmente como una enzima microsomal anclada al retículo endoplasmático, posteriormente se la encontró además en mitocondrias y caveolas [140]–[142]. Sin embargo, estudios recientes demostraron que HO-1 puede translocar al núcleo y se especula que puede regular la actividad de factores de transcripción, actuando así de manera independiente de su función enzimática [124], [143], [144]. No obstante, la función de HO-1 en el núcleo no es del todo clara, por lo que representa un interesante tema de estudio.

Por otro lado, respecto a HO-1 en células madre, si bien hay numerosos estudios que describen su potencial rol en la diferenciación, la gran mayoría son en células madre multipotentes, tales como hematopoyéticas y mesenquimales [114]. Durante el desarrollo de esta tesis, surgieron evidencias del rol de HO-1 en la diferenciación de CME. Suliman *et al.* encontraron que HO-1 es necesaria para la diferenciación y posterior maduración de cardiomiocitos [128]; Lai *et al.* demostraron que la falta de HO-1 aumenta la expresión de genes de mesodermo durante diferenciación mediante formación de cuerpos embrioides, postulando un rol crítico de esta enzima en la diferenciación hacia este linaje celular [129]; Stepniewski *et al.* demostraron que la falta de HO-1 disminuye la eficiencia de reprogramación para la obtención de CMPi y además afecta la diferenciación de CMP hacia linaje cardíaco [130].

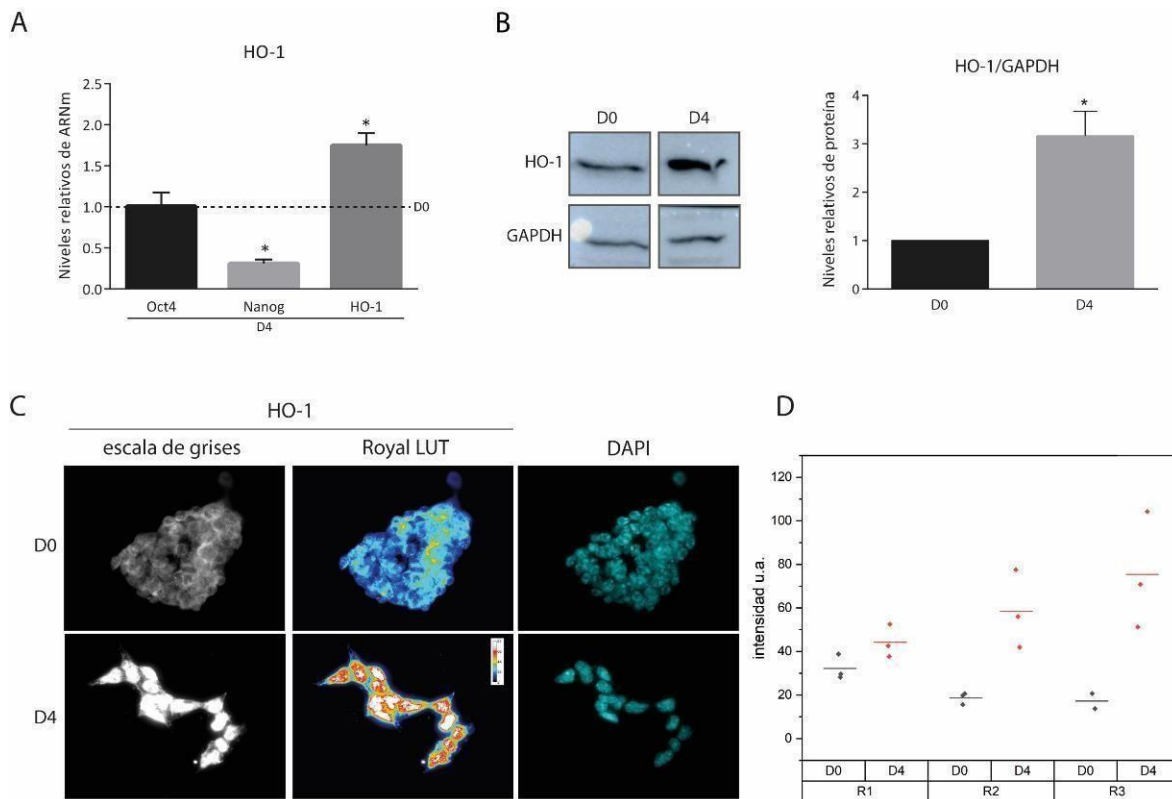
Estos trabajos evidencian un rol de HO-1 durante la diferenciación, sin embargo, aún no se ha identificado el mecanismo involucrado ni se ha estudiado la regulación de su gen en CMP. Nos propusimos entonces estudiar la regulación de la expresión de HO-1 y su relevancia en CME.

## 1. Caracterización de la expresión y estudio de la regulación de HO-1 en CME

### Expresión de HO-1 en CME en estado indiferenciado y durante la diferenciación

En primer lugar, estudiamos la expresión de HO-1 en la línea de CME W4, en su estado indiferenciado y en su diferenciación mediante el protocolo no dirigido previamente descrito. Determinamos los niveles de ARNm mediante RT-qPCR tanto de HO-1 como de Oct4 y Nanog, a modo de control de la diferenciación (figura R.10A). Como ya mencionamos, la expresión de Nanog disminuye inmediatamente al inicio de la diferenciación; sin embargo, los niveles de Oct4 se mantienen constantes durante las primeras 48 horas y pueden tardar en disminuir durante los días siguientes según el proceso de diferenciación que tenga lugar.

A su vez, estudiamos los niveles proteicos de HO-1 mediante *Western blot* (WB) (figura R.10B). Como mencionamos anteriormente, está reportado que esta proteína, cuya actividad enzimática descrita ocurre en el citoplasma, también puede encontrarse en núcleo. Si bien algunos estudios sugieren que HO-1 podría estar involucrada en la regulación de la expresión génica, aún no se sabe cuál podría ser el mecanismo involucrado ni su función en este compartimento. Por esta razón decidimos estudiar también su localización subcelular mediante IF (figura R.10 C y D). Como se muestra en la figura R.10, observamos que HO-1 se expresa en CME indiferenciadas y se encuentra presente tanto en el citoplasma como en el núcleo. En la figura R.10D se puede observar que, si bien la magnitud del aumento de intensidad de la señal de HO-1 es diferente en las distintas réplicas analizadas, como es esperado para un sistema de alta variabilidad como es un protocolo de diferenciación no dirigido, en todas las réplicas se detecta un aumento al comparar D4 con D0. De manera consistente con los resultados de RT-qPCR y WB, durante la diferenciación detectamos los niveles de HO-1 aumentados.

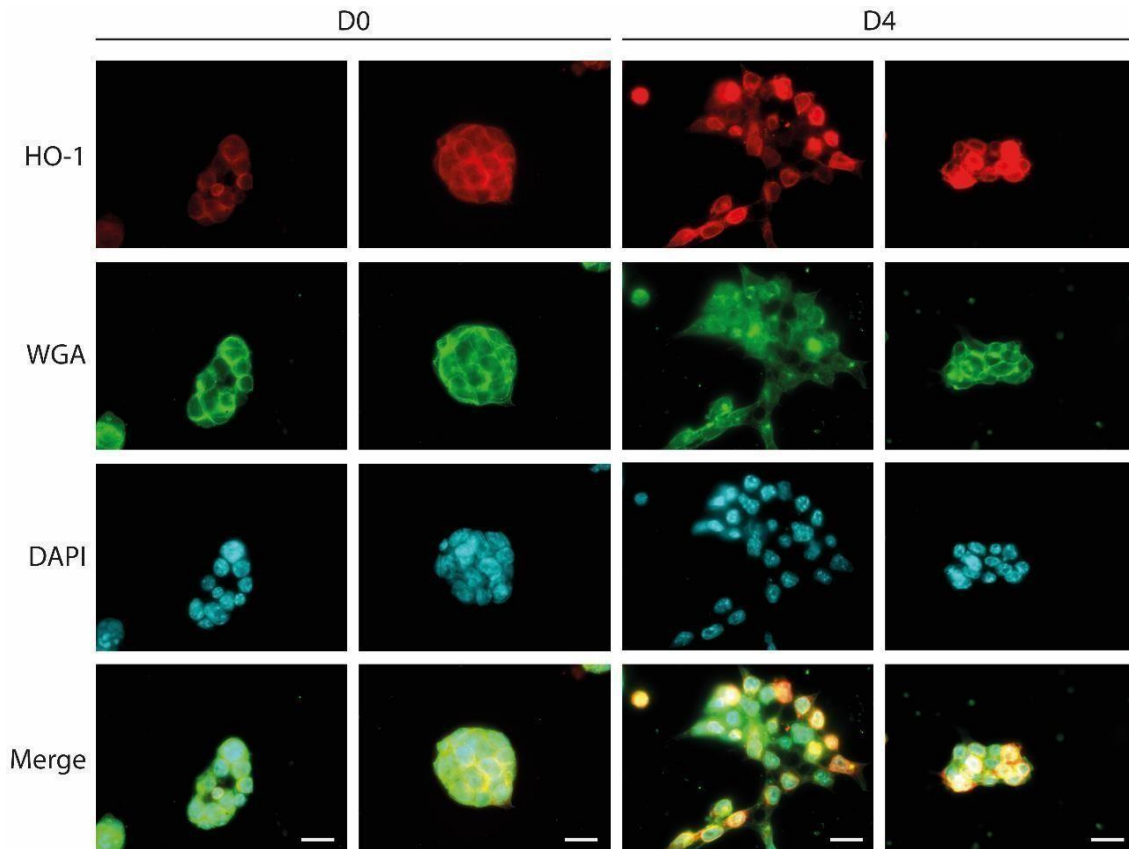


**Figura R.10. HO-1 se expresa en CME y sus niveles aumentan durante la diferenciación.** Análisis de la expresión de HO-1 en CME mediante RT-qPCR, Western blot e inmunofluorescencia (IF). Las CME de la línea W4 fueron cultivadas bajo condiciones estándar (en presencia de LIF+2i, D0) o sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigido, en ausencia hasta cuatro días (D4). (A) Los niveles de ARNm fueron normalizados por la media geométrica de los genes *housekeeping* Gapdh y Pgc1 y relativizados a la condición control (células indiferenciadas: D0, línea punteada). El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar. (B) Evaluación de los niveles de proteína HO-1 mediante WB. Se muestra un *blot* representativo de réplicas. El gráfico indica la cuantificación de la intensidad de banda de HO-1 normalizada con la intensidad de banda de su correspondiente GAPDH y referido a la condición control (D0). Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), determinadas por un test *t de student*. (C) Los niveles de proteína de HO-1 (escala de grises y Royal LUT) y su localización subcelular fueron visualizados mediante IF. Los núcleos se encuentran marcados con DAPI (cian). (D) Cuantificación de la intensidad de señal de HO-1 entre D0 y D4, discriminado según réplicas. La intensidad de la señal de HO-1 fue cuantificada utilizando el *software* ImageJ.

Dado que el citoplasma de estas células en su estado indiferenciado es muy pequeño en relación con el núcleo y resulta difícil de diferenciar sin una marcación especial, también

realizamos una tinción complementaria usando un marcador de membrana, WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) asociado al fluoróforo Alexa-488. Este compuesto es una lecitina que se une a azúcares presentes en glicoproteínas de la membrana plasmática. De esta manera, esperábamos que al teñir la membrana pudiésemos mejorar la interpretación de las imágenes en las células indiferenciadas para poder cuantificar la señal del citoplasma y calcular la relación de la señal entre núcleo y citoplasma. Aunque no pudimos realizar este análisis cuantitativo en las células indiferenciadas, estos experimentos nos permitieron observar que el aumento en la intensidad de señal de HO-1 también ocurría en el núcleo de las CME luego de la diferenciación (figura R.11).

Al hacer la superposición de colores entre los distintos canales, en las células indiferenciadas observamos que se superpone la señal roja y verde de HO-1 y WGA respectivamente. Esto ocurre porque el citoplasma es tan compacto que la señal de la membrana invadió el citoplasma en estos experimentos. Para obtener una marcación más precisa planeamos repetir estos experimentos con menores cantidades de marcador. De todos modos, estas imágenes permitieron ver que la superposición entre rojo y cian es mayor en las células en el día 4 de la diferenciación que en las indiferenciadas. Esto sugiere fuertemente que además de aumentar los niveles de HO-1 durante la diferenciación, aumenta cualitativamente la relación HO-1 nuclear/HO-1 citoplasmática.



**Figura R.11. HO-1 se expresa en CME y sus niveles aumentan en núcleo y citoplasma durante la diferenciación.** Análisis de la expresión de HO-1 en CME mediante inmunofluorescencia (IF). Las CME de la línea W4 fueron cultivadas bajo condiciones estándar (en presencia de LIF+2i, D0) o sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigido, en ausencia de LIF y 2i durante cuatro días (D4). Los niveles de proteína de HO-1 (rojo) y su localización subcelular fueron visualizados mediante IF. La membrana celular se encuentra marcada con WGA asociado al fluoróforo Alexa-488 (verde) y los núcleos se encuentran marcados con DAPI (cian). Barra de escala: 20µm.

### Análisis de la existencia de sitios de unión putativos para los FT de CMP en la región promotora del gen de HO-1

Debido al patrón de expresión encontrado que mostró un aumento de HO-1 durante la diferenciación, nos interesó estudiar la regulación de este gen por los FT de CMP. En primer lugar, realizamos un análisis *in silico* mediante el uso de la herramienta *MatInspector*, como hicimos previamente para los genes *Sod1* y *Gsr* y observamos que *Hmox1* posee varios sitios putativos de unión para estos FT. Si bien no encontramos sitios para todos los FT, sí encontramos varios para Oct4, Nanog y un sitio *stem*, donde se unen tanto Oct4 como Sox2 y

Nanog. En la tabla R.3 podemos ver la cantidad de sitios de unión putativos para dichos FT, su posición y las secuencias consenso postuladas.

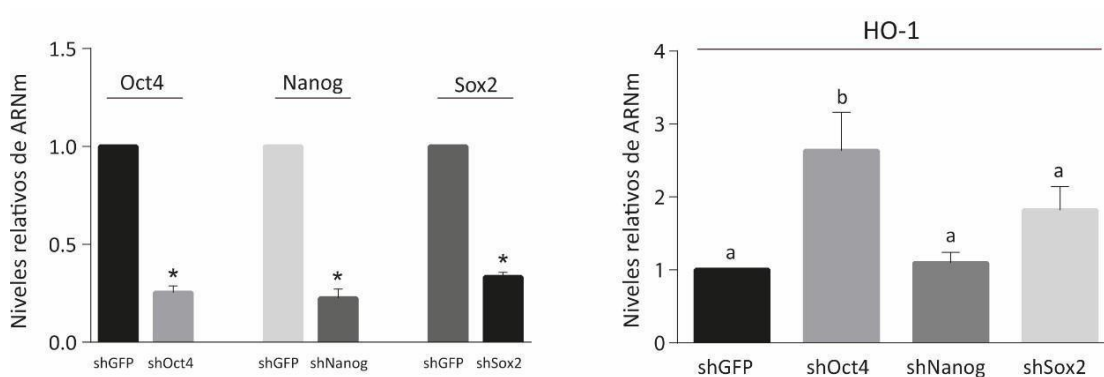
Factor de transcripción	Posición		Secuencia
	Desde	Hasta	
Oct4	-183	-201	attattgGCATaagcactg
	-287	-305	cccacccGCATcacatctt
	-815	-833	atactgtGCATttaagccc
	-1524	-1526	tgccctgtGCATctcagcct
	-2833	-2851	gttgctGCATgccgggtg
	-3119	-3137	tgactaCCATgactcgct
	-3792	-3810	tatgtatGCATgattcat
	-4569	-4587	cccaccaGCATctcaatt
Nanog	-2995	-3013	agaggggAATGggatggcc
	-3788	-3806	cagcatgAATGcatgcata
	-3978	-3996	ttaaggAATGtgccatca
	-4697	-4715	agatctgAATGagttgctt
Stem*	-383	-401	cccttatGCACgtcaaagg

**Tabla R.3. El promotor de HO-1 posee sitios de unión putativos para los FT de CMP.** Tabla con la ubicación de sitios de unión putativos para los FT de CMP en una región de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen de HO-1 (Hmox1). En letras mayúsculas y de color rojo se muestra la secuencia consenso. \*Sitio de unión compuesto para Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 (Tcf7l1) y Sall4b.

### Modulación de HO-1 en condiciones de silenciamiento de los FT de pluripotencia

En base a estos resultados decidimos estudiar el efecto de disminuir la expresión de los FT de CMP sobre los niveles de ARNm de HO-1. Para esto utilizamos nuevamente la estrategia de *shRNA* en CME. Transfectamos las CME con vectores de *shRNA* dirigidos contra Oct4, Sox2, Nanog o contra GFP a modo de control, seleccionamos las células transfectadas y luego analizamos los niveles de expresión mediante RT-qPCR, tal como describimos previamente (figura R.6). Como podemos ver en la figura R.12, los niveles de ARNm de Oct4, Nanog y Sox2 disminuyeron con el *shRNA* específico para cada uno, demostrando el correcto silenciamiento y por lo tanto, validando el sistema experimental. Al analizar el efecto sobre los niveles de

ARNm de HO-1 encontramos que éstos aumentaron significativamente en las células transfectadas con el *shRNA* dirigido contra Oct4 (figura R.12), sugiriendo que Oct4 podría reprimir Hmox1. Destacamos que en ninguna de las otras condiciones experimentales se modificaron los niveles de ARNm de HO-1, sugiriendo que la transcripción de Hmox1 no estaría afectada por Nanog ni Sox2, o al menos no fue suficiente el nivel de silenciamiento alcanzado para evidenciar un efecto.

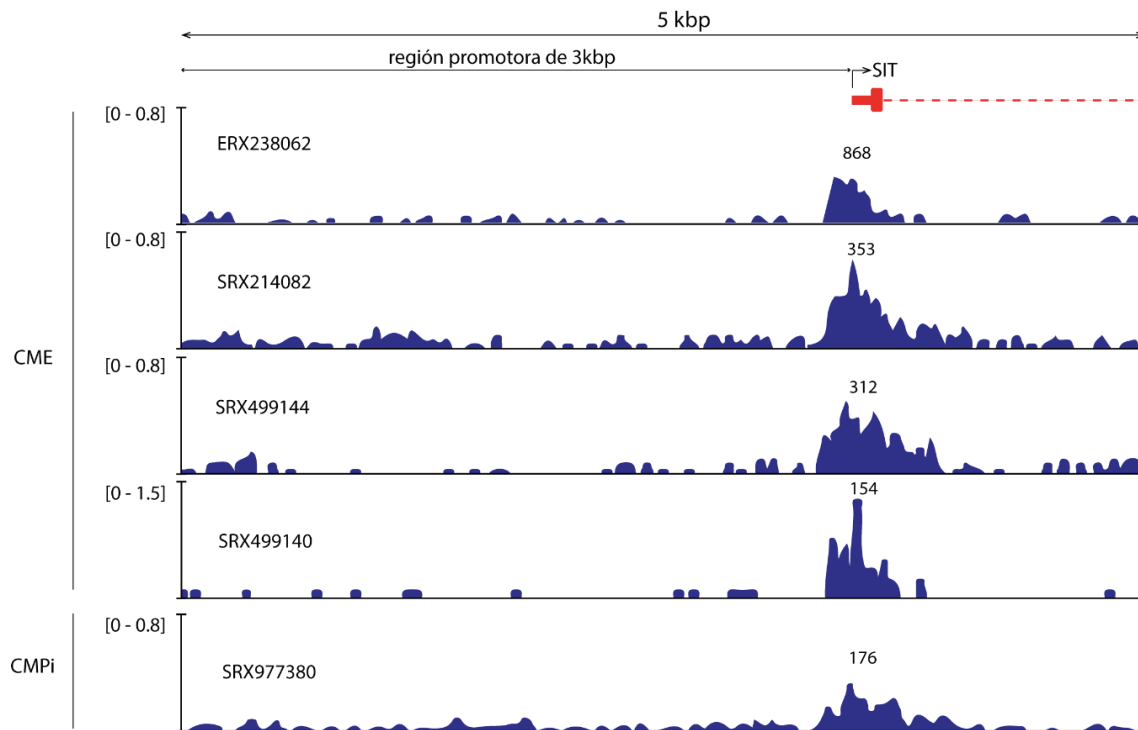


**Figura R.12. El silenciamiento de Oct4 produce un aumento de los niveles de ARNm de HO-1 en CME.** La línea celular de CME W4 se transfectó con vectores que expresan *shRNA* dirigidos contra los FT fundamentales de CMP y contra GFP como control (indicados debajo de cada barra). Los niveles de ARNm fueron normalizados a la media geométrica de los genes *housekeeping* *Gapdh* y *Pgk1* y relativizados a la condición control (shGFP). El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control y las distintas letras representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar. Las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas mediante prueba de Tukey.

### Análisis de la interacción de los FT de CMP en la región promotora del gen de HO-1

Para evaluar si Oct4 interactúa con Hmox1 analizamos datos experimentales de ChIP-seq en CME para este TF en el *locus* de Hmox1.

Como mostramos en la figura R.13, encontramos que efectivamente Oct4 se une al promotor de Hmox1, no solamente en CME sino también en CMPi. Esto apoya nuestra hipótesis sobre la regulación de la expresión de HO-1 por este FT en CMP.



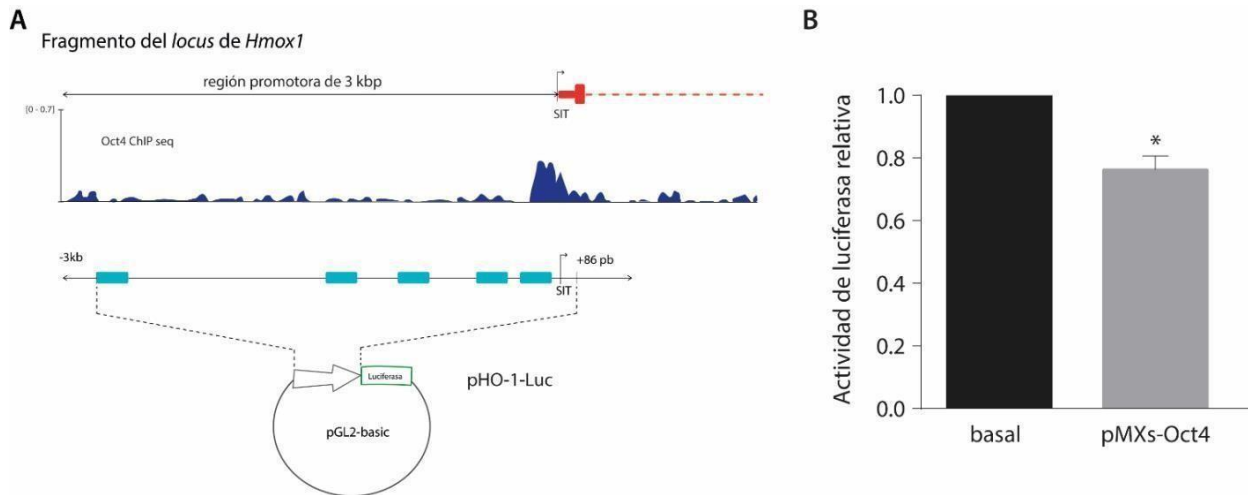
**Figura R.13. Oct4 interactúa con el locus de Hmox1 en CMP.** Se muestran los resultados del análisis obtenido mediante ChIP-Atlas sobre locus genómico del gen de HO-1 a partir de datos provenientes de experimentos de ChIP-seq en CME y en CMPi. Los picos y los números arriba corresponden al número de lecturas significativas de las regiones que fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo contra Oct4. Los números del eje Y indican la cantidad de lecturas normalizadas al total de lecturas mapeadas (“reads per million mapped reads”). SIT: sitio de inicio de la transcripción.

### Efecto de los FT de CMP sobre la actividad de la región promotora de HO-1

En base al efecto encontrado al silenciar Oct4 y a la evidencia de su unión en el locus Hmox1, decidimos evaluar el efecto de este FT sobre el promotor del gen de HO-1 mediante un vector reportero pHO-1-Luc que posee un fragmento del promotor del gen de HO-1, de aproximadamente 3000 pb que contiene una de las regiones donde interactúa Oct4, río arriba del gen que codifica para la enzima luciferasa (figura R.14). Co-transfectamos este vector junto con un vector codificante para Oct4 en la línea celular de fibroblastos embrionarios NIH/3T3 que, como ya mencionamos previamente, no presenta niveles detectables de los FT de pluripotencia. Como podemos ver en la figura R.14B y de forma consistente con nuestros



resultados anteriores, Oct4 reprimió la actividad del vector reportero, sugiriendo fuertemente que este FT regula negativamente la transcripción del gen de HO-1.

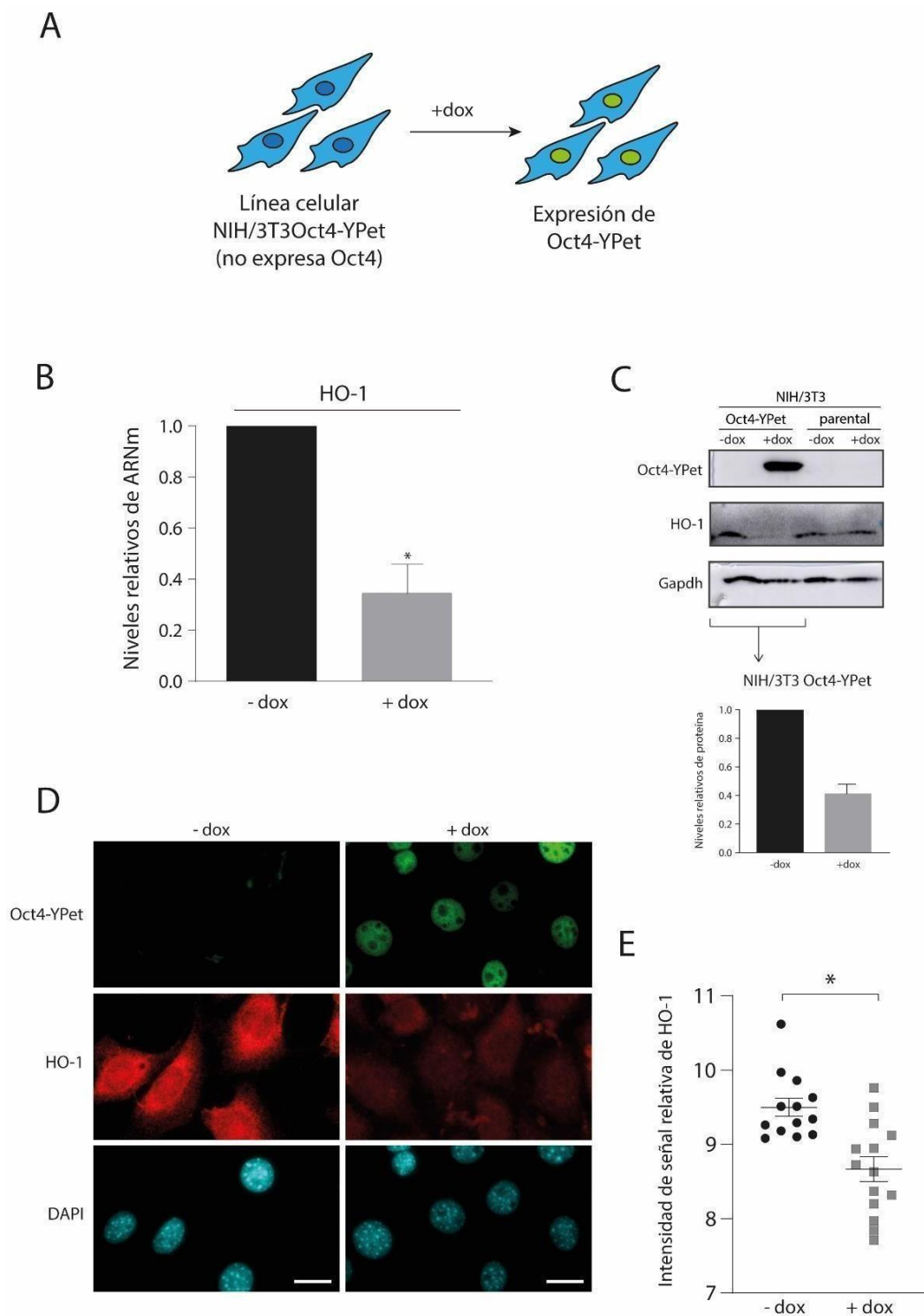


**Figura R.14. Oct4 disminuye la actividad de luciferasa de la construcción reportera pHO-1-Luc.** (A) Esquema representativo de la construcción reportera y su paralelo con los resultados del ChIP Atlas mostrados en la figura anterior. Los rectángulos celestes representan los sitios de unión putativos para Oct4 que fueron encontrados usando la herramienta digital MatInspector. (B) Células de la línea NIH/3T3 fueron transfectadas con pHO-1-Luc, pRL-TK y 0 (basal) y 200 ng del vector pMXs-Oct4, según se indica. El análisis de la actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* de pHO-1-Luc fue normalizada a la actividad de luciferasa de *Renilla reniformis* y relativizada a la condición basal. El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas respecto al basal ( $p < 0.05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar. Las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas mediante prueba de Tukey. SIT: sitio de inicio de la transcripción.

### Efecto de la inducción de la expresión de Oct4 en un sistema heterólogo sobre la expresión de HO-1

El ensayo de luciferasa realizado en un sistema heterólogo es muy útil ya que permite estudiar un efecto en una porción específica del promotor del gen de interés. Sin embargo, la construcción no se encuentra inmersa en el contexto genómico endógeno, por lo que los resultados obtenidos en estos sistemas pueden diferir de la regulación del gen endógeno. Por

esta razón, para complementar los resultados anteriores, utilizamos un nuevo sistema heterólogo generado en nuestro laboratorio, derivado de la línea NIH/3T3 usada para el ensayo de luciferasa, que expresa el FT Oct4 fusionado a una proteína fluorescente (YPet) de manera inducible por doxiciclina (doxi). En esta nueva línea celular, la expresión de Oct4 es indetectable en condiciones basales y es inducida mediante tratamiento con doxi (figura R.15A). La localización y función de Oct4 no se encuentra alterada por esta fusión [137], [145], [146], por lo que esta línea celular es útil para estudiar la función de este FT en un sistema controlado y nos permite evaluar el efecto de Oct4 sobre el gen endógeno de HO-1. Luego de incubar las células con doxi (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) por 48 horas, condiciones de inducción puestas a punto previamente en nuestro laboratorio (manuscrito en preparación), extrajimos ARN y proteínas para estudiar el efecto de la inducción de Oct4 sobre la expresión de Hmox1 mediante RT-qPCR y WB, respectivamente, y por otra parte, fijamos las células para analizarlo también mediante IF. Como mostramos en la figura R.15 y de manera consistente con los resultados obtenidos, tanto en el experimento de silenciamiento como en el ensayo de luciferasa, observamos que la inducción de Oct4 reprimió la expresión del gen de HO-1, visualizado tanto a nivel de ARNm (figura R.15B) como a nivel proteína (figura R.15C - E). La cuantificación de la señal mostró diferencias significativas en la intensidad de señal de HO-1 al expresar Oct4-YPet respecto al control (figura R.15E).



**Figura R.15. La inducción de Oct4 en un sistema heterólogo reprime la expresión del gen de HO-1.** La línea celular de fibroblastos embrionarios NIH Oct4-YPet fue incubada o no por 48 horas con doxi (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) para inducción de Oct4-YPet y luego se analizó la expresión de HO-1. (A) Análisis de los niveles de ARNm de HO-1 y Oct4 mediante RT-qPCR. Los

mismos fueron normalizados por la media geométrica de los genes *housekeeping* Gapdh y Pgk1 y relativizados a la condición control (-dox). El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. El asterisco representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar. (B) Evaluación de los niveles de proteína HO-1 y Oct4 mediante WB. Los números indican la cuantificación de la intensidad de banda de HO-1 normalizada con la intensidad de banda de su correspondiente GAPDH y referido a la condición control (-dox). (C) La proteína Oct4-YPet fue visualizada mediante microscopía de fluorescencia (verde) y HO-1, mediante IF (rojo). Para la visualización del núcleo utilizamos tinción con DAPI. Barra de escala: 20  $\mu$ m. (E) La intensidad de fluorescencia de la señal de HO-1 en la IF fue cuantificada con el software ImageJ. En el gráfico *dot plot* está representada la media de la intensidad de fluorescencia  $\pm$  SEM. Cada punto corresponde a un campo distinto. El asterisco indica diferencias significativas y el p valor fue calculado mediante test de ANOVA ( $p < 0,01$ ).

En conjunto, nuestros resultados demuestran que Oct4 reprime la expresión de Hmox1. Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que, durante la diferenciación, detectamos que los niveles de HO-1 aumentan antes de que la expresión de Oct4 disminuya significativamente. Para analizar esto, debemos tener en cuenta que siempre se estudiaron típicamente los niveles de expresión de los FT; sin embargo, como mencionamos en la Introducción, actualmente se conoce que hay otros parámetros que impactan en su función. Nuestro grupo encontró que, en la ventana temporal en la que los niveles de Oct4 permanecen constantes, específicamente durante las primeras 48 horas de diferenciación, se modifican su distribución subnuclear y la dinámica de su interacción con la cromatina, lo cual probablemente esté alterando su función [137].

## 1. Exploración del rol nuclear de HO-1

Como mencionamos anteriormente, si bien HO-1 realiza su actividad enzimática asociada al retículo endoplasmático, hay antecedentes en la literatura que sugieren que HO-1 tiene una función nuclear diferente de su función enzimática clásica [147] y podría estar involucrada en la regulación de la expresión génica [143], [144]. Por otro lado, como también detallamos en la introducción, está reportado que HO-1 podría tener un rol relevante en la diferenciación de CMP [129], [130]. Durante el desarrollo de la primera parte del estudio de HO-1 en CME en esta tesis, encontramos que no sólo la expresión de HO-1 aumentaba

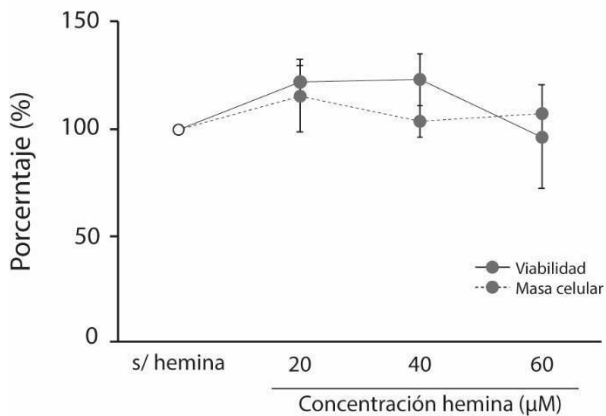
durante la diferenciación, sino que detectamos la presencia de esta proteína en el núcleo celular en todos los casos y nuestros resultados cualitativos sugieren que la intensidad nuclear aumenta durante la diferenciación (figura R.10 y 11). Estas evidencias nos llevaron a plantear la hipótesis de que HO-1 tiene una función nuclear y está involucrada en la regulación de genes relevantes para la diferenciación de CMP, pudiendo ser éste uno de los mecanismos involucrados en su rol en la diferenciación.

Para explorar esta hipótesis, nos propusimos evaluar el efecto de la modulación del gen de HO-1 sobre parámetros relevantes en la diferenciación tales como la expresión y función de los FT de pluripotencia y la organización dinámica de la cromatina. En esta tesis comenzamos por estudiar específicamente la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog y la distribución de la proteína HP1, utilizada como un indicador de la estructura de la cromatina a nivel global.

### **Efecto del aumento de HO-1 sobre los niveles de expresión de los FT de pluripotencia**

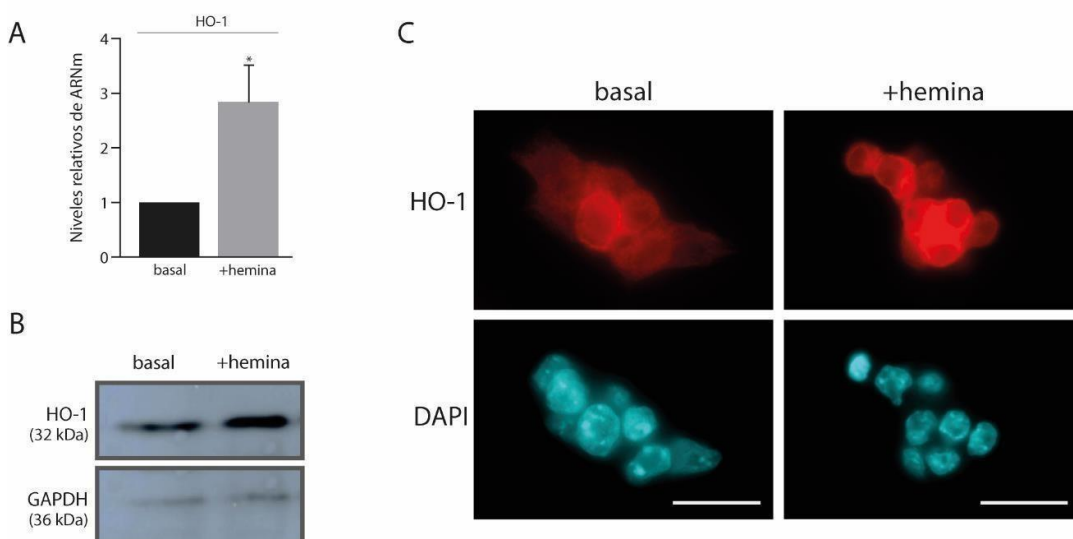
#### *Efecto de la sobreexpresión de HO-1 sobre los niveles de los FT de pluripotencia mediante inducción farmacológica*

Con el propósito de aumentar la expresión de HO-1 en CME, decidimos utilizar como un primer abordaje el tratamiento con hemina, un conocido inductor farmacológico. Para establecer las condiciones de inducción apropiadas para nuestro sistema evaluamos la viabilidad celular y proliferación en presencia de diferentes concentraciones de hemina, en base a concentraciones previamente utilizadas en otros modelos. Específicamente, se ha reportado el uso de una concentración de 30  $\mu\text{M}$  para MEF de la línea NIH/3T3 y 70  $\mu\text{M}$  para la línea PC3, de cáncer de próstata [143], [148]. Mediante los ensayos de MTT y cristal violeta observamos que ninguna de las condiciones evaluadas afectó los parámetros estudiados (figura R.16).



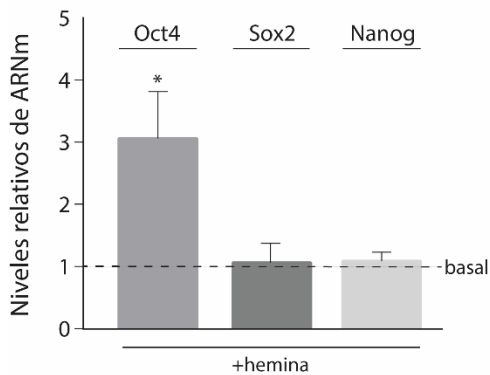
**Figura R.16. El tratamiento con hemina en CME no altera la viabilidad celular.** Se incubaron CME de la línea W4 con tres concentraciones distintas de hemina (20, 40 y 60 µM) durante 24 horas. Se comprobó, mediante ensayos de MTT y Cristal Violeta, que las dosis utilizadas y la duración del tratamiento no afectarían la viabilidad ni la masa celular.

Luego, incubamos las células con hemina durante 24 horas a una concentración final de 40 µM, concentración que no afectó la viabilidad de nuestro modelo celular y que se encuentra en el rango habitualmente utilizado. Luego, evaluamos la inducción de HO-1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, y, mediante RT-qPCR e IF, comprobamos que efectivamente había aumentado la expresión de HO-1 en las células tratadas con hemina respecto del control en ambos casos (figura R.17).



**Figura R.17. El tratamiento con hemina produce un aumento en los niveles de ARNm y proteína de HO-1 en CME.** Se cultivaron las CME con hemina en una concentración de 40  $\mu\text{M}$  por 24 horas y se analizó la expresión de HO-1. (A) Los niveles de ARNm de HO-1 fueron analizados mediante RT-qPCR, normalizados por la media geométrica de los genes *housekeeping* *Gapdh* y *Pgk1* y relativizados a la condición control (basal). Los niveles de proteína de HO-1 fueron evaluados mediante WB (B) e IF (C). HO-1 (rojo), la cromatina se encuentra marcada con DAPI (cian).

El primer parámetro relevante para la diferenciación que nos propusimos estudiar fue la expresión de los FT de fundamentales de pluripotencia. En primer lugar, evaluamos el efecto de la inducción de HO-1 sobre los niveles de ARNm de dichos FT mediante RT-qPCR. Como se puede ver en la figura R.18, el tratamiento de las CME con hemina produjo un aumento en los niveles de ARNm de Oct4 respecto del control; los niveles de ARNm de Sox2 y Nanog no resultaron alterados por el tratamiento.

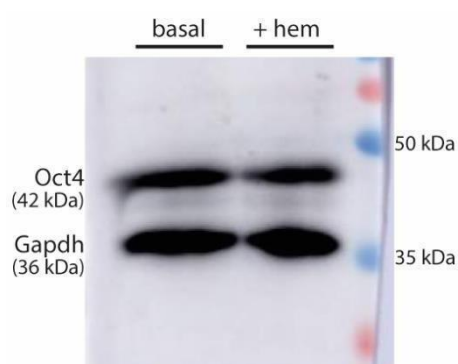


**Figura R.18. El tratamiento con hemina produce un aumento en los niveles de ARNm de Oct4 en CME.** Las CME fueron cultivadas en su condición estándar (basal) o en presencia de hemina, en una concentración de 40  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Los niveles de ARNm de los genes indicados arriba se analizaron por RT-qPCR, se normalizaron por la media geométrica de los genes *housekeeping* (*Gapdh* y *Pgk1*) y relativizaron a la condición control (basal, línea de puntos). El resultado se muestra como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, correspondientes a las muestras de la figura

anterior. El asterisco representa diferencias significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ), determinadas por análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar.

Luego, nos propusimos analizar los niveles de proteína de Oct4, dado que fue el único FT que se moduló a nivel transcripcional como consecuencia del tratamiento con hemina. Sometimos a las CME a una inducción con hemina a concentración 40  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y analizamos los niveles de Oct4 mediante WB. Queremos aclarar que en el revelado de la membrana nos encontramos con un problema metodológico: falló el revelado con el anticuerpo contra HO-1 en estos experimentos. Sin embargo, habiendo comprobado

previamente que estas condiciones de tratamiento con hemina inducen HO-1 en nuestro sistema, revelamos igualmente con un anticuerpo contra Oct4. Como podemos observar en la figura R.19, no observamos diferencias en los niveles de Oct4 entre las CME tratadas con hemina y la condición control. Estos resultados sugieren de manera preliminar que no habría un efecto de HO-1 sobre los niveles proteicos de Oct4. De todos modos, dado que no pudimos verificar la inducción de HO-1, este experimento no es concluyente.



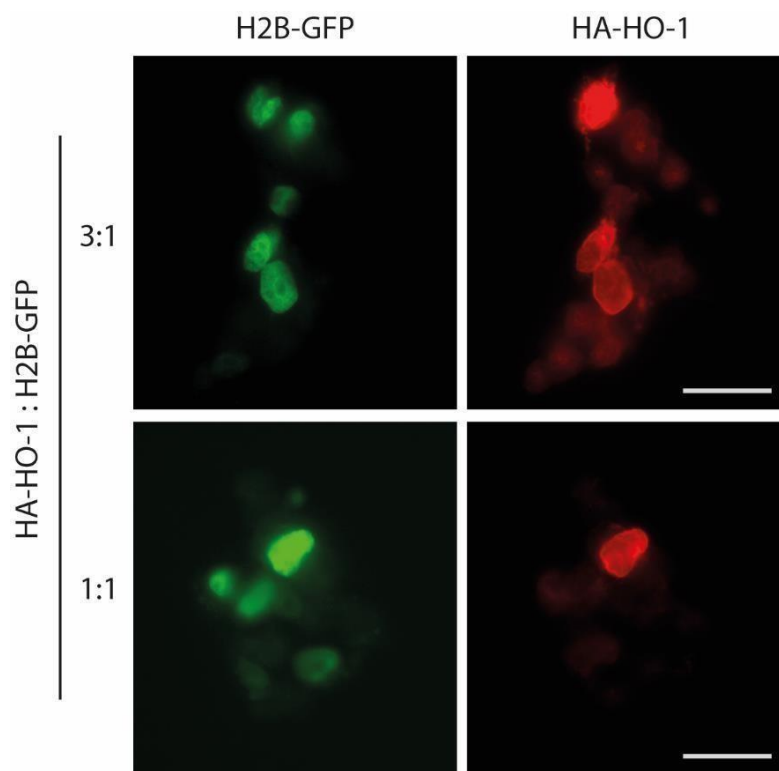
**Figura R.19. El tratamiento con hemina no produce cambios en los niveles de proteína de Oct4 en CME.** Las CME fueron cultivadas en condiciones estándar (basal) o en presencia de hemina, en una concentración de 40  $\mu$ M por 24 horas (+hem). Se analizó la expresión de Oct4 mediante WB. GAPDH fue utilizado como control de carga. Se indica el tamaño de las bandas más relevantes del marcador de peso molecular (*Page Ruler Plus, ThermoFisher*).

### *Efecto de la sobreexpresión de HO-1 mediante transfección transitoria sobre los niveles de los FT de pluripotencia*

En la sección anterior evaluamos el efecto de la inducción farmacológica de HO-1. Dado que la hemina, si bien es el inductor clásico de HO-1, podría estar teniendo un efecto sobre otros factores, decidimos complementar este análisis con otro abordaje experimental. Para esto utilizamos una estrategia de sobreexpresión mediante transfección transitoria de un vector de expresión de HO-1. Utilizamos un vector que codifica esta enzima fusionada al tag HA. Nuestra idea original era sobreexpresar HO-1 usando este vector y luego observar mediante IF los niveles de Oct4. Aquí nos encontramos con un impedimento metodológico para realizar una IF: los anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio para reconocer Oct4 o HA son de la misma especie (ratón). No conseguimos otros anticuerpos durante este período, por lo tanto, no pudimos visualizar ambas proteínas simultáneamente mediante esta estrategia.



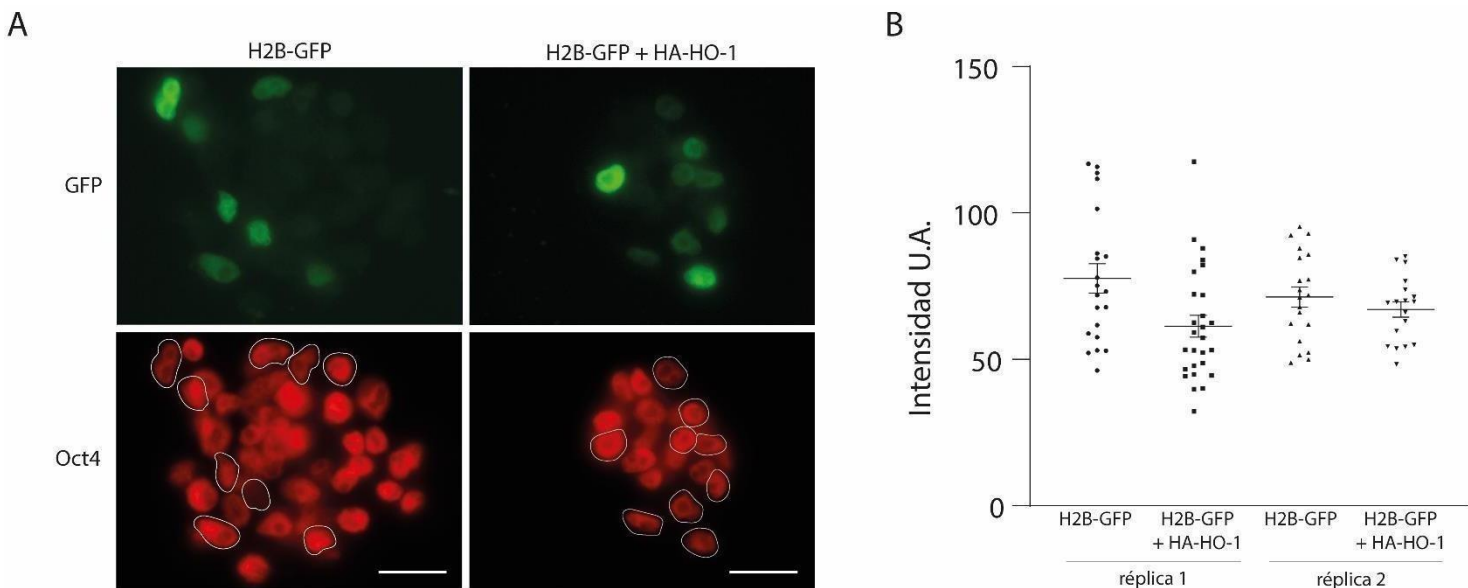
Para intentar solucionar esta situación, decidimos co-transfectar junto con HO-1 una proteína fluorescente como reportera de la transfección. Para esto co-transfectamos un vector que expresa la histona H2B fusionada a la proteína fluorescente GFP, junto con el vector HA-HO-1. Lo primero que hicimos fue poner a punto la relación entre las cantidades de cada vector a transfectar, para poder lograr que cada célula que se transfectara con H2B-GFP, también lo hiciera con HA-HO-1. De esta manera, podríamos identificar con alta probabilidad de certeza las células transfectadas con HO-1 mediante la visualización de GFP, sin necesidad de hacer la IF contra HA. Como mostramos en la figura R.20, usando una relación H2B-GFP:HA-HO-1 de 1:3, todas las células en las que se observa señal de GFP, también tienen marcación de HA, mientras que en la condición 1:1 podemos encontrar células que expresan H2B-GFP pero no HA-HO-1.



**Figura R.20. Determinación de la relación entre vectores para co-transfección en CME.** Las células fueron transfectadas con dos vectores de expresión, uno para la histona H2B asociada a la proteína fluorescente GFP y otro para la enzima HO-1 fusionada al *tag* HA en relación 1:1 y 1:3. La expresión de la proteína de fusión HA-HO-1 fue visualizada por IF. Se

utilizó  $\alpha$ HA como anticuerpo primario y se visualizó usando un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa555 (rojo). La proteína H2B-GFP fue visualizada mediante microscopía de fluorescencia (verde). Barra de escala: 20 $\mu$ m.

Habiendo comprobado que cada célula transfectada con H2B-GFP también se encontraba transfectada con HA-HO-1 cuando utilizamos la relación 3:1 (HA-HO-1: H2B-GFP), utilizamos este abordaje para analizar el efecto de la sobreexpresión de HO sobre los niveles de Oct4. Para esto co-transfectamos CME con dichos vectores y luego estudiamos los niveles de Oct4 mediante IF. Realizamos una IF contra Oct4 y comparamos la intensidad de señal de Oct4 entre las células co-transfectadas con ambos vectores y aquellas transfectadas únicamente con el vector H2B-GFP (condición control). Como podemos ver en las fotos representativas de la figura R.21, existe gran variabilidad en la señal de Oct4 entre células de la misma condición, que es algo que ya habíamos observado previamente (por ejemplo [137] y resultados no publicados). Esta variabilidad está presente en todas las condiciones y es mayor a las diferencias entre condiciones, por lo tanto, concluimos que no detectamos un efecto sobre los niveles de Oct4 producidos por la sobreexpresión de HO1.



**Figura R.21. La sobreexpresión de HO-1 no tiene efecto sobre los niveles de proteína de Oct4 en CME.** Las células fueron transfectadas con dos vectores de expresión (H2B-GFP y HO-1-HA) en relación 1:3. (A) Oct4 fue visualizado mediante IF, con un anticuerpo primario que reconoce Oct4 y el correspondiente anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa-555 (rojo). Las células transfectadas fueron identificadas por la expresión de H2B-GFP (verde). Barra de

escala: 20  $\mu\text{m}$ . (B) La intensidad de fluorescencia de la señal de Oct4 de las células transfectadas en la IF fue cuantificada con el software *ImageJ*. En el gráfico *dot plot* está representada la media de la intensidad de fluorescencia de Oct4  $\pm$  SEM. Cada punto corresponde a una célula transfectada.

A modo de conclusión de esta parte, si bien detectamos un aumento en el nivel de ARNm de Oct4 al inducir farmacológicamente HO-1, no observamos cambios significativos a nivel proteína. Esta falta de efecto fue consistente en dos abordajes experimentales complementarios, ya que no detectamos cambios en Oct4 luego del tratamiento con hemina, así como tampoco en condiciones de sobreexpresión de HO-1 mediante transfección transitoria. De esta manera, conjeturamos que podría estar regulándose a nivel transcripcional, pero es posible que exista algún mecanismo que compense los cambios en los niveles de proteína de Oct4, evitando este aumento. Esta hipótesis es sumamente interesante y es factible, dado que es sabido que los niveles de Oct4 son finamente regulados en CME, dada que cambios significativos promueven la diferenciación [146], [149].

### **Efecto del aumento de HO-1 sobre la arquitectura de la cromatina**

Como ya mencionamos, la regulación de la expresión génica no está dada únicamente por cambios en los niveles de expresión de los FTs sino que también está involucrada su organización subnuclear, su interacción dinámica con la cromatina y la estructura de ésta. Nos propusimos entonces explorar otros parámetros. Si bien planeamos analizar la organización de la cromatina y la distribución y dinámica de los FT de pluripotencia, en este trabajo nos enfocamos en estudiar la distribución de una proteína asociada a la cromatina, como un primer análisis del efecto de HO-1 sobre estos parámetros de dinámica subnuclear.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, el grupo de la Dra. Elba Vázquez publicó un trabajo en el cual realizaron un interactoma de HO-1. Si bien fue realizado en otro modelo celular (una línea derivada de cáncer pancreático), sus resultados nos permiten conocer con qué proteínas tiene la capacidad de interactuar físicamente HO-1. Dichas proteínas se encuentran asociadas a cuatro funciones principales: ADN y cromatina, metabolismo del ARN, actina y proteínas del citoesqueleto que intervienen en la estructura celular y regulación de la

dinámica de fibras de actina y señalización celular [150], [151]. Respecto a las proteínas relacionadas con la estructura de la cromatina, que son nuestro foco en esta parte del trabajo, Paez *et al.* reportaron que HO-1 interactúa con CBX1 y CBX3 pertenecientes a la familia de HP1 (HP1 $\beta$  y HP1 $\gamma$  respectivamente, por los genes que les dan origen). Además de estar asociadas a la compactación de la cromatina [152], estas proteínas están involucradas en el proceso de diferenciación de CME [153]–[155] y en la regulación dinámica de la arquitectura nuclear [156], mediante interacción con laminas nucleares [157]. Es interesante destacar que estas proteínas no solo estarían interactuando físicamente con HO-1, sino que además hay una correlación en su expresión, dado que en un trabajo en el cual analizan el patrón de expresión de diversos estadios de cáncer de mama, reportan que en los estadios en los cuales HO-1 se encuentra sobreexpresada, también lo está HP1 $\gamma$  [158].

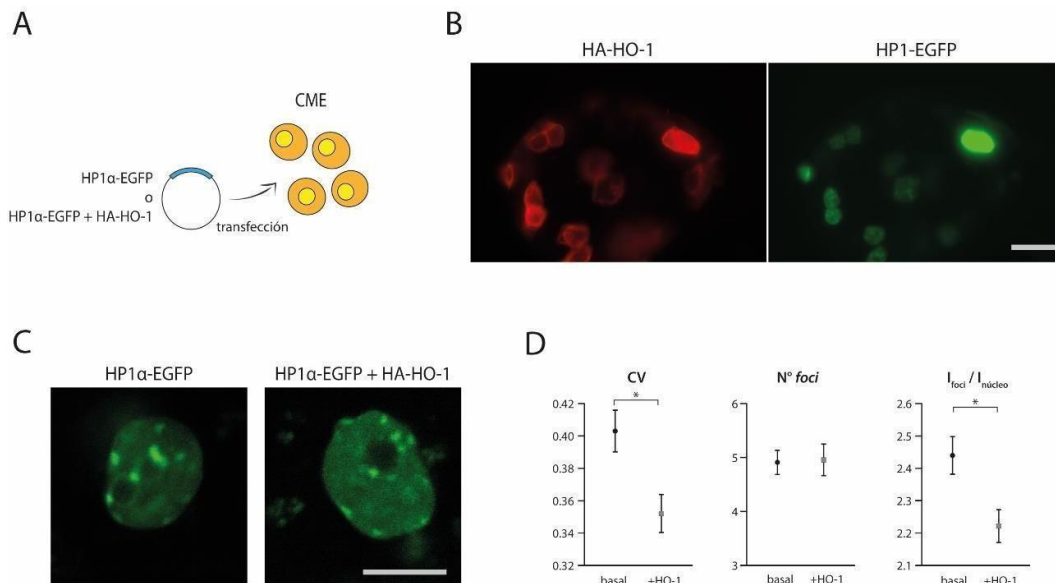
Estos antecedentes nos condujeron a explorar una posible relación entre la familia de proteínas HP1 y HO-1, dado que cambios en la expresión y localización de HP1 pueden impactar sobre la dinámica de los FTs.

Como primer abordaje, co-transfectamos CME con el vector utilizado previamente que codifica HA-HO-1 y otro vector que codifica para la proteína HP1 $\alpha$  fusionada a la proteína fluorescente GFP usando una relación 1:3, con la misma premisa que en la sección anterior, es decir, para aumentar la probabilidad de que las células que expresen HP1 $\alpha$ -EGFP estén transfectadas con HO-1 (figura R.22A). Esto es necesario para poder analizar la distribución de HP1 mediante microscopía confocal en células vivas, ya que el proceso de fijación requerido para hacer una IF altera esta distribución. Como podemos ver en la figura R.22B, todas las células de la colonia que fueron transfectadas con HP1 $\alpha$ -EGFP, también fueron transfectadas con el vector HA-HO-1. Habiendo comprobado esto, podemos analizar el efecto de la transfección de HO-1 sobre la distribución de HP1 sin necesidad de fijar las células y hacer la IF contra el *tag* HA.

Como se observa en la figura R.22B, detectamos que HP1 $\alpha$ -EGFP se distribuye heterogéneamente dentro del núcleo formando regiones de mayor concentración (*foci*), patrón de distribución que ya habíamos observado previamente para esta proteína en CME [137], [159].

Para medir cuantitativamente el cambio en la distribución de HP1 $\alpha$ , calculamos una serie de parámetros a partir de las imágenes obtenidas y que se encuentran representadas en la figura R.22. Estos parámetros son el número promedio de *foci* por núcleo ( $N_{foci}$ ), su intensidad relativa respecto de la intensidad total del núcleo ( $I_{foci}/I_{nucleo}$ ) y el coeficiente de variación (CV). Este último evalúa el cociente entre el desvío estándar y la media de intensidad, tal que un mayor valor de CV indica una distribución menos aleatoria de las moléculas. Este parámetro ha sido utilizado previamente para medir la distribución global de proteínas nucleares [160], [161]. En conjunto estos parámetros permiten cuantificar la distribución de la intensidad de fluorescencia y de esta manera detectar si existen cambios producidos por alguna condición experimental. Cualquier cambio significativo en alguno de estos parámetros revela un cambio en la distribución, con un posible efecto biológico.

Como podemos ver en la figura R.22, encontramos diferencias significativas tanto en el CV como en la intensidad relativa de los *foci*. Específicamente, ambos parámetros son menores en las células que sobreexpresan HO-1 respecto a las células control, lo que sugiere que la sobreexpresión de HO-1 genera un estado de la cromatina menos heterogéneo y probablemente más laxo. Si bien esto es un resultado preliminar, resulta sumamente interesante y nos lleva a especular que HO-1 podría tener un rol en la activación de procesos transcripcionales específicos de la diferenciación, a través de la interacción con HP1.



**Figura R.22. La sobreexpresión de HO-1 afecta la distribución de HP1 $\alpha$ -EGFP en CME.** (A) Células de la línea de CME W4 fueron transfectadas con dos vectores de expresión, HP1 $\alpha$ -EGFP Y HA-HO-1, en relación 1:3. (B) La expresión de la proteína de fusión HA-HO-1 fue visualizada mediante IF. Se utilizó  $\alpha$ HA como anticuerpo primario y se visualizó usando un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa555 (rojo). La proteína H2B-GFP fue visualizada mediante microscopía de fluorescencia (verde). Barra de escala: 20  $\mu$ m. (C) Imágenes confocales representativas de células co-transfectadas con los vectores HP1 $\alpha$ -GFP y HA-HO-1. (D) Cuantificación de la distribución nuclear de la proteína HP1 $\alpha$ -GFP: coeficiente de variación (CV), número de *foci* ( $N^{\circ}$  *foci*) y su intensidad relativa respecto a la intensidad media del nucleoplasma ( $I_{foci}/I_{nucleo}$ ). Los resultados se muestran como medias  $\pm$  SEM. El N de células fue 56 para la condición control y 47 para las células transfectadas también con HA-HO-1 (+HO-1). Los datos de CV e intensidad relativa fueron analizados mediante ANOVA con MLM. En el caso de número de *foci* se utilizó el Test de Wilcoxon (Mann-Whitney U). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento evaluado en cada caso ( $p < 0.01$ ). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### Generación de la línea de CME HO-1 *knockout*

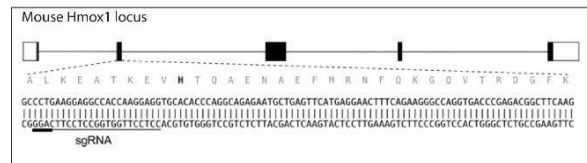
Para continuar explorando el rol de HO-1 en CME nos propusimos generar una línea *knockout* (KO) para HO-1. Para esto utilizamos la herramienta CRISPR-Cas9.

Decidimos generar una línea KO de HO-1 en lugar de disminuir su expresión, para evitar resultados inconcluyentes que podrían ser consecuencia de niveles remanentes de HO-1 funcional. Además, una línea estable presenta la ventaja de poder estudiar efectos sobre la diferenciación a plazos más largos que en caso de una transfección transitoria y a nivel poblacional.

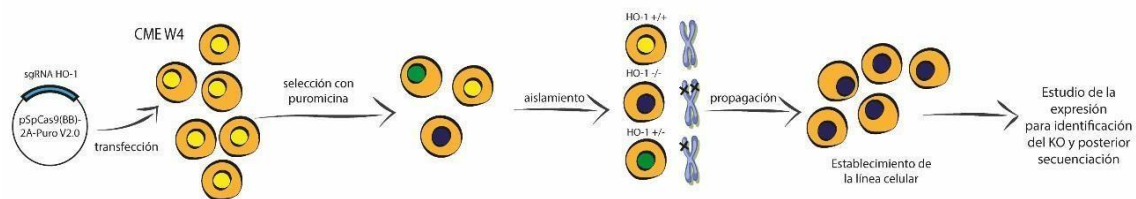
Durante el desarrollo de esta tesis, fue reportada la generación de una línea de CMPi KO para el gen de HO-1 [130], por lo que pudimos contar con el vector usado en ese trabajo, denominado pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0, que codifica para la enzima Cas9 y el ARN guía (*sgRNA*) dirigido contra el exón 2 del gen de HO-1 (figura R.23), que fue gentilmente cedido por el Dr. Dulak. Este plásmido cuenta con un gen para selección con puromicina, por lo que transfectamos la línea de CME W4 y seleccionamos las células transfectadas agregando puromicina al medio de cultivo por 48 horas. Como indica el esquema de la figura R.25, luego de la acción de Cas9, podemos encontrar células que expresan HO-1, ya sea porque tienen un solo alelo *knockeado* o ninguno, y otras que no tienen señal de HO-1, que serían las células HO-1 *-/-*. En la figura R.24 se muestra una imagen representativa de una IF realizada a células

del *pool* seleccionado luego de las 48 horas de tratamiento con puromicina. Podemos ver que luego de la selección con puromicina, hay células que continúan expresando HO-1 y otras en las que no se detecta expresión de dicha proteína. Estas últimas son candidato a ser KO, por lo que deben ser aisladas y estudiadas en mayor profundidad para confirmar el KO por análisis de expresión y secuenciación del gen de HO-1 a fin de identificar la mutación ocurrida.

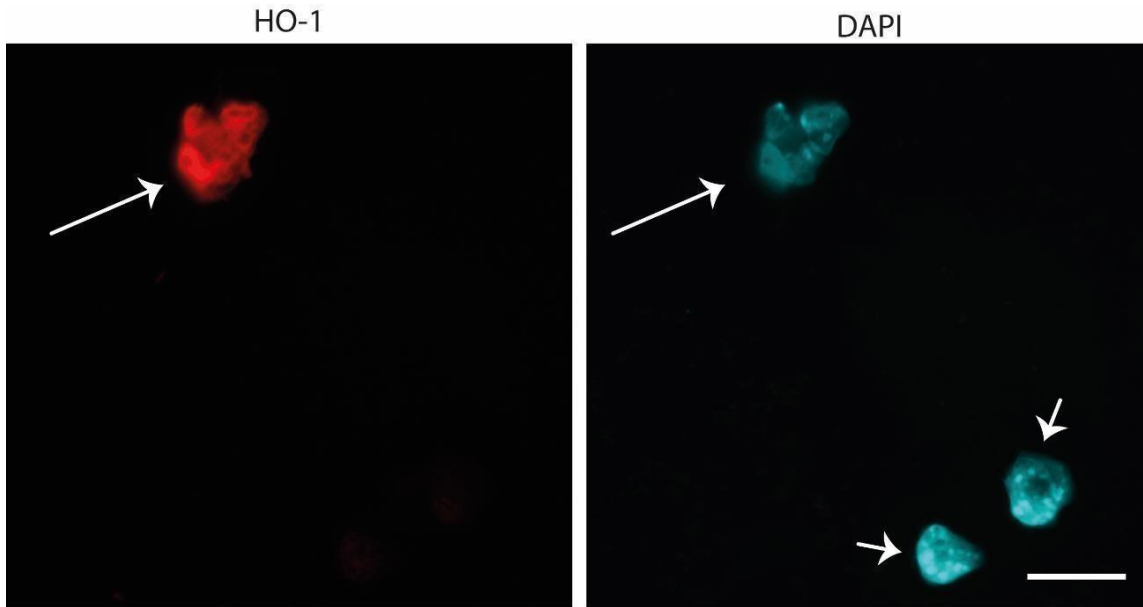
A



B



**Figura R.23. Estrategia para generación del *knockout* del gen de HO-1 mediante CRISPR-Cas9.** (A) Esquema del *locus* del gen de HO-1 y de la región correspondiente al exón 2 sobre el cual hibrida el *sgRNA*. (B) Esquema del diseño experimental para la generación de una línea clonal de CME KO para el gen de HO-1, indicando las etapas del protocolo y las posibles variantes generadas.

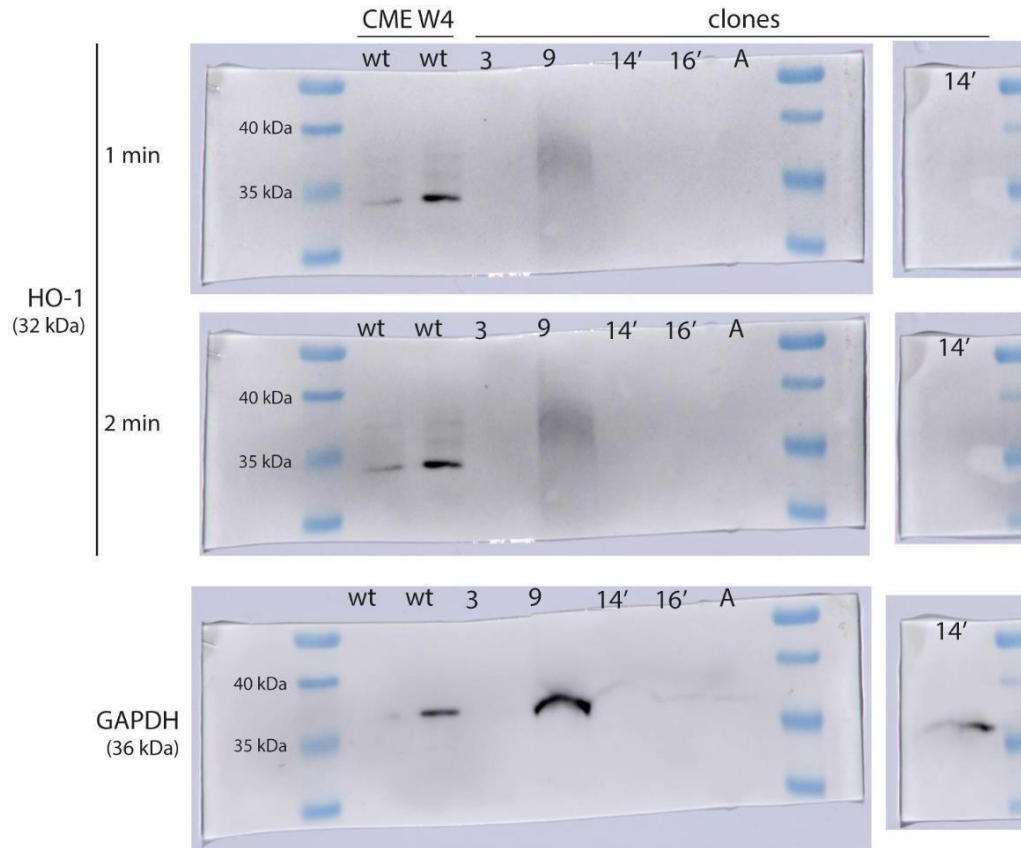


**Figura R.24. Análisis de expresión de HO-1 para identificación de células *knockout*.** Imágenes representativas de la IF realizada a CME pertenecientes al pool de células transfectadas con el vector pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 y sometidas a 48 horas de tratamiento con puromicina. La proteína HO-1 fue visualizada mediante IF, con un anticuerpo primario que reconoce HO-1 y el correspondiente anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa-555 (rojo) y la cromatina se visualizó mediante tinción con DAPI (cian). Las flechas largas señalan una colonia resistente a puromicina que no es KO para HO-1 y las flechas cortas indican células que no expresan HO-1, presumiblemente KO. Barra de escala: 20µm.

Luego de la selección, amplificamos las colonias que sobrevivieron y 'picamos' bajo lupa 24 colonias, cada una derivada de una única célula transfectada, con el objetivo de generar líneas clonales que sean *knockout* para el gen de HO-1. Cada una de las colonias fue disgregada para luego ser amplificada. Posteriormente, hicimos una extracción de proteína de las colonias que habían sobrevivido y que habían sido amplificadas y realizamos un WB. En la figura R.2 se muestran las membranas correspondientes a los clones aislados y con una muestra de CME *wt* para tener de referencia. Si bien ninguno de los clones que vemos en el WB mostraron una banda perteneciente a HO-1, ni exponiendo la membrana durante un minuto como hacemos habitualmente con este anticuerpo, ni exponiendo el doble de tiempo, los clones 9 y 14' fueron los únicos que mostraron presencia de GAPDH, usado como control de carga. Estos resultados no nos permiten concluir si el resto de los clones son o no KO para HO-1, sino que probablemente hayamos tenido una extracción de proteína insatisfactoria.



Solo podemos especular que los clones 9 y 14' pueden ser KO pero debemos confirmar estos resultados con nuevos análisis de expresión y secuenciación.



**Figura R.25. Análisis de expresión de HO-1 para identificación de clones *knockout*.** Imágenes de las membranas del WB realizado a los posibles clones KO para HO-1. Se analizó la expresión de HO-1 mediante WB. Los dos primeros paneles (superior y medio) corresponden a la membrana revelada con el anticuerpo contra HO-1 a dos tiempos de exposición distintos (1 y 2 minutos). El panel inferior corresponde a la membrana revelada con el anticuerpo contra GAPDH, utilizado como control de carga. Se indica el tamaño de las bandas más relevantes del marcador de peso molecular (*Page Ruler, ThermoFisher*).

Si bien estos resultados son preliminares, los encontramos promisorios. El poder contar con una línea estable de CME KO para HO-1 nos va a permitir realizar un sinnúmero de estudios para poder elucidar el rol de HO-1 en la pluripotencia y la diferenciación.

## DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas, la investigación sobre las células madre avanzó en gran medida y ganó la atención de diversas áreas. Particularmente, las células madre pluripotentes, por su gran capacidad de auto-renovación y diferenciación, presentan un enorme potencial para el desarrollo de modelos de enfermedades y para su futura aplicación en medicina regenerativa. Si bien los avances en los últimos años fueron muy importantes, aún queda mucho por comprender acerca de los mecanismos moleculares involucrados en las propiedades fundamentales de estas células.

Una característica distintiva de las CMP es su exacerbado sistema de defensa frente al estrés oxidativo. Las ROS se generan normalmente en la célula como productos del metabolismo celular, pero sus niveles son delicadamente controlados. Un desbalance entre oxidantes y antioxidantes en favor de las ROS puede generar un profundo daño, conduciendo a la muerte celular o la propagación de mutaciones. Esta alta actividad antioxidante de las CMP es crucial considerando que, en el embrión, son las células que dan origen a todo el organismo. Durante la diferenciación disminuye la actividad de este sistema de defensa y los niveles de ROS aumentan [74], destacándose en ciertos procesos su rol como segundos mensajeros, involucrados en el balance entre la auto-renovación y la diferenciación. Específicamente, las ROS están involucradas en ciertos procesos de diferenciación de CME, por ejemplo hacia cardiomiocitos, a neuronas y a otras células de linaje de mesodermo [162].

La actividad del sistema antioxidante se conoce en detalle, sin embargo aún no se encuentran muy estudiados los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de los componentes de este sistema de defensa en CMP.

Nuestro grupo realizó hace unos años, un estudio de varios genes involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo [132], y a partir de éste nos concentramos en aquellos cuya expresión resultó diferente entre CMP en estado indiferenciado y luego de algún proceso de diferenciación. En esta tesis estudiamos la regulación de la expresión de tres enzimas fundamentales del sistema antioxidante, Sod1, Gsr y HO-1, bajo la hipótesis de que sus genes son regulados a nivel transcripcional por los factores de transcripción fundamentales de CMP, Oct4, Sox2 y Nanog.

Las enzimas superóxido dismutasas son la primera y más importante línea del sistema de defensa frente al estrés oxidativo y frente a los radicales superóxido [78]. En particular, seleccionamos el gen de la superóxido dismutasa 1 ya que es la isoforma más abundante de esta enzima y realiza la mayor parte de la actividad de superóxido dismutasa en la célula [79], convirtiendo anión superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . La delección de Sod1 genera daño oxidativo en numerosos componentes celulares [79]. Asimismo, ratones KO para este gen presentan diversos problemas de desarrollo y supervivencia [95], [163].

Gsr es otra de las enzimas clave en la respuesta frente al estrés oxidativo. Específicamente, es una de las responsables de mantener la relación glutatión reducido /glutatión oxidado en niveles adecuados, siendo el primero un componente clave en la homeostasis redox celular [108].

HO-1, principal enzima responsable del catabolismo del hemo y componente relevante del sistema antioxidante, tiene funciones citoprotectoras y antiinflamatorias [111]. Dado que ha sido estudiada principalmente en el contexto de estrés oxidativo y cáncer [112], [164] no se encontraba entre las enzimas que habíamos investigado originalmente. Sin embargo, durante la última década surgieron diferentes trabajos que postulan que HO-1 tiene un rol en el

mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación [124], [129], [130], [165]. En conjunto, estas evidencias demuestran que la función biológica de HO-1 depende en gran medida del contexto celular, lo cual nos llevó a estudiar la regulación de su expresión y a comenzar a explorar su función en CMP.

En esta línea de investigación, tanto en este tesis como en un trabajo anterior, encontramos que los FT de pluripotencia regulan la expresión de tres componentes de este sistema; específicamente, Nanog y Oct4 inducen la expresión de la superóxido dismutasa 2 [132]; Oct4, Sox2 y Nanog inducen el gen de la superóxido dismutasa 1 [166]; estos tres FT reprimen el gen de la glutatión reductasa [139] y Oct4 regula negativamente la expresión de HO-1 (manuscrito en preparación). En conjunto, estos resultados evidencian una importante conexión regulatoria entre los FT de pluripotencia y el sistema antioxidante en CMP. Es relevante resaltar que la regulación encontrada no es en el mismo sentido para todos los genes estudiados. Esto señala la existencia de una regulación específica en relación a la función propia de cada uno de estos genes y demuestra que no es un mecanismo generalizado. En relación con esta observación, es interesante destacar que, si bien el sistema de defensa se encuentra exacerbado en CMP y los niveles de expresión de muchos de sus componentes disminuyen conforme las células se diferencian, encontramos que esto se cumple en el caso de ambas superóxido dismutasas, pero que, por el contrario, tanto Gsr como HO-1 aumentan su expresión durante la diferenciación y su expresión es reprimida por FT de pluripotencia. Especulamos que en el caso de estas enzimas cuya expresión aumenta en la diferenciación, el rol antioxidante, exacerbado como ya mencionamos en CMP, es ejercido mediante su expresión basal, pero además deben estar cumpliendo otras funciones

adicionales durante la diferenciación. Esto es sumamente interesante y requiere mayor estudio.

Enfocándonos en el gen de Sod 1, se habían reportado varios elementos regulatorios en los genes de las superóxido dismutasas conteniendo sitios de unión para diversos FT [87]. En esta tesis, encontramos que el *locus* de Sod1 tiene sitios de unión putativos para Oct4, Sox2 y Nanog y mediante la herramienta bioinformática ChIP-Atlas [167] encontramos que efectivamente estos FT interactúan con dicho *locus* tanto en CME como en CMPi. Construimos un vector reportero conteniendo un fragmento del promotor de Sod1 y encontramos que los tres FT de CMP estimulan la transcripción dirigida por dicho fragmento. Nos gustaría resaltar que las construcciones reporteras permiten estudiar la respuesta de una parte específica del genoma conteniendo ciertos sitios regulatorios por lo que son herramientas muy utilizadas. Sin embargo, este abordaje experimental debe complementarse con un análisis del gen endógeno, ya que las construcciones reporteras presentan un contexto diferente al genómico. Es decir, una región del promotor aislada puede responder de manera diferente al promotor endógeno debido a una diferente estructura y a la falta de interacción con otros elementos regulatorios. Por esta razón, analizamos el efecto de los FT en estudio también sobre el gen Sod1 endógeno en CME. Para esto modulamos negativamente su expresión mediante el uso de *shRNA* dirigidos contra estos FT y observamos una disminución en la expresión del gen de Sod1 en todos los casos. En conjunto estos experimentos nos permitieron concluir que Oct4, Sox2 y Nanog modulan positivamente la transcripción del gen de Sod1.

A continuación, estudiamos la regulación de Gsr. Encontramos que los niveles de ARNm de Gsr se encuentran aumentados en CME de ratón diferenciadas durante 4 días mediante un protocolo de diferenciación no dirigido y en un protocolo de diferenciación dirigido hacia

progenitores neurales, en el cual encontramos que el ARNm de Gsr se encuentra aumentado en los días 1 y 3. Si bien no podemos comparar los tiempos en estos protocolos, en ambos detectamos cambios, por lo que especulamos que el aumento de Gsr que detectamos en los primeros días de la diferenciación podría implicar un rol en esa ventana temporal, dado que a día 6 ya observamos que la expresión disminuye, alcanzando niveles similares a los de las células indiferenciadas.

Se ha descrito previamente que la expresión de Gsr disminuye a partir del día 7 de diferenciación en CMP humanas [72], [74]. También se reportó que embriones de ratón de 7 días de gestación presentan altos niveles de ARNm de Gsr, comparando con los niveles en un individuo adulto y que ya a día 11 comienzan a bajar, llegando a niveles similares a los del individuo adulto a día 19 [109]. Los autores postulan que la expresión de Gsr estaría regulada a lo largo de la embriogénesis, sugiriendo un rol en el desarrollo. En el mismo sentido, en un trabajo reciente reportaron que Gsr es requerida para el desarrollo del pulmón [110], evidenciando de manera concreta una función en la diferenciación. Si bien sabemos que no es posible extrapolar resultados de diferentes sistemas, haciendo un paralelo entre los tiempos, especies y protocolos diferentes, o entre embriones y lo que ocurre en CME en protocolos de diferenciación *in vitro*, lo que sí nos permiten nuestros resultados y los datos de la bibliografía es hipotetizar acerca del rol que podría tener Gsr durante los primeros días de la diferenciación de CME y la importancia de la modulación de su expresión.

Cuando estudiamos la regulación de Gsr durante la diferenciación de CME, nos resultó llamativo el patrón de expresión opuesto que mostró este gen respecto a Nanog, tanto en el protocolo de diferenciación a progenitores neurales como en el no dirigido. A continuación encontramos sitios de unión putativos para este FT y observamos en datos de experimentos

de ChIP-Seq [168], [169], que Nanog se une en distintas regiones dentro del *locus* genómico de Gsr con muchas más lecturas significativas y en muchos más datos experimentales que el resto de los FT de CMP. Estas evidencias nos llevaron a enfocarnos en un principio en este FT de pluripotencia, y finalmente, en línea con los resultados anteriores, la disminución de la expresión de Nanog por el *shRNA* específico produjo un aumento en los niveles de ARNm de Gsr. De todos modos, dado que posteriormente demostramos que tanto la distribución subnuclear como la dinámica de Oct4 y Sox2 cambia en etapas tempranas de la diferenciación [137] y ésto podría impactar en su función, decidimos ampliar el estudio de la modulación del gen de Gsr mediante la estrategia de shRNA, silenciando también Oct4 y Sox2. De manera concordante a lo que encontramos en el análisis bioinformático, el silenciamiento de estos FT afectó la expresión de Gsr, sugiriendo que también Sox2 y Oct4 modulan la expresión de Gsr. Estos resultados resultan sumamente interesantes, dado que podrían estar revelando un cambio en la función de estos FT como consecuencia del cambio de los parámetros de su dinámica subnuclear mencionados, diferentes a sus niveles, que es lo que clásicamente se estudia.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que la expresión de Gsr, una enzima crítica para mantener los niveles de GSH y la homeostasis redox en las células, es modulada negativamente por los FT de pluripotencia.

Finalmente nos centramos en la regulación del gen de HO-1, Hmox1. Se ha reportado que HO-1 tiene un rol citoprotector durante la diferenciación neural [170] y que podría estar involucrada en desarrollo cerebral mediante la maduración de células astrogiales [171]. En el contexto de células madre mesenquimales, se encontró que la sobreexpresión de HO-1 promueve la diferenciación de células madre osteoblásticas [172]. Asimismo, si la actividad de

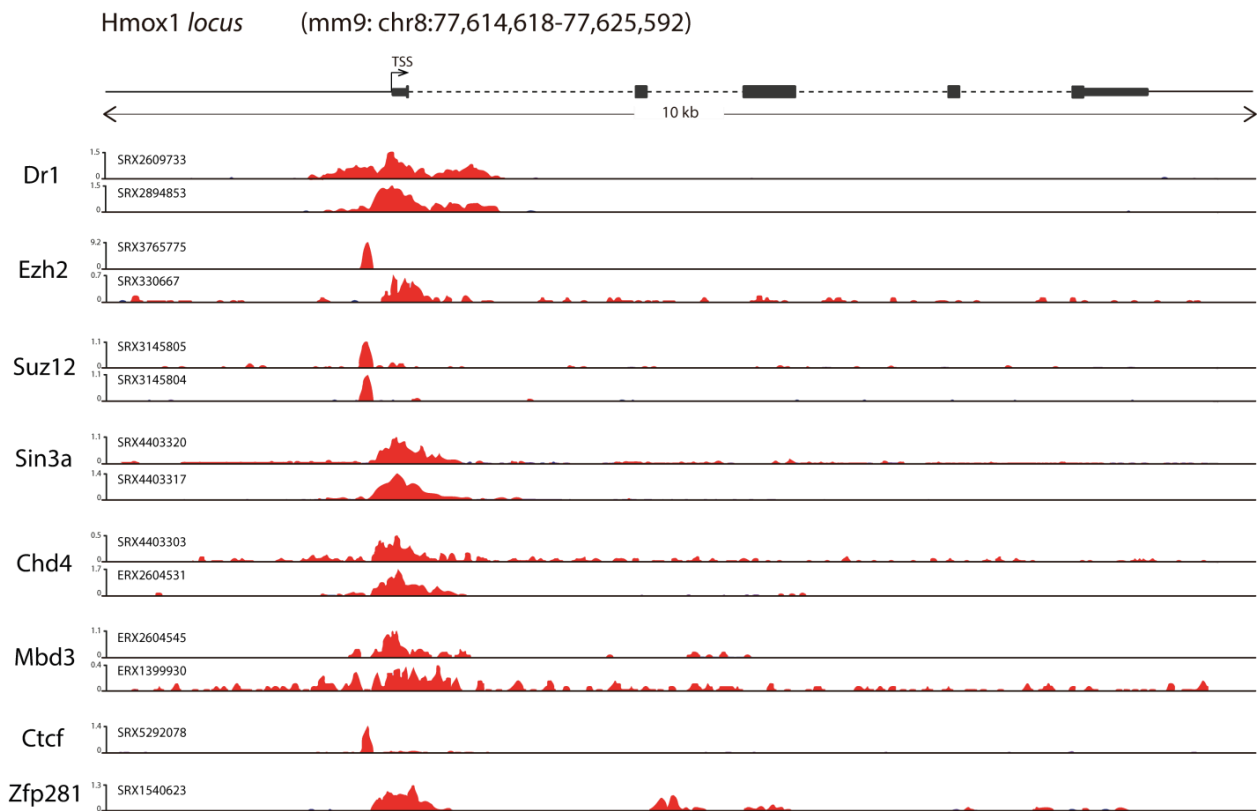
HO-1 se encuentra aumentada, se inhibe la diferenciación de precursores musculares en ratón, mediante un proceso que involucra regulación de microARNs [173]. Respecto a CMP, varios reportes evidencian un rol en la diferenciación. Por ejemplo, la actividad de HO-1 contribuye en la diferenciación de CME hacia cardiomiocitos y a la maduración de éstos [128]. En el mismo sentido, CMP KO de HO-1 muestran una menor eficiencia de diferenciación hacia dicho linaje [130]. Es interesante mencionar que HO-1 también es relevante para una eficiente adquisición de la pluripotencia durante la generación de CMPi [130] y para la supervivencia y diferenciación de estas células [165]. Por otro lado, y de manera contraria a lo publicado por Kozakowska *et al.* [173], también se ha reportado que CME que no expresan HO-1 muestran altos niveles de marcadores celulares generales de mesodermo y específicamente de músculo liso a lo largo de una diferenciación por cuerpos embrioides, lo cual sugiere que HO-1 podría estar regulando negativamente la expresión de ciertos genes de mesodermo [129]. Es interesante resaltar que estos trabajos ponen en evidencia lo variada y multifacética que puede ser la función de HO-1 en el contexto de las células madre y que aún falta estudiar a fondo los mecanismos subyacentes mediante los cuales HO-1 podría estar involucrada en la diferenciación, dado que las diferencias que encontramos en los trabajos publicados podrían deberse a un sinnúmero de variables como el modelo celular, los diversos protocolos de diferenciación y los tiempos de análisis, entre otros parámetros.

En particular, en esta tesis nos enfocamos en la regulación de Hmox1 por Oct4, en base a nuestros resultados del abordaje de silenciamiento en CME; el *shRNA* dirigido contra Oct4 fue el único que afectó los niveles de ARNm de HO-1 (figura R.11). Nos parece importante señalar que nuestros resultados no nos permiten descartar por completo que los otros FT estén involucrados en la regulación de HO-1, dado que la transfección con los *shRNA*



específicos disminuye la expresión de los genes blanco, pero no la anula. En nuestros experimentos, los niveles remanentes de Nanog y Sox2 podrían estar ejerciendo algún tipo de regulación sobre el gen de HO-1.

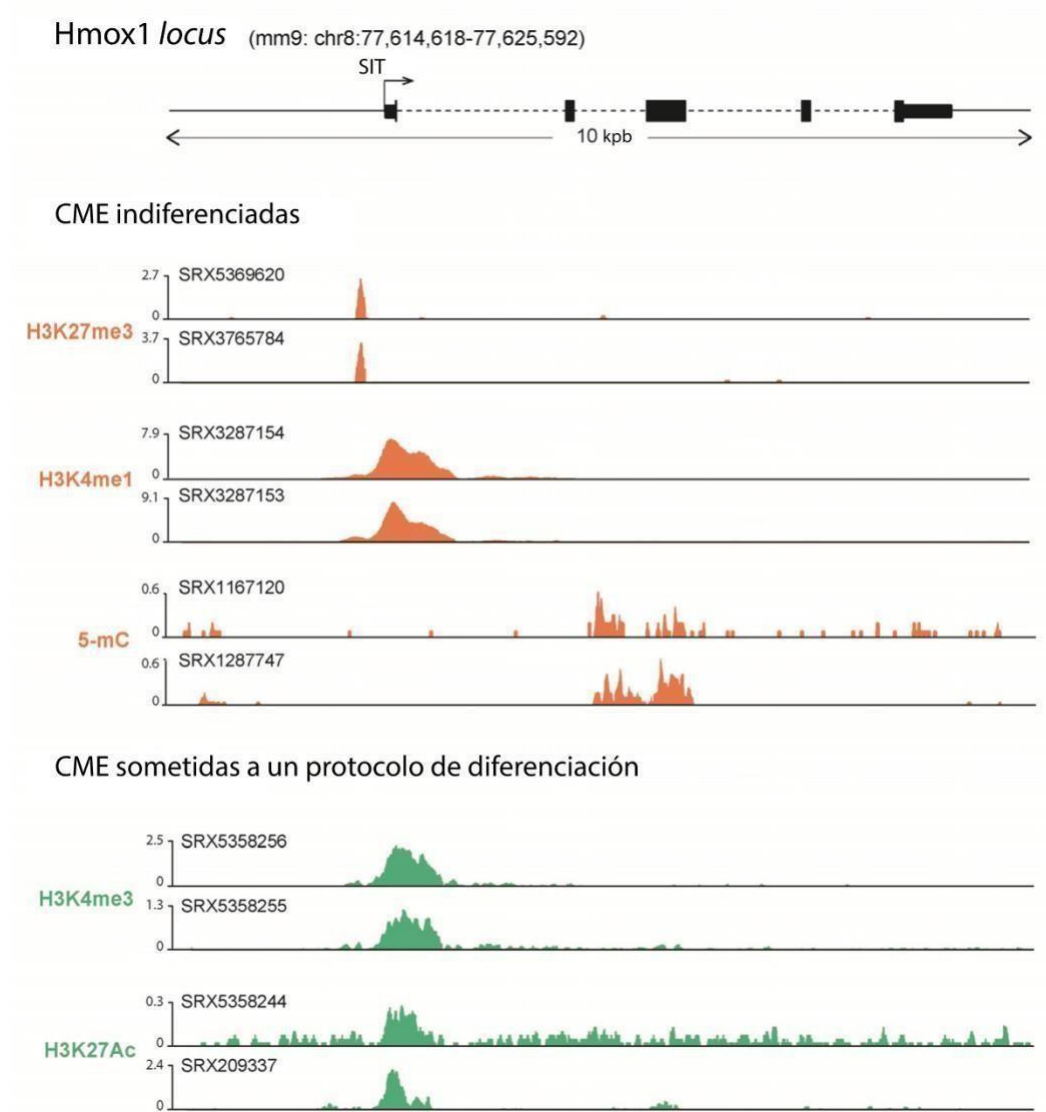
Como ya mencionamos, la regulación de la transcripción no depende únicamente de los FT, sino que además juega un rol fundamental la arquitectura de la cromatina, determinada por múltiples factores, como por ejemplo diversos tipos de modificadores de histonas y de ácidos nucleicos. Es interesante mencionar que, en un trabajo recientemente publicado por nuestro laboratorio [174], a partir de análisis de datos de experimentos de ChIP-seq realizados en CME indiferenciadas, encontramos reguladores de la transcripción asociados a complejos represivos que se unen al *locus* de Hmox1 (figura D.1), como EZH2 y SUZ12, miembros del complejo Polycomb [175], y Chd4 y Mbd3, componentes del complejo NuRD (*Nuclear Remodeling and histone Deacetylation*) [176], [177], entre otros. Destacamos que no encontramos estas proteínas asociadas al *locus* de Hmox1 en CME sometidas a protocolos de diferenciación.



**Figura D.1. Varios reguladores transcripcionales asociados a represión se unen al locus de Hmox1 en CME indiferenciadas.** Se muestran los resultados del análisis obtenido mediante ChIP-Atlas sobre *locus* genómico del gen de HO-1 a partir de datos provenientes de experimentos de ChIP-seq en CME. Los picos corresponden al número de lecturas significativas de las regiones que fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos contra las proteínas indicadas a la izquierda. Los números del eje Y indican la cantidad de lecturas normalizadas al total de lecturas mapeadas (“reads per million mapped reads”). SIT: sitio de inicio de la transcripción. Adaptada de [174]

Asimismo, además de estas proteínas represoras, encontramos marcas de histonas y de ADN también asociadas a represión de la transcripción como H3K27me3, H3K4me1 y 5-mC, en CME indiferenciadas. Contrariamente, en CME sometidas a diferentes procesos de

diferenciación encontramos marcas asociadas a activación de la transcripción, específicamente H3K4me3 y H3K27Ac (figura D.2).



**Figura D.2.** CME indiferenciadas poseen marcas asociadas a cromatina represiva y CME sometidas a diferentes protocolos de diferenciación, a cromatina activa, en el locus de Hmox1. Se muestran los resultados del análisis obtenido mediante ChIP-Atlas sobre el locus genómico del gen de HO-1 a partir de datos provenientes de experimentos de ChIP-seq en CME en estado indiferenciado o sometidas a distintos protocolos de diferenciación. Los picos corresponden al número de lecturas significativas de las regiones que fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos que

reconocen las marcas indicadas a la izquierda. Los números del eje Y indican la cantidad de lecturas normalizadas al total de lecturas mapeadas (“reads per million mapped reads”). SIT: sitio de inicio de la transcripción. Adaptada de [174].

Cabe destacar que Pardo *et al.* [178] y Liang *et al.* [179] realizaron análisis de interacción (interactomas) de Oct4 en CME de ratón y encontraron que este FT interactúa físicamente con proteínas asociadas a represión, tales como Sin3a y Chd4 y Mbd3 que, como mencionamos previamente, forman parte del complejo NuRD y se encuentran asociadas al *locus* de Hmox1; también está reportado que Oct4 está involucrado en un circuito regulatorio que involucra al complejo represivo Polycomb [180]. Esta evidencia nos lleva a especular que Oct4 podría estar modulando negativamente la expresión de HO-1 mediante reclutamiento de alguno de estos reguladores de la transcripción. Esta represión, en combinación con mecanismos inductores, daría lugar a los niveles basales de HO-1 que presentan las CME en estado indiferenciado. A medida que avanza la diferenciación y disminuye la expresión de Oct4, esta represión se aplaca, dando lugar al aumento en la expresión de HO-1 que se observa en la diferenciación y que es requerida durante el proceso hacia ciertos linajes específicos.

Nos resulta relevante destacar que el hecho de que detectemos expresión de HO-1 en CME indiferenciadas demuestra que la represión ejercida por Oct4 no es total. Es decir, debe existir algún mecanismo inductor que determina esos niveles basales detectables. Esto resalta el rol que esta enzima tiene en el contexto del sistema de defensa frente a estrés oxidativo que, como ya mencionamos en múltiples oportunidades, se encuentra exacerbado en células indiferenciadas. Es decir, la represión que pueda ejercer Oct4 en CME indiferenciadas puede que se encuentre parcialmente compensada por otros factores, determinando así que los niveles basales sean suficientes para que HO-1 ejerza su función protectora.

Por otro lado, que HO-1 aumente durante la diferenciación y también el hecho de que su expresión sea reprimida por Oct4, y como ya mencionamos, la disminución de Oct4 durante la diferenciación permita el aumento en la expresión de HO-1, nos hace volver sobre nuestra hipótesis de que HO-1 tiene un rol importante en la diferenciación de CME. Especulamos que una de las funciones de HO-1 podría ser la de inducir la salida del estado pluripotente; otra posibilidad, no excluyente con la anterior, es que HO-1 sea necesaria para activar ciertos programas transcripcionales que promuevan algunos procesos de diferenciación en particular.

Finalmente, dado que proponemos que Oct4 regula la expresión de HO-1 en una ventana temporal en la que este FT no disminuye, es importante que remarquemos que, como ya mencionamos en otras secciones de esta tesis, existen otros parámetros, además de sus niveles que impactan en la función de los FT. Es interesante destacar que previamente reportamos que durante los primeros dos días de diferenciación, aunque los niveles de Oct4 no disminuyen, sí se ven modificadas su distribución subnuclear y su interacción con la cromatina [137].

Respecto al rol de HO-1, ya mencionamos que durante la última década surgieron evidencias que sugieren fuertemente que HO-1 estaría involucrada tanto en la pluripotencia como en la diferenciación. Entre éstas, es interesante comentar el trabajo de Lin *et al.* [165] en el cual sugieren que HO-1 cumpliría un rol en proteger a las CME frente a una diferenciación espontánea, dado que la falta de HO-1 hace a las CME más sensibles a una muerte celular inducida por estrés oxidativo y también más propensas a diferenciarse; los autores proponen esta afirmación en base a la observación que en una línea de CMPi KO para HO-1 los niveles de expresión de Oct4 eran menores y la activación de Erk1/2 se encontraba

aumentada respecto a una línea de CMPi *wild type* y a CME *wild type*. Al realizar un experimento de rescate, evaluando en la línea KO los niveles de expresión de Oct4, tanto al transfectar con un vector de expresión para HO-1 como aumentando los productos de la reacción que cataliza HO-1, observaron que los niveles de expresión de Oct4 aumentaron, retrasando su disminución durante el proceso de diferenciación. Los autores sugieren fuertemente que HO-1 protege a las CME contra la diferenciación, sin embargo, miden únicamente Oct4, SSEA-1 y actividad de fosfatasa alcalina, sin determinar otros marcadores o evaluar que luego de la diferenciación, las células se diferencien a las tres capas germinales, requisito para demostrar pluripotencia. En este trabajo tampoco estudian los mecanismos moleculares subyacentes involucrados. De todos modos, sus resultados sí resaltan la relevancia de profundizar el estudio del posible rol de HO-1 en la pluripotencia y en la diferenciación.

El rol de HO-1 en la diferenciación de CME podría bien ser explicado por su función enzimática clásica; sin embargo, también podrían estar involucradas funciones no canónicas que todavía no fueron exploradas en profundidad. Por ejemplo, ya se ha propuesto en varios trabajos que HO-1 podría tener una función nuclear, fundamentalmente estudiada en el contexto de estrés [118], [143], [144], [181]–[183], pero aún sin ser descifrada. Hemos mencionado dentro de nuestros resultados que encontramos señal de HO-1 mediante IF y que esta señal nuclear aumenta durante la diferenciación; esto nos llevó a hipotetizar un posible rol nuclear para HO-1 durante este proceso que comenzamos a explorar.

En primer lugar, analizamos la regulación de los FT de CMP por esta proteína. En esta línea, encontramos que, al tratar a las CME con hemina, el inductor farmacológico de HO-1 por excelencia, detectamos un incremento en los niveles de ARNm de Oct4, pero no

detectamos cambios a nivel de proteína, ni en células tratadas con hemina, ni en células sobreexpresando HO-1 mediante transfección. Especulamos que es posible que exista una regulación de Oct4 por HO-1 a nivel transcripcional, pero que algún mecanismo evite que los niveles de proteína de Oct4 se vean afectados. Es muy interesante remarcar que ya se ha reportado que en CME los niveles de Oct4 son finamente regulados debido a que pequeñas fluctuaciones de este FT pueden activar programas transcripcionales que pueden inducir la diferenciación [146], [149]. Asimismo, múltiples reportes sugieren que la regulación de Oct4 no ocurre únicamente a nivel transcripcional, sino que distintas modificaciones post-traduccionales tienen un rol clave en modulación de su expresión y actividad. Por ejemplo la ubiquitinación y la SUMOilación regulan la estabilidad de Oct4 [184], lo cual a su vez impacta en la pluripotencia [185]. Esto nos resulta sumamente interesante, por lo que planeamos profundizar este análisis en el futuro.

Continuando con la investigación de un posible rol nuclear de HO-1, y como mencionamos en los resultados, es interesante mencionar que el grupo de la Dra. Elba Vázquez publicó un interactoma de HO-1 en células de cáncer de próstata [151], en el cual identificaron múltiples proteínas que interactúan físicamente con HO-1. Entre ellas, queremos destacar a HP1 $\beta$  y HP1 $\gamma$  que integran la familia de proteínas de heterocromatina 1 (HP1). No solo encontraron que había entre ellas una interacción física, sino que también detectaron que aumentaban los niveles de ARNm de HP1 $\gamma$  cuando HO-1 era inducida. HO-1 se encuentra aumentada no solamente en cáncer de próstata, sino también en varios tipos tumorales [186], entre los cuales se encuentra el cáncer de mama. Folgueira *et al.* [158] definieron el perfil de expresión de *Hmox1* en estadios II y III de cáncer de mama; realizando *microarray* de ADNc y meta-análisis de datos de otros *arrays*, encontraron que HO-1 se encuentra aumentada en el

estadio III y, entre otros genes cuya expresión se encontraba inducida, estaba CBX3, el gen que codifica para HP1 $\gamma$ . Esta familia de proteínas es conocida por tener un rol conservado en la formación y el mantenimiento de la heterocromatina e impacto en la regulación génica [187]–[189]. En los últimos años, se reportó que un miembro de esta familia, HP1 $\gamma$ , está involucrado en la diferenciación de CME [153] y en la reprogramación celular [190]. En base a estos antecedentes decidimos comenzar a explorar una posible conexión entre HO-1 y HP1. Nos resulta interesante la posibilidad de que HO-1 module de alguna manera la organización dinámica de la cromatina impactando así en la expresión génica, por ejemplo, mediante regulación de la función de HP1.

Nuestro grupo, en colaboración con el grupo de la Dra. Valeria Levi, previamente utilizó la visualización de la distribución de HP1 [137] y análisis de su dinámica [159] como parámetros indicadores de la organización dinámica de la cromatina. En esta tesis empezamos a explorar un posible efecto de HO-1 sobre HP1 estudiando si, al sobreexpresar HO-1 en CME, detectábamos cambios en la distribución de HP1 $\alpha$ . Encontramos que la sobreexpresión de HO-1 modifica la distribución de HP1 $\alpha$ -EGFP, disminuyendo tanto el CV como la intensidad de los *foci* de esta proteína. Este resultado sugiere una organización menos heterogénea y probablemente más laxa de la cromatina que podría estar indicando un rol de HO-1 en la activación de procesos transcripcionales específicos de la diferenciación, a través de la interacción con proteínas involucradas en la organización de la cromatina. No podemos dejar de mencionar que estos resultados son preliminares, dado que provienen de una única replica experimental. Sin embargo, la gran cantidad de imágenes disponibles nos permitió analizar un número de células suficiente y realizar un análisis estadístico, permitiéndonos generar esta conclusión preliminar. De esta manera, estos resultados preliminares sugieren una posible



conexión novedosa entre HO-1 y la familia HP1 que nos lleva a continuar investigando un posible rol nuclear de HO-1 en el contexto de las CME y su relevancia en la pluripotencia y la diferenciación.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis encontramos que los FT fundamentales de CMP, Oct4, Sox2 y Nanog, modulan la expresión de importantes componentes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo, revelando una fuerte conexión regulatoria entre este sistema y la pluripotencia. Esta relación no parece estar gobernada por un mecanismo general, dado que hay genes que se inducen y otros que se reprimen por estos FT. Asimismo, comenzamos a explorar una posible función nuclear de HO-1, aún no descripta, en busca de comprender su rol durante la diferenciación. Finalmente, comenzamos a generar una línea *knockout* para HO-1 que será una valiosa herramienta para profundizar este estudio.

Quedaron varias cosas que nos hubiera gustado incluir en esta tesis, pero no pudimos terminar, por razones de público conocimiento. Asimismo, surgieron nuevos interrogantes que nos abren perspectivas futuras.

Específicamente, planeamos continuar explorando el posible rol nuclear de HO-1. Esperamos completar la determinación del efecto de HO-1 sobre los niveles de proteína de Oct4 y, si efectivamente confirmamos la discrepancia con el aumento producido sobre los niveles de ARNm, sería interesante explorar el mecanismo involucrado que compensa esta inducción.

Asimismo, nos proponemos continuar investigando el efecto de HO-1 sobre la cromatina, continuando el análisis sobre HP1 y además estudiando la distribución de H2B y la dinámica subnuclear de los FT de CMP.

Por otra parte, planeamos continuar con el establecimiento de la línea *knockout* para HO-1, dado que ya tenemos algunos clones que son fuertes candidatos, pero aún nos falta confirmarlo mediante secuenciación. Mediante el uso de esta línea planeamos complementar el estudio del rol de HO-1 sobre la arquitectura nuclear y la dinámica de los FT de CMP, como mencionamos recién, utilizándola de manera comparativa con las CME de su correspondiente línea parental *wild type* y en ensayos de complementación. Esta línea nos permitirá además, estudiar el rol de HO-1 sobre la proliferación y supervivencia de CME en estado indiferenciado y sobre su capacidad de diferenciación.

Finalmente, en el mapa de interacción de HO-1 [150] no solo se puede encontrar que HO-1 interactúa con proteínas relacionadas con la dinámica de la cromatina, como ya mencionamos en esta tesis, sino también con múltiples proteínas con diversas funciones celulares, de las cuales una gran proporción está asociada a la dinámica del citoesqueleto. Dado el rol fundamental de esta compleja red y la interacción entre sus componentes en la señalización y diferenciación de CME, nos proponemos además explorar un posible rol de HO-1 sobre la dinámica del citoesqueleto de CME.

Consideramos que los resultados obtenidos durante esta tesis son un aporte al entendimiento de los mecanismos moleculares relevantes en CMP y que abrieron nuevos interrogantes que esperamos poder explorar.



Victoria Petrone



Alejandra Guberman

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cultivo celular

En estas tesis utilizamos las líneas de CME de ratón R1 (ATCC) y W4 (Rockefeller University Core Facility). Ambas líneas de CMP pueden ser cultivadas sobre placas previamente recubiertas (*coating*) con gelatina de piel bovina 0,1% (Sigma), a una concentración de 0.1 % en PBS durante 15 minutos en estufa a 37°C, para que las células crezcan adheridas a la placa.

El medio de propagación (MP) de las CMP se compone por *Dulbecco's Modified Eagle Medium (high-glucose DMEM, Gibco)* suplementado con 2 mM L-alanil-L-glutamina (Gibco), 100 mM MEM aminoácidos no esenciales (Gibco), 0,5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomina, Gibco), 15 % de SFB (Gibco). Además, para mantener y propagar las CMP en estado indiferenciado, complementamos el medio de cultivo con la citoquina LIF. Utilizamos rutinariamente el medio condicionado de una línea celular CHO modificada genéticamente de forma tal que sobreexpresa y secreta LIF (CHO-LIF), ampliamente utilizada en la comunidad científica. Para la línea W4 también complementamos el MP con los inhibidores de MEK y GSK3, PD0325901 (0,5  $\mu$ M) y CHIR99021 (3  $\mu$ M), respectivamente (ambos Tocris), denominados en conjunto 2i.

La composición de los distintos medios y soluciones empleados en este trabajo se especifican en un apartado al final del capítulo.

Para los experimentos realizados en sistemas heterólogos utilizamos la línea celular de fibroblastos embrionarios NIH/3T3 y una línea derivada de ésta generada en nuestro laboratorio NIH Oct4-YPet. Ambas líneas son mantenidas y propagadas en el medio de cultivo correspondiente (DMEM 10% suero fetal bovino, 100 UI/ml penicilina - 100  $\mu$ g/ml estreptomina).

Todas las líneas celulares utilizadas son cultivadas a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub> y replaqueadas de rutina mediante tratamiento convencional con Tripsina/EDTA.

Las células de la línea CHO-LIF contienen el plásmido 8/242 720 LIFD de *Genetics Institute*, Cambridge, que codifica para la hormona LIF que permite el cultivo de CMP en

estado indiferenciado. Cultivamos la línea CHO-LIF en placas de 10 cm de diámetro con 10 ml *high-glucose* DMEM suplementado con SFB al 10% (PAA), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina, Gibco). Mantenemos por lo menos dos placas p100, y una vez que alcanzaron una confluencia del 90%, cosechamos las células de una de las placas y las contamos para condicionar las otras placas con 1 ml de medio fresco por cada  $1.10^6$  células. Incubamos las placas con este medio durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, cosechamos el medio condicionado conteniendo LIF, lo centrifugamos a 2000 rpm durante 10 minutos, y lo transvasamos a un tubo cónico estéril de 50 ml. Posteriormente, evaluamos distintas diluciones del medio obtenido en el cultivo CME sobre gelatina, para determinar la dilución en la cual el medio obtenido de las CHO-LIF es capaz de mantenerlas en estado indiferenciado. En paralelo, cultivamos CME en MP suplementado con LIF comercial, y CME en MP sin el agregado de LIF para evidenciar su diferenciación en ausencia de este factor. Como parámetro para evaluar la dilución óptima de uso de CHO-LIF observamos la morfología de las colonias, siendo típicamente colonias compactas y refringentes, con células que presentan una alta relación núcleo/citoplasma.

### Congelamiento y descongelamiento de células

Mantenemos un stock de cada línea celular conservadas en N<sub>2</sub> líquido de acuerdo al siguiente protocolo. Tratamos con tripsina como se explicó previamente, inactivamos la tripsina y centrifugamos las células a 1100 rpm por 5 minutos en un tubo cónico de 15 ml. Las resuspendemos en 1 ml de medio de propagación agregándole SFB para alcanzar una concentración final de 25% y 10% DMSO. Colocamos la suspensión en un criotubo, que incubamos durante toda la noche en un *freezer* de -80°C, dentro de un recipiente que contiene isopropanol (*Mr. Frosty Freezing Container*, Nalgene), el cual permite lograr un enfriamiento gradual. Al día siguiente, guardamos los criotubos en un termo con N<sub>2</sub> líquido.

Para descongelar células procedemos de manera rápida, calentando un criotubo de stock a 37°C, y las colocamos un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de medio de propagación para remover el DMSO. Centrifugamos la suspensión a 1100 rpm durante 5 minutos y resuspendemos las células en un volumen adecuado de medio de propagación para analizar la

viabilidad celular mediante tinción con Azul de Tripán. Finalmente, sembramos las células en condiciones apropiadas.

## Extracción de ADN genómico para la detección de *Mycoplasma* por PCR

Para controlar la ausencia de bacterias del género *Mycoplasma* en nuestros cultivos celulares, periódicamente realizamos una extracción de ADN genómico de una muestra de cada línea celular y lo utilizamos como molde en una PCR con *primers* que evidencian la presencia de varias cepas del género *Mycoplasma*. Este tipo de contaminación no se puede detectar con el análisis microscópico de rutina, y la técnica de tinción de ADN con el intercalante de bases Hoetch y su posterior observación mediante microscopía de fluorescencia, es menos sensible. Como control positivo de presencia de ADN genómico utilizamos *primers* para el gen de Gapdh que hibridan en el mismo exón, ya que esperamos un resultado negativo para la PCR de detección de *Mycoplasma*. Brevemente, tratamos con tripsina las células y separamos el equivalente a 1/10 de células de una p60 en un tubo eppendorf y lo centrifugamos 5 minutos a 1100 rpm. Descartamos el sobrenadante, lavamos el pellet con 200 µl de PBS y volvemos a centrifugar 5 minutos a 1100 rpm. Resuspendemos el pellet en 100 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20), al cual previamente le agregamos proteinasa K (Fermentas) a una concentración final de 10 µg/ml, e incubamos durante 1 hora a 60°C con agitación intermitente. Precipitamos el ADN con 600 µl de isopropanol durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), y centrifugamos la muestra a 13.000 x g durante 15 - 20 minutos a TA. Descartamos el sobrenadante, lavamos el pellet con etanol 70%, y dejamos secar al aire. Finalmente, resuspendemos el pellet en 30 µl de agua, y rehidratamos el ADN incubándolo durante 1 hora a 65°C. Conservamos los extractos a -20°C. Para realizar la amplificación por PCR, utilizamos 1-2 µl de la preparación como molde siguiendo el siguiente programa:

95°C	2 minutos
95°C	30 segundos
55°C	30 segundos

} 39 ciclos

72°C	40 segundos
72°C	5 minutos

Gen		Secuencia del primer (5'-3')
<b>Marcador de Micoplasma</b>	Forward	ACACCATGGGAGYTGGTAAT
	Reverse	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT
<b>Gapdh</b>	Forward	AAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG

Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio. El tamaño esperado del producto de PCR para el marcador de Micoplasma es de 400-500 pb aproximadamente.

## Transfección de líneas celulares con PEI

El método de transfección de células utilizando como agente Polietilenimina (PEI, Poliscience Inc.) se basa en la formación de complejos entre el ADN plasmídico y este compuesto polimérico que son endocitados por las células. El día previo a transfectar, sembramos la cantidad de células necesarias según la superficie de la placa o *well* que utilizemos. La relación ADN : PEI que utilizamos en este trabajo fue de 1 µg de ADN total : 10 µl de PEI (para CME), o de 1 µg de ADN total : 5 µl de PEI (para MEF). Brevemente, diluimos el ADN necesario en medio OPTIMEM sin suero ni antibióticos. Mezclamos el PEI con vórtex durante 10-15 segundos, y agregamos la cantidad necesaria al ADN ya diluido. Mezclamos e incubamos a TA durante 15 minutos. Luego, agregamos los complejos gota a gota a la placa correspondiente y homogenizamos. Incubamos las placas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y cambiamos el medio a las 24 horas.

## Técnicas para análisis de la expresión génica

### Extracción y cuantificación de ARN

Realizamos la extracción de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen) [191], según las indicaciones del fabricante. Este reactivo está compuesto por una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que facilitan el aislamiento de los diversos tipos de ARN. Brevemente, descartamos el medio de cultivo de la placa que contiene las células de las que haremos la extracción y agregamos 1 ml de Trizol por placa de 3,5 cm de diámetro, homogeneizamos e incubamos por 5 minutos a TA. Mediante uso de un rastrillo de goma cosechamos el extracto celular y colocamos la muestra en un tubo eppendorf. Agregamos 200  $\mu$ l de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, agitando vigorosamente por 15 segundos. Incubamos a TA por 2-3 minutos y centrifugamos el tubo a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. El contenido se separa en tres fases, siendo la superior acuosa la que contiene el ARN. Transferimos esta fase a un nuevo tubo eppendorf libre de RNAsas (“RNAsa free”), agregamos 0,5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol e incubamos 10 minutos a TA para favorecer la precipitación del ARN. Centrifugamos durante 10 minutos a 12000 x g a 4°C, descartamos cuidadosamente el sobrenadante y lavamos el *pellet* de ARN con 1 ml de etanol 75% por cada 1 ml de Trizol utilizado. Homogeneizamos con *vórtex* y centrifugamos a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet* durante 5 a 10 minutos a TA. Finalmente, resuspendemos el pellet en 30  $\mu$ l de agua RNAsa free y preservamos el ARN purificado a -80°C.

Para realizar la cuantificación del ARN utilizamos el equipo NanoDrop 2000 (*ThermoScientific*), un espectrómetro de amplio espectro (190-840 nm) que mide 1  $\mu$ l de muestra con alta eficiencia y reproducibilidad. Brevemente, calibramos al equipo con 1  $\mu$ l de agua para establecer el blanco de medición y luego, colocamos 1  $\mu$ l de cada muestra para realizar las mediciones. La concentración se obtiene por la medición de la absorbancia al excitar a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos, por lo que también lo utilizamos para realizar cuantificaciones de ADN. El equipo además mide la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y calcula la relación 260/280, que debe ser  $\sim 2$  para ser considerada de una pureza aceptable en el caso de muestras de ARN, y en el caso de ADN debe ser  $\sim 1,8$ .



## Retrotranscripción

Para la síntesis del ADNc utilizamos la enzima transcriptasa reversa del virus M-MuLV modificada genéticamente (*Thermo Scientific*). Esta enzima utiliza como molde ARN o ADN simple cadena en presencia de un *primer* para sintetizar la hebra de ADNc. Realizamos la reacción en dos pasos. Primero, colocamos en un tubo *ependorf* “RNAsa free” entre 1 y 3 µg de ARN y llevamos con H<sub>2</sub>O a un volumen final de 10 µl.

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

H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub>	4 µl
dNTP 25 mM (Life Technologies)	0,8 µl
Random Primers (Life Technologies)	0,2 µl
Buffer 5x	4 µl
RT-M-MuLV	1 µl

Incubamos a 25°C durante 10 minutos, y luego a 42°C por 60 minutos, tiempo en el cual la enzima cataliza la síntesis del ADNc. Por último, calentamos a 70°C por 10 minutos para inactivar la RT M-MuLV.

## RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Utilizamos la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de los ARNm de los genes 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 *FastStart SYBR Green Master* (Roche). Esta mezcla cuenta con el buffer adecuado, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, la enzima *FastStart 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.

Realizamos dos duplicados de cada gen que analizamos y tres muestras independientes para cada experimento y un blanco sin ADNc. Previo a la reacción, realizamos una dilución del ADNc de 1/5 o 1/10 en H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>. En cada *well* de la placa blanca de 96 *wells* (*low profile*, Bio-Rad) utilizada colocamos una mezcla compuesta por los siguientes componentes:

<b>H2OmQ</b>	3,25 µl
<b>Primer Forward 25µM</b>	0,5 µl
<b>Primer Reverse 25µM</b>	0,5 µl
<b>FastStart SYBR Green Master</b>	6,25 µl
<b>ADNc diluído 1/5 o 1/10</b>	2 µl
<b>Volumen total por reacción</b>	12,5 µl

El esquema de reacción es el siguiente:

<b>95°C</b>	10 minutos	} 40 ciclos
<b>95°C</b>	30 segundos	
<b>60°C</b>	30 segundos	
<b>72°C</b>	2 minuto	
<b>Curva de melting</b>		

Como se indica en la tabla, el esquema de reacción contiene 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. Estas curvas presentaron un único pico para todos los *primers* utilizados, indicando la presencia de un único producto de PCR. Más aun, cada vez que incorporamos un nuevo par de *primers* confirmamos el correcto tamaño del producto de amplificación y la presencia de una única

banda mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, luego lo verificamos analizando el perfil de los datos.

Extraemos los datos crudos utilizando el programa *MJ Opticon Monitor Software 3.1.32* (Bio-Rad) y los analizamos con el software de LinReg PCR [192], [193]. Obtenemos los valores de  $N_0$  (Número inicial de moléculas) utilizando el mismo programa, el cual los calcula teniendo en cuenta la intensidad de fluorescencia en el Ct de corte (*threshold*) y la eficiencia específica de cada par de *primers*. Normalizamos la expresión génica a la media geométrica de los genes gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) y fosfoglicerato kinasa 1 (Pgk1).

### Lista de *primers* utilizados

A continuación se detallan los primers empleados en este trabajo de tesis, algunos de los cuales fueron diseñados por nuestro laboratorio a través del software *Geneious*, que utiliza a la tecnología de *Primer3* [194]. La especificidad de los mismos fue verificada mediante la herramienta *Primer Blast* de NCBI.

Gen	Orientación	Secuencia del primer (5' a 3')	Producto (pb)
Oct3/4	Forward	TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG	254
	Reverse	TGACGGGAACAGAGGAAAG	
Nanog	Forward	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	364
	Reverse	CAACCACTGGTTTTCTGCCACCG	
Sox2	Forward	CACAACTCGGAGATCAGCAA	190
	Reverse	CTCCGGGAAGCGTGTACTTA	
Gapdh	Forward	TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG	248
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG	
Pgk1	Forward	TGGGCAAGGATGTTCTGTTC	242
	Reverse	TGCAGTCCCAAAGCATCAT	
HO-1	Forward	AAGAGGCTAAGACCGCCTTC	262
	Reverse	GCATAAATCCCACTGCCAC	
Gsr	Forward	GGGTGGCACTGCGTGAATG	167
	Reverse	GGCGGCTCACATAGGCATCCC	
Sod1	Forward	GTGTGCGTGCTGAAGGGCG	237
	Reverse	GTCTCCAACATGCCTCTTTC	

## DetECCIÓN DE PROTEÍNAS

### Inmunofluorescencia

Cultivamos las células sobre vidrios cubreobjetos en placas de 12 o 24 *wells* previamente recubiertos con gelatina 0,1%. Una vez adheridas las células, descartamos el medio de cultivo y realizamos un lavado con PBS. Fijamos las células con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a TA, y realizamos tres lavados de 5 minutos con PBS. Luego, permeabilizamos las células incubándolas con Tritón X-100 0,1 % en PBS durante 10 minutos a TA, y luego realizamos tres lavados con PBS-Tween (0,1 % Tween 20 en PBS). Bloqueamos las muestras incubando los *wells* durante media hora a TA con una solución de 10 % suero normal de burro al 1 % en PBS-Tween o con 1 % de Suero de cabra en PBS-Tween, dependiendo de los anticuerpos utilizados. Incubamos con 200 µl de una dilución del anticuerpo primario específico, preparada en solución de bloqueo, durante una hora a TA o toda la noche a 4 °C. Luego, realizamos 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween para remover el exceso de anticuerpo primario e incubamos con 200 µl de una dilución en solución de bloqueo del anticuerpo secundario por una hora a TA. En la mezcla de incubación, además agregamos 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0,1 µg/ml para marcar los núcleos de las células. Montamos los cubreobjetos con 5 µl de solución de montaje *Mowiol Reagent* (Calbiochem), dejamos secar durante toda la noche a resguardo de la luz, y sellamos con esmalte transparente. Conservamos en frío y en oscuridad hasta observar al microscopio. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX71 y posteriormente procesadas utilizando el software FIJI Is Just ImageJ (FIJI).

### Western Blot

Las células fueron cosechadas y se colectaron las muestras proteicas utilizando el Buffer RIPA (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Desoxicolato de Sodio, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 50 mM Tris-HCl, pH 8, suplementado con inhibidores de proteasas *Complete Mini EDTA-free* (Roche). Las muestras fueron resueltas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y luego transferidas a membranas de PVDF (Amersham), siguiendo protocolos convencionales. Se utilizó un gel separador con un porcentaje de

acrilamida/bisacrilamida de 15 %, y se corrió durante 1 hora 30 minutos. Se realizó el bloqueo de las membranas con PBST-BSA 0,1 % o en una solución de leche en polvo descremada 1 % durante 1 hora a TA y luego se incubó con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo a 4° C *overnight* (ON). Luego de realizar 3 lavados en PBS-T, se incubó con los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo durante 1 hora a TA. Las membranas fueron reveladas utilizando *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Amersham) en un equipo *G-Box System* (Syngene).

## Anticuerpos

A continuación se presenta una lista de los anticuerpos utilizados en este trabajo de tesis, especificando el número de catálogo y la dilución utilizada para Western Blot y para Inmunofluorescencia.

Nombre	Empresa y catálogo	Dilución para Western Blot	Dilución para Inmunofluorescencia	Especie
<b>OCT4</b>	Santa Cruz sc-5279	1:400	1:200	Mouse
<b>HO-1</b>	Abcam ab13248	1:1000	1:200	Mouse
<b>HA</b>	Santa Cruz sc-7392	-	1:50	Mouse
<b>GAPDH</b>	Santa Cruz sc-32233	1:500	-	Mouse
<b>anti-mouse AlexaFLuor 555</b>	Invitrogen A31570	-	1:2000	Donkey
<b>anti-mouse IgG-HRP</b>	Millipore AP124P	1:3000	-	Goat
<b>anti-mouse IgG-HRP</b>	Invitrogen G21040	1:1500		Goat

## Análisis de toxicidad del tratamiento con hemina

### Ensayo de MTT

Para determinar del efecto de la hemina sobre la viabilidad utilizamos el ensayo de MTT, que se basa en medir la generación de formazán, un compuesto coloreado, a partir de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Esta reacción es catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, por lo que determina la viabilidad celular de

manera indirecta a través de la actividad mitocondrial. Las células se cultivaron en placas de 96 *wells*. Al momento de la determinación, se agregaron 15µl de una solución de MTT 5 mg/ml a 150µL de medio de cultivo de las células y se incubó en estufa de cultivo por 30 minutos. Luego se lavó con PBS y se incubó por 15 minutos con 200 µl de isopropanol a TA. Se trasvasaron las muestras a una placa de 96 *wells* con base plana transparente (Nunc) y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas *Optima Fluostar*. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas por cada condición y se incluyó un blanco, la solución de MTT leída a 650nm.

### Tinción con Cristal Violeta

Para complementar los resultados del ensayo de MTT analizamos el efecto de hemina sobre la masa celular mediante tinción con cristal violeta. Este colorante se une a proteínas y ácidos nucleicos por lo cual la tinción obtenida es proporcional a la masa celular. Las células se cultivaron en placa de 96 *wells* con base plana transparente (Nunc). Al momento de la determinación, se fijaron con metanol por 10 minutos a -20°C. Luego se realizó la tinción con 0,5% Cristal Violeta en metanol durante 10 minutos a TA. Se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O corriente y se dejó secar al menos toda la noche a TA. Posteriormente se agregó una solución de ácido acético al 10 % y se incubó 15 minutos a TA y se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas Optima Fluostar. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 5 réplicas técnicas por cada condición y se incluyó un blanco, todo el protocolo de tinción sobre *wells* vacíos.

### Construcción del vector pSod1-luc

Para estudiar la actividad del promotor de Sod1, construimos un vector reportero conteniendo una región acotada este *locus*, un fragmento de 1246 pb, desde 1171 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción hasta 75 pb río abajo, en el vector comercial pGL3-Basic (Promega).

## Descripción del vector pGL3-Basic

Los vectores reporteros pGL3 Luciferase (Promega) proporcionan una base para el análisis cuantitativo de los factores que potencialmente podrían regular la expresión de genes de mamífero, actuando en *cis* como promotores y *enhancers*. Estos vectores pGL3 contienen una región modificada que codifica para la luciferasa de luciérnaga (*Photinuspyralis*), que ha sido optimizada para el seguimiento de la actividad transcripcional en las células eucariotas transfectadas. En particular, utilizamos el vector pGL3-Basic (Figura M.4) que posee un tamaño de 4,8 kpb y carece de una secuencia promotora o enhancer río arriba del gen de luciferasa, pero cuenta con un sitio de clonado múltiple río arriba de este gen, lo que permite el clonado de promotores para evaluar su potencial regulación en la transcripción. La expresión de la actividad de luciferasa en células transfectadas con este plásmido depende de la inserción y la orientación adecuada de un promotor funcional.

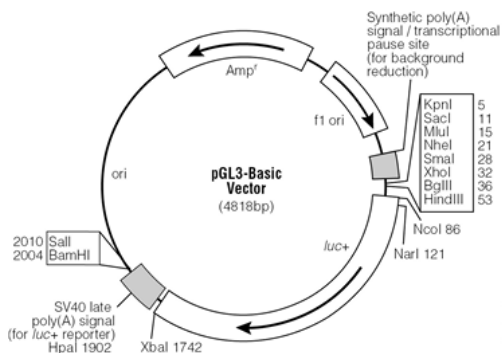


Figura M.1. Mapa del vector pGL3 Basic (Promega).

## Diseño de *primers* para clonado del promotor de Sod1

Para el diseño de los *primers* para el clonado de los distintos fragmentos de los promotores nos basamos en las secuencias adquiridas de la base de datos disponible en línea de *UCSC Genome Bioinformatics*, donde buscamos unas 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Es conveniente que la búsqueda abarque hasta el ATG del inicio de la traducción para poder diseñar un *primer Reverse* que incluya parte del 5' UTR. Decidimos diseñar varios juegos de *primers* para la secuencia promotora del gen Sod1 de la especie *Mus*

*musculus* (Gene ID: 20656). Para esto tuvimos en cuenta la posición de los sitios de unión de los factores de transcripción de interés (Oct4, Sox2 y Nanog) obtenidos mediante el *software on line MatInspector* de *Genomatix* (<http://www.genomatix.de/>) [134]. Diseñamos tres juegos de *primers* para abarcar distintas regiones, compuestos por un *primer Reverse* compartido y tres *primers Forward* distintos, que son complementarios a diferentes zonas del promotor. Asimismo, a cada *primer* le agregamos en el extremo 5' la secuencia de corte para la enzima de restricción que utilizamos para clonar el fragmento de interés en el vector pGL3-Basic. Para la elección de estas enzimas, tuvimos en cuenta que los sitios de corte de las enzimas elegidas no se superpongan en el sitio múltiple de clonado, que no existan sitios de corte en el fragmento de interés u otro sitio de corte en el vector y que en lo posible los *buffers* para la digestión sean compatibles para evitar realizar digestiones secuenciales. Para los *primers Forward* utilizamos la enzima Mlu I y para el *primer Reverse*, la enzima Xho I. Además de la secuencia de corte, al extremo 5' le agregamos algunas bases para que el corte de la enzima de restricción sea eficiente. En el caso de Mlu I, agregamos 3 bases (CTA), mientras que para la enzima Xho I agregamos 8 bases (CTAGATAC), como es recomendado. Una vez elegidas las enzimas, las bases extra y las secuencias complementarias de los *primers*, analizamos si cada uno forma dímeros de *primers* o si genera *loops* consigo mismo utilizando el programa *DNAman*. Finalmente, verificamos que la zona que se une a la región del promotor deseada fuera complementaria mediante la herramienta bioinformática *Primer BLAST* de NCBI, utilizando como molde el genoma de *Mus musculus*.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonado fueron:

Forward 5' CTAACGCGTGGAGTCCCCTATACCACGCCC 3'  
Reverse 5' CTAGATACCTCGAGAGAGAGAGCAAGACGAGAAG 3'

## PCR para obtención de los fragmentos del promotor

Realizamos las PCR para obtener los distintos fragmentos correspondientes a las regiones promotoras del gen *Sod1* utilizando la ADN polimerasa *KAPA2G® FastHotStart* (*Kapa Biosystems*), una enzima con alta velocidad de extensión y procesividad. Como molde usamos



ADN genómico de células de la línea CME R1, extraído y purificado mediante el kit *AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep* (Axygen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Preparamos las mezclas de PCR utilizando DMSO en las muestras para inhibir la formación de estructuras secundarias que pudiesen impedir la obtención de los productos de PCR. En la siguiente tabla se describe la composición de la mezcla para PCR para una reacción de 25 µl como volumen final:

<b>H2OmQ</b>	15,95 µl
<b>dNTP 25 mM (Life Technologies)</b>	0,2 µl
<b>Primers F y R 25 µM</b>	0,5 µl cada uno
<b>Buffer A 5x</b>	5 µl
<b>DMSO</b>	0,75 µl
<b>KAPA2G polimerasa (5 U/µl)</b>	0,1 µl
<b>ADN Templado</b>	2 µl

Los ciclos de amplificación para cada fragmento se detallan en el siguiente esquema:

<b>95°C</b>	1 minuto	} 40 ciclos
<b>95°C</b>	10 segundos	
<b>T óptima</b>	10 segundos	
<b>72°C</b>	15 seg/kb	
<b>72°C</b>	30 seg/kb	

Analizamos una alícuota del producto de amplificación de cada PCR mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8 % teñidos con bromuro de etidio, para poder visualizar las bandas de ADN. Obtuvimos un único producto del tamaño esperado, por lo que continuamos el clonado purificando el producto de PCR para su posterior digestión, utilizando el kit *Axyprep™ PCR Clean-up* (Axygen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### Clonado en el vector pGL3-Basic

A partir del vector pGL3-Basic realizamos las digestiones que se detallan a continuación. Digerimos 3 µg del vector con la enzima Mlu I durante 30 minutos y luego agregamos a la

mezcla la enzima Xho I. El fabricante del vector recomienda el paso de linearización previo al agregado de la enzima Xho I, ya que el superenrollamiento del plásmido puede dificultar el acceso al sitio de corte para esta enzima. Una vez agregadas las dos enzimas a la mezcla de digestión, incubamos los tubos a 37°C durante 2 horas. Luego, realizamos la desfosforilación del vector para evitar su religado. Para esto utilizamos la fosfatasa alcalina (CIAP, Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Si bien es poco probable que ocurra el religado del vector dado que realizamos una doble digestión y los extremos no son complementarios, nuestro objetivo es evitar que se ligen los extremos en el caso de quedar una población de vector parcialmente digerido, con un único corte.

Purificamos el vector digerido y desfosforilado de la mezcla de enzimas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % teñido con bromuro de etidio, y posteriormente cortamos del gel la banda de correspondiente al vector. Para la purificación del vector del gel de agarosa utilizamos el kit AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El protocolo utilizado se basa en la disolución de la agarosa y la retención del ADN en una columna para su posterior elución en 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.

Empleamos 500 ng del fragmento a ser clonado siguiendo el mismo protocolo de digestión y purificación que usamos para el vector pGL3-Basic. Finalmente, cuantificamos el vector y el fragmento purificado utilizando el NanoDrop 2000 y, por otra parte, lo corrimos en un gel de agarosa 0,8 % para verificar su tamaño y calidad.

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

<b>Inserto a clonar</b>	70 ng-100 ng
<b>100 ng pGL3-Basic digerido</b>	1,1 µl
<b>Buffer de ligación 10x</b>	1 µl
<b>Ligasa de ADN T4</b>	1 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q</b>	csp 10 µl

Además, realizamos una reacción de ligación sin inserto para evaluar el porcentaje de religado del vector. Incubamos las mezclas a 16 °C ON. Transformamos bacterias ultracompetentes *E. coli* DH5α por el método de *heat shock* durante 90 segundos, las sembramos en placas con LB agar-Ampicilina y las incubamos durante toda la noche a 37°C.

Armamos *pools* de colonias transformantes y mediante extracción de baja escala con lisis alcalina (miniprep) obtuvimos el ADN plasmídico. Evaluamos si estos plásmidos contenían clonado el fragmento de interés mediante digestión con las enzimas utilizadas para los clonados y posterior corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8%.

Una vez identificadas las colonias que poseen el plásmido de interés, lo enviamos a secuenciar para corroborar que el inserto y su orientación sean correctos. Para esto se utilizaron en el proceso unos *primers* que son complementarios a la secuencia del vector pGL3-Basic río arriba y río abajo del sitio de clonado, y que se detallan a continuación:

Primer	Secuencia
RVprimer3 Forward (5'-3')	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GLprimer2 Reverse (5'-3')	CTTTATGTTTTGGCGTCTCCA

Confirmamos el correcto clonado del fragmento y la ausencia de mutaciones mediante secuenciación del vector obtenido mediante el servicio de la empresa Macrogen.

## Generación de la línea de CME *knockout* para HO-1 tecnología

### CRISPR/Cas9

Para generar la línea de CME *knockout* para HO-1 empleamos la estrategia CRISPR/Cas9. Para esto utilizamos un plásmido derivado del pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0, que codifica para la proteína Cas9 y resistencia a Puromicina y en este caso, contiene el sgRNA dirigido contra el exón 2 del gen de HO-1. Este plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. Dulak [130] y contiene todo lo necesario para realizar la edición génica de interés y seleccionar los clones transfectados.

Se realizó la transfección de las CME de la línea W4 utilizando el reactivo PEI. Al día siguiente, se realizó un cambio de medio por medio fresco con 3 µg/ml de Puromicina para seleccionar las células transfectadas. Se continuó con la selección por 48 horas y luego se realizó una dilución de las células de forma tal de que cada colonia provenga de una única célula. Se mantuvieron los clones en crecimiento por una semana y luego fueron aislados

manualmente mediante el uso de una aguja observando las colonias con una lupa. De esta manera, se aislaron 36 clones que fueron amplificados de manera separada para evaluar posteriormente la expresión de HO-1 y las posibles modificaciones genéticas. Una vez aislados, se los cultivó hasta que las células proliferaran lo suficiente como para poder congelar una partes y además realizar una extracción de proteínas para su análisis mediante IF y *Western blot*.

## Estudio de la regulación génica por los factores de transcripción de CMP

Con el propósito de estudiar si Oct4, Sox2 y Nanog, regulan la expresión de Sod1, Gsr y HO-1, combinamos diferentes distintos abordajes.

### Modulación de los FT en CME

#### *Modulación por inducción de diferenciación*

Utilizamos un protocolo de diferenciación no dirigida que consiste en cultivo de las CME en adherencia en medio de diferenciación. Para esto se plaquea las células en condiciones estándar en placas pre-tratadas con gelatina y al día siguiente, una vez adheridas al sustrato, se cambia el medio de cultivo por medio que no contiene LIF ni 2i. Se las cultiva hasta 4 días, cambiando el medio al día 2.

#### *Silenciamiento mediante el uso de short hairpin RNA*

Para el silenciamiento de los distintos FT utilizamos vectores que contienen secuencias para generar *shRNAs* específicos para cada FT río abajo de un promotor constitutivo, y además codifican para el gen de resistencia a puromicina (Sigma). Sembramos CME R1 en placas p60 previamente recubiertas con gelatina en medio de propagación estándar suplementado con LIF. Al día siguiente, transfectamos las células utilizando PEI como agente de transfección, en una relación ADN : PEI de 1 µg de ADN total : 5 µl de PEI, usando 3 µg de ADN total para la superficie indicada. Cambiamos el medio a las 24 y a las 48 horas post-transfección por medio

fresco con puromicina en una concentración final de 3 µg/ ml, para seleccionar las células transfectadas. A las 72 horas post-transfección descartamos el medio de cultivo, lavamos con PBS, extrajimos ARN y analizamos los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Como condiciones control, utilizamos células R1 transfectadas con un vector que expresa un *shRNA* dirigido contra el ARNm de GFP, y células transfectadas con el vector vacío pLKO.1.

## **Análisis del efecto de la expresión ectópica de los FT en un sistema heterólogo sobre construcciones reporteras**

Sembramos 16.000 células de la línea NIH/3T3 en *wells* de placas de 24 *wells* (MW24) y al día siguiente las transfectamos usando 910 ng de ADN total por *well*, con una relación 1 µg de ADN total: 5 µl de PEI. Co-transfectamos el vector reportero correspondiente con los vectores de expresión de los FT indicados pMXs-Oct3/4, pMXs-Nanog o pMXs-Sox2 (Addgene) según corresponda y para normalizar los niveles de transfección, co-transfectamos el plásmido pRL-TK (Promega), que codifica para la enzima luciferasa de la especie *Renilla reniformis*. Realizamos triplicados de cada condición ensayada en cada réplica biológica. A las 48 horas post-transfección descartamos el medio de cultivo, lavamos con PBS y lisamos las células utilizando 80 µl del buffer de lisis (ver apartado de Soluciones y medios de cultivo) en frío. Colectamos el lisado y lo centrifugamos 2 minutos a 10.000 rpm. En una placa blanca de 96 *wells* (Lumitrac 200, Greiner), sembramos 10 µl del sobrenadante para medir la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis*, incubándolo con 1µl de su sustrato, coelenterazina H 50 µM (Promega), durante 15 minutos a TA. Medimos su actividad en el luminómetro *Glomax Multi Detection System* (Promega) con 5 segundos de integración. Para medir la actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* incubamos 50 µl del sobrenadante con 55 µl de *buffer* conteniendo su sustrato, luciferina (Promega), a TA y realizamos la lectura de los *wells*.

Utilizamos el valor de lectura de la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis* en cada *well* para normalizar los niveles de transfección. Los valores de actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* se expresan como la relación entre los valores medidos para la actividad de esta enzima y los obtenidos para la actividad de la luciferasa de *Renilla* y relativizados a la condición basal.

## Microscopía confocal

### Preparación de las células para microscopía confocal

Para los experimentos de microscopía en células vivas, se plaquearon las células en cubreobjetos de 18 mm de diámetro, colocados dentro de placas de 12 *wells*, con *coating* de PDL-laminina, que permite mayor adherencia de las células que la gelatina, disminuyendo así el movimiento durante la adquisición de las imágenes. Luego, se plaquearon 70.000 células por *well* que fueron incubadas con MP. Para visualizar HA-HO-1 y HP1 $\alpha$ , se realizaron transfecciones transitorias utilizando Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) y 1,6  $\mu$ g de plásmido en medio Opti-MEM (Thermo Fisher). Se reemplazó el medio a las 24 horas por medio fresco, y las observaciones al microscopio se realizaron 48 horas post-transfección.

### Obtención de imágenes por microscopía confocal

Las imágenes de las células se obtuvieron en un microscopio confocal FV1000 (Olympus), con un objetivo de aceite de inmersión UPLSAPO 60X (Olympus), de apertura numérica 1.35. El fluoróforo GFP se excitó con un láser de Argón multi-línea sintonizado a 488 nm. La potencia promedio de los láseres sobre las muestras fue de  $\sim 1 \mu$ W. La apertura confocal se mantuvo en 105  $\mu$ m. La emisión de fluorescencia proveniente de los fluoróforos se separó con un espejo dicróico 405/408. Se utilizaron bandas de detección espectrales en 500-600 nm. La fluorescencia se detectó con fotomultiplicadores configurados en modo *pseudo photon-counting*. La adquisición de las imágenes se realizó en modo secuencial de cuadro. El tamaño de píxel se ajustó en 82 nm. Se obtuvieron imágenes con un tamaño de 256 x 256 píxeles, con un tiempo de barrido de 40  $\mu$ s/píxel, y en *stack* temporal para obtener 5 imágenes del mismo campo, para luego utilizar la imagen promedio para el análisis. Las imágenes fueron tomadas a partir de células vivas mantenidas en medio de cultivo en todo momento durante la adquisición.

### Análisis de imágenes

Para cada imagen nuclear, se calculó el coeficiente de variación (CV) como el cociente entre el desvío estándar (DE) de la intensidad nuclear y la intensidad media del núcleo. Los

nucléolos fueron excluidos previamente por selección manual ya que HP1 se encuentra por fuera de estas estructuras. Los *foci* fueron identificados mediante imágenes binarias de los núcleos calculadas a partir de los umbrales (*thresholds*) preestablecidos para cada imagen como la media de intensidad + 2DE. El número, tamaño e intensidad media de los *foci* se calcularon utilizando el plugin de *ImageJ* “*Analyze Particles*”. Solo se consideraron aquellas estructuras cuyos tamaños superaron la resolución óptica.

## Análisis Estadístico

Los resultados experimentales se presentaron como la media  $\pm$  error estándar de la media para tres réplicas biológicas. Según el diseño experimental, la significancia estadística entre grupos fue analizada utilizando Modelos Lineales Mixtos (MLM), con un diseño de ANOVA en bloques al azar, o con test de *student* no pareado. Para todos los casos, se analizó la normalidad en las distribuciones de los residuos mediante el test de *Shapiro-Wilks*, y gráficamente mediante Q-Q Plot. Se realizó la transformación de los datos con la función  $\log_{10}$  en aquellos casos que no cumplían con el supuesto de normalidad. Se analizó además la homocedasticidad a través de gráficos de dispersión de residuos estandarizados versus predichos y mediante la prueba de *Levene*. Para las comparaciones *post hoc* entre los grupos, se utilizó el test de *Tukey* (todos contra todos). Consideramos significativas aquellas pruebas con  $p < 0,05$ , a menos que se indique otro valor.

## Técnicas microbiológicas

### Preparación de bacterias ultracompetentes

Las bacterias ultracompetentes poseen una eficiencia del orden de  $10^8$  colonias transformantes por mg de plásmido. Para su preparación incubamos en esterilidad, un cultivo de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  en medio SOB a 18-22°C con agitación moderada, hasta que alcanza una  $DO_{600}$  de 0,55. Transferimos el cultivo a un baño agua-hielo por 10 minutos. Luego cosechamos las bacterias centrifugando a 3220 x g por 20 minutos a 4°C y realizamos un

lavado resuspendiéndolas en 80 ml de Buffer Inoue frío. Centrifugamos nuevamente a 2500 x g por 10 minutos a 4°C y resuspendemos las bacterias en 20 ml de Buffer Inoue frío. Agregamos 1,5 ml de DMSO, mezclamos suavemente la suspensión de bacterias y la incubamos en hielo por 10 minutos. Rápidamente, alicuotamos la suspensión en tubos eppendorfs pre-enfriados a -20°C y estériles, y los sumergimos inmediatamente en un baño de nitrógeno. Conservamos el stock de bacterias ultracompetentes a -80°C. Determinamos la eficiencia de transformación de las bacterias transformándolas con un plásmido de concentración conocida, sembrando tres diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000), y calculando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por µg de DNA plasmídico, encontrándose en el orden de 10<sup>6</sup> UFC/µg. El *stock* de bacterias ultracompetentes se conserva en alícuotas a -80 °C.

### **Transformación de bacterias: método de golpe de calor (*Heat Shock*)**

Realizamos la transformación de bacterias mediante la técnica de golpe de calor, o *Heat Shock* [195]. Utilizamos bacterias ultracompetentes de la cepa *E. coli* DH5α. Para seleccionar las transformantes, sembramos las bacterias en placas LB agar con ampicilina o kanamicina, según corresponda. Éstas se mantienen ON a 37°C y al día siguiente, evaluamos la presencia de colonias transformantes.

### **Purificación de ADN plasmídico en escala pequeña (Miniprep)**

Utilizamos el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly [196] para purificar ADN plasmídico con fines analíticos a baja escala y de forma rápida. El protocolo utilizado se basa en la lisis alcalina de las bacterias utilizando NaOH y SDS.

### **Purificación de ADN plasmídico a media escala (Midiprep)**

Para la preparación de ADN plasmídico a mediana escala se utilizó el kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el DNA plasmídico fue cuantificado por su absorbancia a 260 nm, mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 2000*, y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa 0,8% para verificar su calidad. Este método se utiliza para lograr mayor concentración



y pureza del plásmido para su posterior uso en cultivo celular para transfección, o para realizar clonados subsiguientes.

## Soluciones y medios de cultivo

### PBS 1x

NaCl	8 mg
KCl	200 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,14 mg
H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub> estéril	csp 1 litro

### Medio de propagación para CMP

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 15%)	7,5 ml
Glutamax 200 mM (100x)	500 µl
Aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)	500 µl
Penicilina/Estreptomicina (100x)	500 µl
β-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 µl
LIF 1000x	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub> estéril	csp 50 ml

### Medio de diferenciación para CMP

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 20%)	10 ml
Glutamax 200 mM (100x)	500 µl
Aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)	500 µl
Penicilina/Estreptomicina (100x)	500 µl
β-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub> estéril	csp 50 ml

### Medio de propagación para MEF y CHO

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 10%)	5 ml
Penicilina/Estreptomicina (100x)	500 µl
H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub> estéril	csp 50 ml

Para el cultivo de CHO agregar 500 µl piruvato de sodio 100 mM.

### Buffer de lisis para determinación de actividad de luciferasa

Tritón X-100 10%	200 µl
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500 mM pH7,8	20 ml
DTT 100 mM	1 ml
H <sub>2</sub> O	csp 100 ml

### Buffer luciferasa

	Para 12,5 reacciones (incluyendo un 10 % de error)
GGSM*	390 µl
EGTA 100 mM	31,25 µl
Tritón X-100 10%	16,88 µl
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	93,75 µl
H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub>	182,35 µl
ATP 2,5 mM	50 µl
DTT 1M	0,94 µl
Luciferina 1mM	15,63 µl

\* glicilglicina 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 7,5 mM pH 7,8

### Medio LB

Extracto de levadura	5 g
Triptona de carne	10 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	csp 1 litro

### Solución 1 Preparación DNA plasmídico

Tris-HCl pH 7,5 1 M	2 ml
EDTA 0,5 M	0,8 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	csp 40 ml

### Solución 2 Preparación DNA plasmídico

NaOH 1M	4 ml
SDS 10%	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	csp 20 ml

### Solución 3 Preparación DNA plasmídico

Ácido acético glacial 100%	5,75 ml
Acetato de potasio 5M	30 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	csp 50 ml

### Buffer TE

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

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. J. Grubb, "Developmental Biology, Eighth Edition. Scott F. Gilbert, editor.," *Integr. Comp. Biol.*, vol. 46, no. 5, pp. 652–653, 2006, doi: 10.1093/icb/icl011.
- [2] N. Saiz and B. Plusa, "Early cell fate decisions in the mouse embryo," *Reproduction*. 2013, doi: 10.1530/REP-12-0381.
- [3] K. Hochedlinger and R. Jaenisch, "Nuclear transplantation: Lessons from frogs and mice," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 14, no. 6. pp. 741–748, 2002, doi: 10.1016/S0955-0674(02)00380-0.
- [4] G. R. Martin, "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 12, pp. 7634–7638, 1981, doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- [5] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells

- from mouse embryos.," *Nature*, vol. 292. pp. 154–156, 1981, doi: 10.1038/292154a0.
- [6] J. a Thomson *et al.*, "Isolation of a primate embryonic stem cell line.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 17, pp. 7844–7848, 1995, doi: PMC41242.
- [7] J. a Thomson *et al.*, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.," *Science*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, 1998, doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- [8] B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong, a Trounson, and a Bongso, "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 399–404, 2000, doi: 10.1038/74447.
- [9] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [10] K. Takahashi *et al.*, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [11] A. Bradley, M. Evans, M. H. Kaufman, and E. Robertson, "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines," *Nature*, 1984, doi: 10.1038/309255a0.
- [12] T. Boroviak, R. Loos, P. Bertone, A. Smith, and J. Nichols, "The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification," *Nat. Cell Biol.*, 2014, doi: 10.1038/ncb2965.
- [13] I. G. M. Brons *et al.*, "Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos," *Nature*, 2007, doi: 10.1038/nature05950.
- [14] F. J. Najm *et al.*, "Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos," *Cell Stem Cell*, 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.01.016.
- [15] J. Nichols and A. Smith, "Naive and Primed Pluripotent States," *Cell Stem Cell*. 2009, doi: 10.1016/j.stem.2009.05.015.
- [16] A. G. Smith *et al.*, "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 688–690, 1988, doi: 10.1038/336688a0.
- [17] R. L. Williams *et al.*, "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 684–687, 1988, doi: 10.1038/336684a0.
- [18] H. Hirai, P. Karian, and N. Kikyo, "Regulation of embryonic stem cell self-renewal

and pluripotency by leukaemia inhibitory factor," *Biochemical Journal*. 2011, doi: 10.1042/BJ20102152.

- [19] I. Chambers *et al.*, "Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development," *Nature*, 2007, doi: 10.1038/nature06403.
- [20] K. Hayashi, S. M. C. de S. Lopes, F. Tang, and M. A. Surani, "Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States," *Cell Stem Cell*, 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.07.027.
- [21] T. Burdon, C. Stracey, I. Chambers, J. Nichols, and A. Smith, "Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells," *Dev. Biol.*, 1999, doi: 10.1006/dbio.1999.9265.
- [22] Q. L. Ying *et al.*, "The ground state of embryonic stem cell self-renewal," *Nature*, 2008, doi: 10.1038/nature06968.
- [23] J. Wray *et al.*, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation," *Nat. Cell Biol.*, 2011, doi: 10.1038/ncb2267.
- [24] I. Chambers and S. R. Tomlinson, "The transcriptional foundation of pluripotency.," *Development*, vol. 136, no. 14, pp. 2311–22, 2009, doi: 10.1242/dev.024398.
- [25] S. Masui *et al.*, "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells," *Nat Cell Biol*, vol. 9, no. 6, pp. 625-U26, 2007, doi: Doi 10.1038/Ncb1589.
- [26] H. Niwa, J. Miyazaki, and A. G. Smith, "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.," *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 4, pp. 372–376, 2000, doi: 10.1038/74199.
- [27] Y.-H. Loh *et al.*, "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells.," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 4, pp. 431–440, 2006, doi: 10.1038/ng1760.
- [28] L. a Boyer *et al.*, "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells," *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 947–956, Sep. 2005, doi: S0092-8674(05)00825-1 [pii] 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- [29] K. Mitsui *et al.*, "The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells," *Cell*, vol. 113, no. 5, pp. 631–642, 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3.
- [30] I. Chambers *et al.*, "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells," *Cell*, vol. 113, no. 5, pp. 643–655, May 2003.

- [31] J. Silva *et al.*, “Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State,” *Cell*, vol. 138, no. 4, pp. 722–737, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.07.039.
- [32] T. Kunath, D. Strumpf, and J. Rossant, “Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse—a review,” *Placenta*, vol. 25 Suppl A, pp. S32–8, 2004, doi: 10.1016/j.placenta.2004.01.015.
- [33] J. C. Kiefer, “Back to basics: Sox genes,” *Developmental Dynamics*, vol. 236, no. 8, pp. 2356–2361, 2007, doi: 10.1002/dvdy.21218.
- [34] J. Nichols *et al.*, “Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4,” *Cell*, vol. 95, no. 3, pp. 379–391, 1998, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81769-9.
- [35] A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge, “Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function,” *Genes Dev.*, vol. 17, no. 1, pp. 126–140, 2003, doi: 10.1101/gad.224503.
- [36] K. Hochedlinger and R. Jaenisch, “Induced pluripotency and epigenetic reprogramming,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a019448.
- [37] T. Yadav, J. P. Quivy, and G. Almouzni, “Chromatin plasticity: A versatile landscape that underlies cell fate and identity,” *Science*. 2018, doi: 10.1126/science.aat8950.
- [38] M. Li, G. H. Liu, and J. C. I. Belmonte, “Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012, doi: 10.1038/nrm3393.
- [39] T. Ali, R. Renkawitz, and M. Bartkuhn, “Insulators and domains of gene expression,” *Current Opinion in Genetics and Development*. 2016, doi: 10.1016/j.gde.2015.11.009.
- [40] M. A. Zabidi and A. Stark, “Regulatory Enhancer–Core–Promoter Communication via Transcription Factors and Cofactors,” *Trends in Genetics*. 2016, doi: 10.1016/j.tig.2016.10.003.
- [41] A. Pombo and N. Dillon, “Three-dimensional genome architecture: Players and mechanisms,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015, doi: 10.1038/nrm3965.
- [42] A. Gaspar-Maia, A. Alajem, E. Meshorer, and M. Ramalho-Santos, “Open chromatin in pluripotency and reprogramming,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011, doi: 10.1038/nrm3036.
- [43] M. Bulger and M. Groudine, “Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers,” *Cell*. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.01.024.
- [44] V. W. Zhou, A. Goren, and B. E. Bernstein, “Charting histone modifications and the

- functional organization of mammalian genomes,” *Nature Reviews Genetics*. 2011, doi: 10.1038/nrg2905.
- [45] R. Villaseñor and T. Baubec, “Regulatory mechanisms governing chromatin organization and function,” *Current Opinion in Cell Biology*. 2021, doi: 10.1016/j.ceb.2020.10.015.
- [46] W. W. Tee and D. Reinberg, “Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs,” *Development (Cambridge)*. 2014, doi: 10.1242/dev.096982.
- [47] M. Perino and G. J. C. Veenstra, “Chromatin Control of Developmental Dynamics and Plasticity,” *Developmental Cell*. 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.004.
- [48] L. A. Boyer *et al.*, “Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells,” *Nature*, 2006, doi: 10.1038/nature04733.
- [49] S. P. Medvedev, E. A. Pokushalov, and S. M. Zakian, “Epigenetics of Pluripotent Cells,” *Acta Naturae*, 2012, doi: 10.32607/20758251-2012-4-4-28-46.
- [50] B. E. Bernstein *et al.*, “A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells,” *Cell*, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041.
- [51] A. Harikumar and E. Meshorer, “Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells,” *EMBO Rep.*, 2015, doi: 10.15252/embr.201541011.
- [52] H. Sutherland and W. A. Bickmore, “Transcription factories: Gene expression in unions?,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 7, pp. 457–466, 2009, doi: 10.1038/nrg2592.
- [53] J. C. Eisenberg and S. C. Elgin, “The HP1 protein family: Getting a grip on chromatin,” *Current Opinion in Genetics and Development*. 2000, doi: 10.1016/S0959-437X(00)00058-7.
- [54] N. Dillon, “Heterochromatin structure and function,” *Biology of the Cell*. 2004, doi: 10.1016/j.biolcel.2004.06.003.
- [55] S. Efroni *et al.*, “Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells,” *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 5, pp. 437–447, 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.03.021.
- [56] X. Wei *et al.*, “Small molecule compound induces chromatin de-condensation and facilitates induced pluripotent stem cell generation,” *J. Mol. Cell Biol.*, 2014, doi: 10.1093/jmcb/mju024.
- [57] E. Meshorer and T. Misteli, “Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 7, pp. 540–546, 2006, doi: 10.1038/nrm1938.

- [58] A. Mattout and E. Meshorer, "Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells," *Current Opinion in Cell Biology*. 2010, doi: 10.1016/j.ceb.2010.02.001.
- [59] E. M. Hildebrand and J. Dekker, "Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization," *Trends in Biochemical Sciences*. 2020, doi: 10.1016/j.tibs.2020.01.002.
- [60] S. F. Banani, H. O. Lee, A. A. Hyman, and M. K. Rosen, "Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.7.
- [61] A. G. Larson *et al.*, "Liquid droplet formation by HP1 $\alpha$  suggests a role for phase separation in heterochromatin," *Nature*, 2017, doi: 10.1038/nature22822.
- [62] A. Boija *et al.*, "Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains," *Cell*, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.10.042.
- [63] V. P. Skulachev, "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants," *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 29, no. 2. pp. 169–202, 1996, doi: 10.1017/s0033583500005795.
- [64] C. Ufer and C. C. Wang, "The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development.," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 4, p. 12, Jan. 2011, doi: 10.3389/fnmol.2011.00012.
- [65] T. Finkel and N. J. Holbrook, "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.," *Nature*, vol. 408, no. 6809, pp. 239–247, 2000, doi: 10.1038/35041687.
- [66] J. F. Turrens, "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.," *Biosci. Rep.*, vol. 17, no. 1, pp. 3–8, 1997, doi: 10.1023/A:1027374931887.
- [67] H. Z. Chae, S. W. Kang, and S. G. Rhee, *Oxidants and Antioxidants Part B*, vol. 300. Elsevier, 1999.
- [68] C. L. Bigarella, R. Liang, and S. Ghaffari, "Stem cells and the impact of ROS signaling.," *Development*, vol. 141, no. 22, pp. 4206–18, 2014, doi: 10.1242/dev.107086.
- [69] H. J. Leese, "Metabolism of the preimplantation embryo: 40 Years on," *Reproduction*, vol. 143, no. 4. pp. 417–427, 2012, doi: 10.1530/REP-11-0484.
- [70] H. J. Leese and A. M. Barton, "Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos.," *J. Reprod. Fertil.*, vol. 72, no. 1, pp. 9–13, Sep. 1984, Accessed: Jan. 18, 2016. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6540809>.
- [71] J. C. St John *et al.*, "The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human



- embryonic stem cells," *Methods Mol Biol*, vol. 331, pp. 347–374, 2006, doi: 10.1385/1-59745-046-4:347.
- [72] L. Armstrong *et al.*, "Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells," *Stem Cells*, vol. 28, no. 4, pp. 661–673, 2010, doi: 10.1002/stem.307.
- [73] G. Saretzki, L. Armstrong, A. Leake, M. Lako, and T. von Zglinicki, "Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells.," *Stem Cells*, vol. 22, no. 6, pp. 962–971, 2004, doi: 10.1634/stemcells.22-6-962.
- [74] G. Saretzki *et al.*, "Downregulation of Multiple Stress Defense Mechanisms During Differentiation of Human Embryonic Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 26, no. 2, pp. 455–464, 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0628.
- [75] K. Ito *et al.*, "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells.," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 446–451, 2006, doi: 10.1038/nm1388.
- [76] Y.-Y. Jang and S. J. Sharkis, "A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche.," *Blood*, vol. 110, no. 8, pp. 3056–63, Oct. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-05-087759.
- [77] P. Lisowski, P. Kannan, B. Mlody, and A. Prigione, "Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis," *EMBO Rep.*, 2018, doi: 10.15252/embr.201745432.
- [78] I. N. Zelko, T. J. Mariani, and R. J. Folz, "Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no. 3, pp. 337–349, 2002, doi: 10.1016/S0891-5849(02)00905-X.
- [79] T. T. Huang *et al.*, "Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 344, no. 2, pp. 424–432, 1997, doi: 10.1006/abbi.1997.0237.
- [80] J. M. McCord and I. Fridovich, "An Enzymic Function for Erythrocyte Hemocuprein (Hemocuprein)," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, 1969.
- [81] A. Okado-Matsumoto and I. Fridovich, "Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 42, pp. 38388–38393, 2001.
- [82] L. A. Sturtz, K. Diekert, L. T. Jensen, R. Lill, and V. C. Culotta, "A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 41, pp. 38084–

38089, 2001, doi: 10.1074/jbc.M105296200.

- [83] S. L. Marklund, E. Holme, and L. Hellner, "Superoxide dismutase in extracellular fluids," *Clin. Chim. Acta*, vol. 126, no. 1, pp. 41–51, 1982, doi: 10.1016/0009-8981(82)90360-6.
- [84] R. A. Weisiger and I. Fridovich -, "Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 248, no. 13. pp. 4793–4796, 1973.
- [85] D. K. St. Clair, T. D. Oberley, K. E. Muse, and W. H. St. Clair, "Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 275–282, 1994, doi: 10.1016/0891-5849(94)90153-8.
- [86] J. R. Wispé *et al.*, "Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 33, pp. 23937–23941, 1992.
- [87] L. Miao and D. K. St.Clair, "Regulation of superoxide dismutase genes: implications in diseases," *Free Radic Biol Med*, vol. 47, no. 4, pp. 344–356, 2010, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.Regulation.
- [88] A. Y. Andreyev, Y. E. Kushnareva, and A. A. Starkov, "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 70, no. 2. pp. 200–214, 2005, doi: 10.1007/s10541-005-0102-7.
- [89] D. Han, F. Antunes, R. Canali, D. Rettori, and E. Cadenas, "Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 8, pp. 5557–5563, 2003, doi: 10.1074/jbc.M210269200.
- [90] B. Chance, H. Sies, and A. Boveris, "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs," *Physiol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 527–605, 1979, doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
- [91] J. D. Lambeth, "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 3. pp. 181–189, 2004, doi: 10.1038/nri1312.
- [92] A. G. Reaume *et al.*, "Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury," *Nat. Genet.*, vol. 13, no. 1, pp. 43–47, 1996, doi: 10.1038/ng0596-43.
- [93] B. J. Turner and K. Talbot, "Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS," *Progress in Neurobiology*. 2008, doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.01.001.
- [94] J. S. Valentine, P. A. Doucette, and S. Z. Potter, "Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis," *Annual Review of Biochemistry*. 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647.

- [95] F. L. Muller *et al.*, "Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 40, no. 11, pp. 1993–2004, 2006, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.036.
- [96] S. Elchuri *et al.*, "CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life," *Oncogene*, vol. 24, no. 3, pp. 367–380, 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208207.
- [97] S. Karumbayaram *et al.*, "Human embryonic stem cell-derived motor neurons expressing SOD1 mutants exhibit typical signs of motor neuron degeneration linked to ALS," *DMM Dis. Model. Mech.*, 2009, doi: 10.1242/dmm.002113.
- [98] H. Chen *et al.*, "Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons," *Cell Stem Cell*, 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.02.004.
- [99] M. Izrael *et al.*, "Safety and efficacy of human embryonic stem cell-derived astrocytes following intrathecal transplantation in SOD1 G93A and NSG animal models," *Stem Cell Res. Ther.*, 2018, doi: 10.1186/s13287-018-0890-5.
- [100] R. V. Blackburn *et al.*, "Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells," *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00217-2.
- [101] A. P. Arrigo, "Gene expression and the thiol redox state," 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(99)00175-6.
- [102] D. W. Voehringer, "BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity," 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(99)00174-4.
- [103] I. A. Cotgreave and R. G. Gerdes, "Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: A molecular link between oxidative stress and cell proliferation?," *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998, doi: 10.1006/bbrc.1997.7812.
- [104] V. I. Kulinsky and L. S. Kolesnichenko, "The glutathione system. II. Other enzymes, thiol-disulfide metabolism, inflammation, and immunity, functions," *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2009, doi: 10.1134/S1990750809030019.
- [105] L. K. Rogers, T. Tamura, B. J. Rogers, S. E. Welty, T. N. Hansen, and C. V. Smith, "Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout," *Toxicol. Sci.*, 2004, doi: 10.1093/toxsci/kfh268.
- [106] R. N. Ondarza, J. L. Rendón, and M. Ondarza, "Glutathione reductase in evolution," *J. Mol. Evol.*, 1983, doi: 10.1007/BF02101641.

- [107] W. Pretsch, "Glutathione reductase activity deficiency in homozygous Gr1(a1Neu) mice does not cause haemolytic anaemia," *Genet. Res.*, 1999, doi: 10.1017/S0016672398003590.
- [108] F. Q. Schafer and G. R. Buettner, "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple," *Free Radical Biology and Medicine*. 2001, doi: 10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- [109] J. Jurado, M.-J. Prieto-Alamo, J. Madrid-Rísquez, and C. Pueyo, "Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 46, pp. 45546–54, Nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M307866200.
- [110] M. E. Robbins *et al.*, "Glutathione reductase deficiency alters lung development and hyperoxic responses in neonatal mice," *Redox Biol.*, 2021, doi: 10.1016/j.redox.2020.101797.
- [111] R. Gozzelino, V. Jeney, and M. P. Soares, "Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1," 2010, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600.
- [112] A. Loboda, A. Jozkowicz, and J. Dulak, *HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism - Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy*, vol. 74. Elsevier B.V., 2015.
- [113] L. E. Otterbein, M. P. Soares, K. Yamashita, and F. H. Bach, "Heme oxygenase-1 : unleashing the protective properties of heme," vol. 24, no. 8, pp. 449–455, 2003, doi: 10.1016/S1471-4906(03)00181-9.
- [114] A. Grochot-Przeczek, J. Dulak, A. J.-C. science, and undefined 2012, "Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology," *clinsci.org*.
- [115] A. Yachie *et al.*, "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 1, pp. 129–135, 1999, doi: 10.1172/JCI4165.
- [116] K. D. Poss and S. Tonegawa, "Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 20, pp. 10919–10924, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.20.10919.
- [117] K. D. Poss and S. Tonegawa, "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 20, pp. 10925–10930, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.20.10925.
- [118] G. Yang *et al.*, "Heme oxygenase-1 regulates postnatal lung repair after hyperoxia: Role of  $\beta$ -catenin/hnRNPK signaling," *Redox Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 234–243, 2013, doi: 10.1016/j.redox.2013.01.013.
- [119] C. Davis *et al.*, "MicroRNA-183-5p Increases with Age in Bone-Derived Extracellular

Vesicles, Suppresses Bone Marrow Stromal (Stem) Cell Proliferation, and Induces Stem Cell Senescence.," *Tissue Eng. Part A*, 2017, doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0525.

- [120] Y. B. Jiang *et al.*, "Effects of heme oxygenase-1 gene modulated mesenchymal stem cells on vasculogenesis in ischemic swine hearts," *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2011, doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2011.03.015.
- [121] Y. L. Tang, Y. Tang, Y. C. Zhang, K. Qian, L. Shen, and M. I. Phillips, "Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector," *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005, doi: 10.1016/j.jacc.2005.05.079.
- [122] O. D. Liang *et al.*, "Mesenchymal stromal cells expressing heme oxygenase-1 reverse pulmonary hypertension," *Stem Cells*, 2011, doi: 10.1002/stem.548.
- [123] A. Zarjou *et al.*, "Paracrine effects of mesenchymal stem cells in cisplatin-induced renal injury require heme oxygenase-1," *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, 2011, doi: 10.1152/ajprenal.00594.2010.
- [124] M. Kozakowska, K. Szade, J. Dulak, and A. Jozkowicz, "Role of heme oxygenase-1 in postnatal differentiation of stem cells: A possible cross-talk with MicroRNAs," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 20, no. 11, pp. 1827–1850, 2014, doi: 10.1089/ars.2013.5341.
- [125] S. Mora-Castilla *et al.*, "Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation," *Cell Death Differ.*, 2010, doi: 10.1038/cdd.2009.204.
- [126] S. H. Lee, H. N. Suh, Y. J. Lee, B. N. Seo, J. W. Ha, and H. J. Han, "Midkine prevented hypoxic injury of mouse embryonic stem cells through activation of Akt and HIF-1 $\alpha$  via low-density lipoprotein receptor-related protein-1," *J. Cell. Physiol.*, 2011, doi: 10.1002/jcp.22897.
- [127] C. Y. Lin *et al.*, "Exacerbation of oxidative stress-induced cell death and differentiation in induced pluripotent stem cells lacking heme oxygenase-1," *Stem Cells Dev.*, 2012, doi: 10.1089/scd.2011.0304.
- [128] H. B. Suliman, F. Zobi, and C. A. Piantadosi, "Heme oxygenase-1/carbon monoxide system and embryonic stem cell differentiation and maturation into cardiomyocytes," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 24, no. 7, pp. 345–360, 2016, doi: 10.1089/ars.2015.6342.
- [129] Y.-L. Lai, C.-Y. Lin, W.-C. Jiang, Y.-C. Ho, C.-H. Chen, and S.-F. Yet, "Loss of heme oxygenase-1 accelerates mesodermal gene expressions during embryoid body development from mouse embryonic stem cells," *Redox Biol.*, vol. 15, pp. 51–61, May 2018, doi: 10.1016/j.redox.2017.11.019.
- [130] J. Stepniewski *et al.*, "Heme oxygenase-1 affects generation and spontaneous

cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells," *IUBMB Life*, Jan. 2018, doi: 10.1002/iub.1711.

- [131] A. Winkler *et al.*, "Glutathione is essential for early embryogenesis - Analysis of a glutathione synthetase knockout mouse," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.056.
- [132] C. Solari *et al.*, "Manganese Superoxide Dismutase Gene Expression Is Induced by Nanog and Oct4, Essential Pluripotent Stem Cells' Transcription Factors," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, p. e0144336, Jan. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0144336.
- [133] T. Kalkan *et al.*, "Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency," *Dev.*, 2017, doi: 10.1242/dev.142711.
- [134] K. Cartharius *et al.*, "MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites," *Bioinformatics*, 2005, doi: 10.1093/bioinformatics/bti473.
- [135] S. Oki *et al.*, "ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data," *EMBO Rep.*, vol. 19, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.15252/embr.201846255.
- [136] J. T. Robinson *et al.*, "Integrative genomics viewer," *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 1, pp. 24–26, 2011, doi: 10.1038/nbt.1754.
- [137] P. Veneri\* *et al.*, "Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62235-0.
- [138] Q.-L. Ying, M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li, and A. Smith, "Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture.," Feb. 2003. doi: 10.1038/nbt780.
- [139] C. Solari *et al.*, "The pluripotency transcription factor Nanog represses glutathione reductase gene expression in mouse embryonic stem cells," *BMC Res. Notes*, vol. 12, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13104-019-4411-0.
- [140] M. Studies, "Intracellular Site of Synthesis of Microsomal Heme Oxygenase," *In Vitro*, vol. 88, no. 1, pp. 45–50, 1980.
- [141] D. P. Converso, C. Taillé, M. C. Carreras, A. Jaitovich, J. J. Poderoso, and J. Boczkowski, "HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism.," *FASEB J.*, vol. 20, no. 8, pp. 1236–1238, 2006, doi: 10.1096/fj.05-4204fje.
- [142] M. A. Riddle and B. R. Walker, "Regulation of endothelial BK channels by heme oxygenase-derived carbon monoxide and caveolin-1," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, 2012, doi: 10.1152/ajpcell.00356.2011.

- [143] Q. Lin *et al.*, “Heme Oxygenase-1 Protein Localizes to the Nucleus and Activates Transcription Factors Important in Oxidative Stress \*,” vol. 282, no. 28, pp. 20621–20633, 2007, doi: 10.1074/jbc.M607954200.
- [144] C. Biswas *et al.*, “Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 39, pp. 26882–26894, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.567685.
- [145] C. Deluz *et al.*, “A role for mitotic bookmarking of SOX2 in pluripotency and differentiation,” *Genes Dev.*, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1101/gad.289256.116.
- [146] D. Strebinger, C. Deluz, E. T. Friman, S. Govindan, A. B. Alber, and D. M. Suter, “Endogenous fluctuations of OCT4 and SOX2 bias pluripotent cell fate decisions,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 15, no. 9, p. e9002, 2019, doi: 10.15252/msb.20199002.
- [147] L. L. Dunn, R. G. Midwinter, J. Ni, H. A. Hamid, C. R. Parish, and R. Stocker, “New Insights into Intracellular Locations and Functions of Heme Oxygenase-1,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 11, pp. 1723–1742, 2014, doi: 10.1089/ars.2013.5675.
- [148] M. Ferrando *et al.*, “Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer,” *Angiogenesis*, vol. 14, no. 4, pp. 467–479, Dec. 2011, doi: 10.1007/s10456-011-9230-4.
- [149] A. Rizzino and E. L. Wuebben, “Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis,” *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1859, no. 6, pp. 780–791, 2016, doi: 10.1016/j.bbagr.2016.03.006.
- [150] A. V Paez *et al.*, “Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell–cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 12, p. e2570, Dec. 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.420.
- [151] A. Paez, E. Vazquez, and G. Gueron, “Heme oxygenase 1 governs the cytoskeleton at filopodia: pulling the brakes on the migratory capacity of prostate tumoral cells,” *Cell Death Discov.*, vol. 3, p. 17020, Apr. 2017, doi: 10.1038/cddiscovery.2017.20.
- [152] A. Kumar and H. Kono, “Heterochromatin protein 1 (HP1): interactions with itself and chromatin components,” *Biophys. Rev.*, vol. 12, no. 2, pp. 387–400, 2020, doi: 10.1007/s12551-020-00663-y.
- [153] C. Huang *et al.*, “CBX3 maintains lineage specificity during neural differentiation,” *Genes Dev.*, vol. 31, no. 3, pp. 241–246, 2017, doi: 10.1101/gad.292169.116.
- [154] R. Aucott *et al.*, “HP1 - $\beta$  is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions,” *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 4, pp. 597–606, 2008, doi: 10.1083/jcb.200804041.
- [155] A. Mattout *et al.*, “Heterochromatin Protein 1 $\beta$  (HP1 $\beta$ ) has distinct functions and

distinct nuclear distribution in pluripotent versus differentiated cells,” *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0760-8.

- [156] S. D. Thorpe and D. A. Lee, “Dynamic regulation of nuclear architecture and mechanics—a rheostatic role for the nucleus in tailoring cellular mechanosensitivity,” *Nucleus*, vol. 8, no. 3, pp. 287–300, 2017, doi: 10.1080/19491034.2017.1285988.
- [157] A. Tajik *et al.*, “Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin,” *Nat. Mater.*, vol. 15, no. 12, pp. 1287–1296, 2016, doi: 10.1038/nmat4729.
- [158] M. A. A. K. Folgueira *et al.*, “Gene expression profiling of clinical stages II and III breast cancer,” *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 1101–1113, 2006, doi: 10.1590/S0100-879X2006000800013.
- [159] M. S. Cosentino *et al.*, “Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation,” *J. Mol. Biol.*, vol. 431, no. 6, pp. 1148–1159, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.02.012.
- [160] D. M. Presman *et al.*, “Insights on glucocorticoid receptor activity modulation through the binding of rigid steroids,” *PLoS One*, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013279.
- [161] H. Htun, L. T. Holth, D. Walker, J. R. Davie, and G. L. Hager, “Direct visualization of the human estrogen receptor reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor,” *Mol. Biol. Cell*, 1999, doi: 10.1091/mbc.10.2.471.
- [162] A. Nugud, D. Sandeep, and A. T. El-Serafi, “Two faces of the coin: Minireview for dissecting the role of reactive oxygen species in stem cell potency and lineage commitment,” *Journal of Advanced Research*. 2018, doi: 10.1016/j.jare.2018.05.012.
- [163] Y. Imamura *et al.*, “Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of age-related macular degeneration,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 30, pp. 11282–11287, 2006, doi: 10.1073/pnas.0602131103.
- [164] H. Was, J. Dulak, and A. Jozkowicz, “Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy,” *Curr. Drug Targets*, vol. 11, no. 12, pp. 1551–1570, 2012, doi: 10.2174/1389450111009011551.
- [165] L. H. Oxygenase- *et al.*, “Exacerbation of Oxidative Stress-Induced Cell Death,” vol. 21, no. 10, 2012, doi: 10.1089/scd.2011.0304.
- [166] C. Solari *et al.*, “Superoxide dismutase 1 expression is modulated by the core pluripotency transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog in embryonic stem cells,”



*Mech. Dev.*, vol. 154, pp. 116–121, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.mod.2018.06.004.

- [167] S. Oki *et al.*, “Ch IP -Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public Ch IP -seq data,” *EMBO Rep.*, vol. 19, no. 12, 2018, doi: 10.15252/embr.201846255.
- [168] H. Xu, Y. S. Ang, A. Sevilla, I. R. Lemischka, and A. Ma’ayan, “Construction and Validation of a Regulatory Network for Pluripotency and Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells,” *PLoS Comput. Biol.*, 2014, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003777.
- [169] X. Chen *et al.*, “Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells,” *Cell*, 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.04.043.
- [170] I. Barbagallo *et al.*, “A cytoprotective role for the heme oxygenase-1/CO pathway during neural differentiation of human mesenchymal stem cells,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, no. 9, pp. 1927–1935, 2008, doi: 10.1002/jnr.21660.
- [171] G. Li Volti *et al.*, “Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: Effect of glutamate,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 315, no. 2, pp. 517–524, 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.090.
- [172] I. Barbagallo *et al.*, “Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation,” *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 28, no. 3, pp. 276–288, 2010, doi: 10.1007/s00774-009-0134-y.
- [173] M. Kozakowska *et al.*, “Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 16, no. 2, pp. 113–127, 2012, doi: 10.1089/ars.2011.3964.
- [174] A. Toro *et al.*, “Novel Interplay between p53 and HO-1 in Embryonic Stem Cells,” *Cells*, vol. 10, no. 1, p. 35, Dec. 2020, doi: 10.3390/cells10010035.
- [175] D. Pasini, A. P. Bracken, M. R. Jensen, E. Lazzerini Denchi, and K. Helin, “Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity,” *EMBO J*, vol. 23, no. 20, pp. 4061–4071, 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.76004027600402 [pii].
- [176] H. Zhao *et al.*, “The chromatin remodeler Chd4 maintains embryonic stem cell identity by controlling pluripotency- and differentiation-associated genes,” *J. Biol. Chem.*, 2017, doi: 10.1074/jbc.M116.770248.
- [177] N. Mor *et al.*, “Neutralizing Gatad2a-Chd4-Mbd3/NuRD Complex Facilitates Deterministic Induction of Naive Pluripotency,” *Cell Stem Cell*, vol. 23, no. 3, pp. 412–425.e10, 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.07.004.
- [178] M. Pardo *et al.*, “An Expanded Oct4 Interaction Network: Implications for Stem Cell

Biology, Development, and Disease," *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 382–395, 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.03.004.

- [179] J. Liang *et al.*, "Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells," *Nat Cell Biol*, vol. 10, no. 6, pp. 731–739, 2008, doi: ncb1736 [pii]10.1038/ncb1736.
- [180] V. Kashyap *et al.*, "Regulation of Stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs," *Stem Cells Dev.*, vol. 18, no. 7, pp. 1093–1108, 2009, doi: 10.1089/scd.2009.0113.
- [181] Q. S. Lin, S. Weis, G. Yang, T. Zhuang, A. Abate, and P. A. Dennerly, "Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 44, no. 5, pp. 847–855, 2008, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.012.
- [182] M. Linnenbaum, M. Busker, J. R. Kraehling, and S. Behrends, "Heme oxygenase isoforms differ in their subcellular trafficking during hypoxia and are differentially modulated by cytochrome P450 reductase," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035483.
- [183] N. A. Gandini *et al.*, "Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 93, no. 2, pp. 237–245, 2012, doi: 10.1016/j.yexmp.2012.05.001.
- [184] E. J. Sohn, H. J. Moon, J. K. Lim, D. S. Kim, and J. H. Kim, "Regulation of the protein stability and transcriptional activity of OCT4 in stem cells," *Adv. Biol. Regul.*, 2021, doi: 10.1016/j.jbior.2020.100777.
- [185] S. M. Buckley *et al.*, "Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin-proteasome system," *Cell Stem Cell*, 2012, doi: 10.1016/j.stem.2012.09.011.
- [186] M. Nitti, S. Piras, U. M. Marinari, L. Moretta, M. A. Pronzato, and A. L. Furfaro, "HO-1 induction in cancer progression: A matter of cell adaptation," *Antioxidants*. 2017, doi: 10.3390/antiox6020029.
- [187] G. Lomberk, L. L. Wallrath, and R. Urrutia, "The Heterochromatin Protein 1 family," *Genome Biology*, vol. 7, no. 7. 2006, doi: 10.1186/gb-2006-7-7-228.
- [188] S. H. Kwon and J. L. Workman, "The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription," *BioEssays*, vol. 33, no. 4. pp. 280–289, 2011, doi: 10.1002/bies.201000138.
- [189] F. Hediger and S. M. Gasser, "Heterochromatin protein 1: Don't judge the book by

its cover!," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 16, no. 2, pp. 143–150, 2006, doi: 10.1016/j.gde.2006.02.013.

- [190] R. Sridharan *et al.*, "Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1 $\gamma$  in reprogramming to pluripotency," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 872–882, 2013, doi: 10.1038/ncb2768.
- [191] C. Numbers, "TRIzol<sup>®</sup> Reagent," no. 15596026, pp. 18–21, 2010.
- [192] C. Ramakers, J. M. Ruijter, R. H. L. Deprez, and A. F. . Moorman, "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data," *Neurosci. Lett.*, vol. 339, no. 1, pp. 62–66, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.
- [193] J. M. Ruijter *et al.*, "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 6, p. e45, Apr. 2009, doi: 10.1093/nar/gkp045.
- [194] M. Kearse *et al.*, "Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data," *Bioinformatics*, 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- [195] J. Sambrook i D. W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual, III*. 2001.
- [196] H. C. Bimboim and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA," *Nucleic Acids Res.*, 1979, doi: 10.1093/nar/7.6.1513.