



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

**Dinámica de los factores de transcripción de pluripotencia OCT4 y
SOX2 en células madre pluripotentes embrionarias.**

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

Lic. Paula Veneri

Directora de tesis: Valeria Levi
Codirectora de tesis: Alejandra Guberman

Consejero de estudios: Mario D. Galigniana

Buenos Aires, Junio 2023.

Dinámica de los factores de transcripción de pluripotencia OCT4 y SOX2 en células madre pluripotentes embrionarias.

Las células madre embrionarias (CME) tienen dos propiedades fundamentales que las diferencian de otros tipos celulares: son capaces de autorrenovarse, es decir, de dividirse dando células hijas iguales entre sí y a la que les dio origen, y son pluripotentes, ya que tienen la capacidad de diferenciarse generando todos los tipos celulares del organismo adulto. Comprender los mecanismos moleculares que gobiernan la pluripotencia es de suma relevancia, tanto para el área de la biología del desarrollo como por las promisorias aplicaciones de las células madre pluripotentes en la generación de modelos de enfermedades y en medicina regenerativa.

El mantenimiento del estado pluripotente se debe principalmente a la acción de los factores de transcripción (TFs) OCT4, SOX2 y NANOG que, en conjunto, activan genes involucrados en la autorrenovación y pluripotencia y reprimen aquellos relacionados con la diferenciación. Al inducir la diferenciación, los niveles de NANOG, disminuyen rápidamente mientras que los de OCT4 y SOX2 se mantienen constantes durante la salida del estado de pluripotencia *naïve*.

En los últimos años, se ha estudiado la relevancia de la compartimentalización nuclear en la regulación de la transcripción y se ha observado la existencia de “condensados transcripcionales” donde se concentran tanto factores de transcripción como la maquinaria transcripcional. Por otra parte, se ha determinado que las señales mecánicas cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación.

En este contexto, la hipótesis de nuestro trabajo es que ciertos estímulos específicos, incluyendo señales químicas de diferenciación o mecánicas, modulan la distribución nuclear de los TFs de pluripotencia y su dinámica de interacción con la cromatina regulando así el perfil de expresión génica e impactando en el destino celular.

Para testear esta hipótesis, nos propusimos estudiar la distribución y dinámica de OCT4 y SOX2 en CME en estado indiferenciado y al inicio de la diferenciación utilizando técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia. Además, analizamos la relación entre el citoesqueleto, estructura que interviene en la transmisión de señales mecánicas, y dicha distribución y dinámica.

Para este estudio, utilizamos líneas estables de CME que expresan los TFs de interés fusionados a una proteína fluorescente (YPet) garantizando niveles de expresión estables, moderados y similares entre células.

Nuestros estudios muestran que tanto SOX2 como OCT4 forman condensados o *foci* nucleares que colocalizan con regiones de cromatina compactada. Estos condensados se reorganizan de manera diferente durante la salida del estado pluripotente *naïve*, en una ventana temporal que precede a la disminución en los niveles de expresión de estos TFs (< 48 h).

Estos resultados muestran que la distribución de los TFs y en particular la de OCT4, es sensible a señales de diferenciación. La formación de nuevos *foci* y los cambios en la cantidad de

moléculas reclutadas podrían modular la concentración de los TFs en el nucleoplasma y su disponibilidad para interactuar con sus sitios blanco en el DNA, constituyendo un nivel extra en la regulación transcripcional durante la salida del estado de pluripotencia *naïve*.

Utilizando espectroscopía de correlación de fluorescencia, determinamos que las interacciones TF-cromatina son distintas en *foci* y nucleoplasma; específicamente, una mayor proporción de TFs se encuentra unido a la cromatina en *foci* y lo hace por más tiempo. Además, la inducción de la diferenciación promueve cambios en las interacciones de OCT4 con la cromatina en la ventana temporal estudiada. En particular, una menor proporción de moléculas de OCT4 interactúa con la cromatina y lo hacen por menos tiempo en células inducidas a diferenciarse. Por otro lado, SOX2 presenta cambios muy sutiles en sus interacciones con la cromatina. Esta respuesta diferencial en la interacción TF-cromatina para OCT4 y SOX2 podría estar relacionada con las funciones que cumplen dichos TFs durante la salida del estado pluripotente *naïve*.

Para analizar la relación entre las fuerzas transmitidas por el citoesqueleto y la organización y dinámica de los TFs, inicialmente caracterizamos la organización del citoesqueleto en CME por microscopía confocal, en tres dimensiones y en células vivas. Los pocos estudios disponibles hasta el momento sólo aportaban información proveniente de imágenes bidimensionales adquiridas en células fijadas químicamente. Además, estudiamos si el citoesqueleto modula la morfología nuclear y las interacciones OCT4-cromatina afectando para ello la integridad de las distintas redes de filamentos que lo componen.

Observamos que las redes de actina y de filamentos intermedios de vimentina contribuyen a definir la morfología nuclear en forma opuesta. Específicamente, la red de actina transmite señales al núcleo deformándolo mientras que la red de vimentina protege a la organela de las fuerzas mecánicas. Por otro lado, las señales mecánicas transmitidas por la red de actina promoverían una disminución en el número de moléculas de OCT4 que se unen con la cromatina, mientras que la red de vimentina produciría el efecto contrario.

Por otra parte, determinamos que la red de actina se encuentra involucrada en la organización de OCT4 en el núcleo celular, promoviendo una distribución más homogénea con menos condensados de OCT4 por célula. Llamativamente, observamos que la depolimerización de la red de microtúbulos no altera la organización intranuclear de este TF, pero promueve el transporte de OCT4 al citoplasma celular sugiriendo que esta red modula directa o indirectamente el transporte núcleo-citoplasma del TF.

Estos resultados indicarían que las fuerzas mecánicas transmitidas hacia el núcleo pueden inducir cambios rápidos en la concentración y distribución de TFs, lo que en última instancia impactaría en las interacciones TF-cromatina. En el caso de los TFs de pluripotencia, esta reorganización podría definir los programas transcripcionales relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia y el inicio de la diferenciación.

En conclusión, en este trabajo mostramos que, tanto estímulos químicos que pueden inducir la salida del estado pluripotente *naïve* como señales mecánicas transmitidas por el citoesqueleto, tienen efectos relativamente rápidos y relevantes en la distribución nuclear de los TFs de pluripotencia OCT4 y SOX2 y en el paisaje de sus interacciones con la cromatina.

Por último, queremos destacar que, por fuera de los objetivos inicialmente planteados en esta tesis y en el marco de la situación de emergencia excepcional que constituyó la pandemia causada por el SARS-CoV-2, desarrollamos un kit para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, sin extracción de RNA, posteriormente autorizado por ANMAT y comercializado por una empresa argentina.

Palabras clave: células madre embrionarias, células madre pluripotentes, citoesqueleto, condensados, diferenciación, dinámica de interacción, distribución nuclear, espectroscopía de correlación de fluorescencia, factor de transcripción, *foci*, pluripotencia.

Dynamics of the pluripotency transcription factors OCT4 and SOX2 in pluripotent embryonic stem cells.

Embryonic stem cells (ESCs) have an unlimited possibility of self-renewal and are pluripotent, which means that they can give rise to all cell types derived from the three germ layers. Understanding the molecular mechanisms that govern pluripotency is crucial for both the comprehension of mammalian embryo development and for the applications of these cells in regenerative medicine.

Pluripotency maintenance depends on the transcription factors (TFs) OCT4, SOX2 and NANOG that induce genes required to preserve pluripotency and repress others involved in differentiation. NANOG expression rapidly decreases while OCT4 and SOX2 levels remain stable at the onset of differentiation.

In the last years, a wealth of evidence has shown that many nuclear components are organized in membraneless organelles. Particularly, the transcriptional machinery including several TFs concentrates in transcriptional condensates with elusive functions. On the other hand, other seminal contributions showed that forces applied to cells could modulate pluripotency maintenance and guide differentiation.

In this context, our hypothesis is that specific stimuli such as chemical cues or mechanical forces modulate the distribution of pluripotency TFs in the nuclear space and define the concentration of TFs molecules available for interactions with chromatin targets therefore affecting cell fate decisions.

To test this hypothesis, we studied the distribution and dynamics of OCT4 and SOX in undifferentiated ESCs and at the onset of differentiation by using advanced fluorescence microscopy techniques. Furthermore, we analyzed the relationship between the cytoskeleton, which is involved in force transmission, and the distribution and dynamics of these TFs.

With this aim, we used stable cell lines that express OCT4 or SOX2 fused to the fluorescent protein YPet in an inducible manner. This system allows controlling the expression levels of the YPet-TFs and minimizes the large cell-to-cell variability observed with transient transfections.

We found that OCT4 and SOX2 concentrate in chromatin-dense *foci* in undifferentiated ESCs that reorganize, in a TF-dependent manner, at early differentiation stages that precede their downregulation. The formation of new *foci* and/or the recruitment of molecules to these condensates may regulate the concentration of TFs in the nucleoplasm.

By using fluorescence correlation spectroscopy, we detected that the interactions of OCT4 and SOX2 with chromatin are stronger in *foci* than in the nucleoplasm. Moreover, differentiation signals caused an impairment of OCT4-chromatin interactions in the nucleoplasm

whereas SOX2 only showed a slight increase in the lifetime of short-lived interactions with the DNA. This different response to differentiation cues could be related with the different functions of these TFs during the exit of *naïve* pluripotency.

In order to analyze the relationship between forces transmitted by the cytoskeleton and the dynamical organization of the pluripotency TFs, we studied the organization of the cytoskeleton in live ESCs using 3D confocal imaging. In contrast, a few previous reports only provided information of single-plane images of fixed cells. Moreover, we analyzed whether the cytoskeleton modulates the nuclear morphology and OCT4-chromatin interactions by disrupting the different cytoskeleton networks.

Our results suggest that the actin network and vimentin intermediate filaments define the nuclear morphology in opposed ways. Actin transmits mechanical forces that deform the nucleus whereas vimentin protects the nucleus. On the other hand, the actin network communicates mechanical signals to the nucleus that seem to impair TF-chromatin interactions while vimentin affects OCT4 dynamics oppositely.

In addition, the actin network promotes a more homogeneous distribution of OCT4 in the nucleus with a reduced number of *foci*. Surprisingly, microtubules depolymerization does not modify the TF intranuclear organization but favors OCT4 transport to the cytoplasm, suggesting that this network may modulate the nucleus-cytoplasm transport. Thus, forces transmitted to the nucleus trigger fast changes in the distribution and concentration of OCT4 in the nucleus, which ultimately could affect the OCT4-chromatin interactions.

To conclude, we showed that chemical stimuli that triggers *naïve* pluripotency exit, and mechanical cues transmitted by the cytoskeleton produce a relatively fast reorganization of the pluripotency TFs in the nuclear space that affect the landscape of TF-chromatin interactions. This different landscape could contribute to defining the transcriptional programs associated with pluripotency maintenance or differentiation.

Finally, we would like to highlight that, besides the initial aims of this thesis and in the context of the COVID-19 pandemic, we developed an extraction-free protocol for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR, authorized by ANMAT and commercialized by an argentine company.

Keywords: condensates, cytoskeleton, differentiation, dynamical interactions, embryonic stem cells, fluorescence correlation spectroscopy, *foci*, nuclear distribution, pluripotency, pluripotent stem cells, transcription factor.

Agradecimientos

A mis amigos de la facultad. Esto empezó en 2012 cuando nos conocimos y no hubiera llegado hasta acá sin su compañía durante la cursada y su amistad de oro, Esteban, Franco, Pau, Romi, Mati, Salva, Pol y Mari. A Fede y Sebas a quienes también conocí en estos pasillos.

A todo QB6 y QB71. Knd, Cami, Belén, Ceci, Camilota, Aye, Sabri, Mark, Martín, Mariano, Tincho y Juanjo. A Vale y Ale por la paciencia (en particular los últimos dos meses) e instrucción. A la banda de QB81, Momis, Mati, Sol y Nati. A Ayelén Arrech por responder mis 400 dudas administrativas en este último mes. A Fran por hacerme reír en los pasillos.

Al grupo de PK+HID, Vale Genoud, Vir Dansey, Bruno Bernardino, Ari Waisman y Fede Remes Lenicov; junto a otros fantáticos investigadores que conocí en estos años como Luciana Bruno, Victoria Repetto, Esteban Mocskos, Mariela Sued y José Crespo.

A Gatuli por todo su amor en forma de ronroneos y a Lupo (mi perro) por sus mimos.

A Martu, a quién comprendí mucho mientras escribía esta tesis. A mis amigas de escalada, Isa, Flor e Inve. A las chicas de la secundaria, Ale, Azu y Belén. A “las chicas del karting”. A Sabri y sus porquerías. A Flora. A Lucas y Car. A Sole. A Vika por su paciencia en estos meses de locura. A mi familia.

A Alexandra Asanovna Elbakyan.

A Messi, Di Maria, Enzo y Julián.

Indice

Publicaciones y financiamiento	12
Abreviaturas	13
Capítulo 1: Células Madre	14
1.1 Introducción	14
1.2 Clasificación de células madre.....	14
1.3 Células madre en el contexto del desarrollo embrionario.....	16
1.4 Células madre en el contexto de la medicina.....	18
1.5 Factores de transcripción de pluripotencia.....	22
1.6 Regulación de la pluripotencia y su mantenimiento en cultivo celular	24
Capítulo 2: Organización del núcleo celular y el paradigma de condensados líquidos.....	26
2.1 Introducción	26
2.2 La organización funcional de la cromatina	26
2.2.1 La accesibilidad de la cromatina.....	28
2.2.2 La accesibilidad de la cromatina y la pluripotencia.....	31
2.3 Condensados nucleares.....	31
2.4 Condensados transcripcionales.....	35
2.5 Los condensados y su relación con la pluripotencia	37
Capítulo 3: Rol del citoesqueleto en la transmisión de señales mecánicas al núcleo celular	40
3.1 Introducción	40
3.2 Las redes del citoesqueleto	40
3.2.1 La red de actina	41
3.2.1.1 Propiedades generales de la red de actina	41
3.2.1.2 La red de actina en células madre embrionarias.....	42
3.2.2 La red de microtúbulos.....	44
3.2.2.1 Propiedades generales de los microtúbulos	44
3.2.2.2 Los microtúbulos en células madre embrionarias	45
3.2.3 Los filamentos intermedios: vimentina.....	46
3.2.3.1 Propiedades generales de los FI.....	46

3.2.3.2 La vimentina en células madre embrionarias.....	46
3.3 Comunicación entre el citoesqueleto y el núcleo	48
3.4 Laminas en células madre pluripotentes.....	50
3.5 Las fuerzas mecánicas influyen en la regulación transcripcional	51
3.6 Factores de transcripción mecanosensibles.....	53
3.7 El citoesqueleto y las fuerzas mecánicas durante el desarrollo	54
Capítulo 4: Hipótesis y objetivos	57
Capítulo 5: Materiales y métodos	58
5.1 Cultivo Celular	58
5.1.2 Protocolo de diferenciación	59
5.1.3 Preparación de muestras para microscopía	59
5.2 Transfecciones de plásmidos.....	59
5.2.2 Transformación de bacterias para la preparación de plásmidos	60
5.2.3 MidiPrep con extracción orgánica	61
5.2.4 Cuantificación de plásmidos.....	61
5.3 Tratamientos con drogas que interfieren con la función del citoesqueleto	62
5.4 Preparación de muestras para inmunofluorescencia (IF).....	62
5.5 Microscopia Confocal	63
5.5.1 Realización y análisis de experimentos de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)	64
5.5.2 Estimación de concentraciones nucleares de TFs por FCS.....	67
5.5.3 Estimación temporal de la traslocación núcleo-citoplasma.....	67
5.6 Análisis de imágenes	68
5.6.1 Análisis cuantitativo de foci.....	68
5.6.2 Cuantificación del cociente de partición empírico de TFs entre núcleo-citoplasma ...	69
5.6.3 Análisis de imágenes 3D	70
5.6.4 Mapa de flujo de cometas de EB3-GFP	72
5.7 Análisis Estadísticos	72
Capítulo 6: Distribución nuclear de los factores de transcripción de pluripotencia OCT4 y SOX2	73
6.1 Introducción	73
6.2 Propiedades de las líneas celulares W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2	74
6.3 Distribución nuclear de OCT4 y SOX2.....	77

6.4 Los foci de OCT4 y SOX2 colocalizan con regiones de alta compactación de cromatina	78
6.5 Reorganización nuclear de TFs de pluripotencia durante el proceso de diferenciación celular	80
6.6 Reorganización de OCT4 y SOX2 en clones independientes	85
6.7 Conclusiones.....	86
Capítulo 7: Dinámica de los factores de transcripción de pluripotencia OCT4 y SOX2 en el inicio de la diferenciación	89
7.1 Introducción	89
7.2 La dinámica de interacción TF-cromatina es distinta entre los foci y el nucleoplasma	89
7.3 La dinámica de interacción OCT4-cromatina es más rápida al inicio de la diferenciación .	92
7.4 La dinámica de interacción SOX2-cromatina cambia sutilmente al comienzo de la diferenciación.....	94
7.5 Dinámica de OCT4 y SOX2 en clones independientes.....	95
7.6 Conclusiones.....	96
Capítulo 8: El citoesqueleto de células madre embrionarias	100
8.1 Introducción	100
8.2 Caracterización de las diferentes redes del citoesqueleto en células madre embrionarias.	100
8.3 La forma y el tamaño del núcleo son modulados por las redes de actina y vimentina. ...	107
8.4 Las redes de actina y de vimentina modulan la organización dinámica de OCT4.....	110
8.5 Conclusiones.....	112
Capítulo 9: Rol del citoesqueleto en la distribución subcelular y nuclear de OCT4	114
9.1 Introducción	114
9.2 La red de microtúbulos modula la partición núcleo-citoplasma de OCT4.	114
9.3 La red de actina modula la distribución intranuclear de OCT4	119
9.4 Conclusiones.....	123
Capítulo 10: Discusión y conclusiones.....	126
Anexo I: Desarrollo de un método para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, sin extracción de RNA.....	133
I.1. Introducción.	133
I.2. Antecedentes bibliográficos.	134
I.3. La incubación con proteinasa K mejora la performance del protocolo respecto a aquellos que solo incluyen la inactivación por calor (“HID”).....	135

I.4. El método PK+HID permite una eficiente detección del gen N1.....	137
I.5. El método PK+HID puede ser usado en combinación con distintos kits multiplex de RT-qPCR con alta sensibilidad y especificidad.	138
I.6. Del laboratorio a la autorización de FlashPrep® para uso comercial.....	141
I.7. Ensayos de validación.....	142
I.8. Del laboratorio al análisis clínico	144
I.9. Ventajas de FlashPrep®	145
I.10. Conclusiones.....	146
I.11. Materiales y métodos.....	147
I.11.1 Recolección de muestras.....	147
I.11.2 Preparación de muestras por PK-HID.....	147
I.11.3 RT-qPCR	147
I.11.4 Análisis de datos.....	148
Bibliografía.....	151

Publicaciones y financiamiento

2023. Osés C., Francia M., **Veneri P.**, Vázquez Echegaray C., Guberman A., Levi V. The dynamical organization of the core pluripotency transcription factors responds to differentiation cues in early S-phase. *Front. Cell Dev. Biol.* Volume 11 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1125015>

2022. Romero, J.J., De Rossi, M.C., Osés, C., **Veneri P.**, Vázquez Echegaray C., Francia M., Guberman A., Levi V. Nucleus-cytoskeleton communication impacts on OCT4-chromatin interactions in embryonic stem cells. *BMC Biol* 20, 6 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01207-w>

2021. Osés, C., Stortz M., **Veneri P.**, Guberman A., Levi V. Pluripotency transcription factors at the focus: the phase separation paradigm in stem cells. *Biochem Soc Trans* 17 December 2021; 49 (6): 2871–2878. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20210856>

2021. Francia M., Stortz M., Vázquez Echegaray C., Osés C., **Veneri P.**, Petrone M.V., Toro A., Waisman A., Miriuka S., Cosentino M.S., Levi V., Guberman A. SUMO conjugation susceptibility of Akt/protein kinase B affects the expression of the pluripotency transcription factor Nanog in embryonic stem cells. *PlosOne* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254447>

2021. Genoud V.*, Stortz M.*, Waisman A., Bernardino B.G., **Veneri P.**, Dansey V., Salvatori M., Remes Lenicov F., Levi V. Extraction-free protocol combining proteinase K and heat inactivation for detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *PlosOne* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247792>. *Both authors contributed equally.

2020. **Veneri P.***, Vázquez Echegaray C.*, Osés C., Stortz M., Guberman A., Levi V. Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):5195.doi:10.1038/s41598-020-62235-0. *Both authors contributed equally.

2018. **Veneri P.**, Romero J.J., De Rossi M.C., Alvarez Y., Osés C., Guberman A, Levi V. Imaging transcription factors dynamics with advanced fluorescence microscopy methods. *Mechanisms of Development* 154 60–63. doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.003.

Financiamiento:

- CONICET
- ANPCyT
- Universidad de Buenos Aires

Abreviaturas

ACF	<i>Auto Correlation Function</i>
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CME	Células madre embrionarias
CMP	Células madre pluripotentes
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dox	Doxicilina
EB	Cuerpos embrioides
ECM	Matriz Extra Celular
FA	Adhesiones Focales
FI	Filamentos Intermedios
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>
HID	<i>Heat Inactivated Direct RT-PCR</i>
hiPSC	Células madre pluripotentes inducidas humanas
ICM	Macizo celular interno
IDRs	<i>Intrinsically disorder regions</i>
IF	Inmunofluorescencia
INBIRS	Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
NPC	Complejo del Poro Nuclear
LAD	<i>Lamin Associated Domain</i>
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
LINC	<i>Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton</i>
LLPS	Separación de fases líquido-líquido
PBST	PBS-Tween
pCF	<i>pair Correlation Function</i>
PFA	Paraformaldehído
PK	Proteínasa K
RNA	Ácido ribonucleico
RNA Pol II	RNA Polimerasa II
SE	<i>super-enhancer</i>
TAD	Dominios Asociados Topológicamente
TE	Trofoectodermo
TF	Factor de Transcripción

Capítulo 1: Células Madre

1.1 Introducción

Las células madre son protagonistas en todos los estadios de la vida, mediadores clave en el desarrollo embrionario y, posteriormente, en la restauración de células y tejidos y en la reproducción sexual, ya que de ellas deriva la línea germinal que da lugar a las gametas ¹⁻⁴. Aquellas células madre presentes en el embrión temprano dan origen a las tres capas germinales; endodermo, mesodermo y ectodermo, a partir de las cuales surgen todos los tejidos ⁴.

Las propiedades fundamentales que distinguen a las células madre de otros tipos celulares son su capacidad de autorrenovación, que les permite dividirse dando lugar a células hijas idénticas entre sí y a la que les dio origen; y su capacidad de diferenciarse, pudiendo generar múltiples tipos celulares especializados.

La utilización de células madre como modelo experimental es de suma utilidad para el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan el balance entre la pluripotencia y la diferenciación. En el campo de la medicina, son una excelente herramienta para la generación de modelos de enfermedades y la evaluación de nuevos fármacos ⁵⁻⁷ y, en el área de la medicina regenerativa, se analiza su promisorio potencial para el tratamiento de diferentes enfermedades. Específicamente, se espera que sean de utilidad para tratar enfermedades neurodegenerativas, diabetes y afecciones cardíacas, entre otras ⁸⁻¹⁰. Por estos motivos, comprender las bases moleculares que regulan la pluripotencia de las células madre es de sumo interés tanto para la ciencia básica como la aplicada, con actuales aplicaciones y gran potencial para el desarrollo de futuras terapias.

En este capítulo describiremos aspectos relevantes de células madre en general y de células madre embrionarias (CME) de ratón en particular ya que constituyen el sistema de estudio de esta tesis. Analizaremos también su relevancia y los principales mecanismos involucrados en la regulación de la pluripotencia.

1.2 Clasificación de células madre

Las células madre pueden ser clasificadas según su potencial de diferenciación ¹¹. El cigoto y los primeros blastómeros son células totipotentes, las únicas células madre capaces de dar lugar a un organismo completo al formar todos los tipos celulares del embrión y contribuir a la generación de los tejidos extraembrionarios.

A medida que avanza el desarrollo, disminuye el potencial de las células madre y la siguiente categoría en la clasificación consiste en las células madre pluripotentes, que pueden diferenciarse a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales y a la línea germinal. Estas células aisladas del resto del blastocisto no pueden generar un organismo completo en condiciones normales ³.

Las células madre pluripotentes pueden también ser clasificadas de acuerdo a su origen. Destacamos en particular a las células madre embrionarias, que provienen del macizo celular interno (ICM) del embrión, ya que serán objeto de estudio en esta tesis. Más adelante describiremos otros tipos de CMP como las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

Una vez finalizado el desarrollo, el individuo adulto presenta otros tipos de células madre con un potencial de diferenciación más restringido que el de las CMP. Estas células permiten la regeneración y el normal funcionamiento de los diferentes tejidos ² y pueden dar lugar a varios, algunos o pocos tipos celulares. Las células madre multipotentes se encuentran en muchos tejidos, están comprometidas con un linaje y pueden dar origen a un número limitado de tipos celulares. Las células oligopotentes también están restringidas a su linaje como las multipotentes, pero pueden dar origen a un menor número de tipos celulares. Por último, las unipotentes son células especializadas, con características específicas del tejido al que pertenecen y pueden dar origen a un único tipo celular ¹¹, por lo que se las denomina células precursoras de ese tipo celular específico, a diferencia de las células progenitoras, que pueden dar lugar a varios o algunos tipos celulares.

En conclusión, el potencial de diferenciación es un espectro continuo, partiendo desde las células madre totipotentes del embrión y terminando en sus representantes con menor potencial, las células multipotentes, oligopotentes y unipotentes de diferentes tejidos del organismo adulto ⁴. A medida que transcurre el desarrollo, el potencial de diferenciación va disminuyendo; las células madre se diferencian y se van comprometiendo a destinos celulares específicos (Figura 1.1).

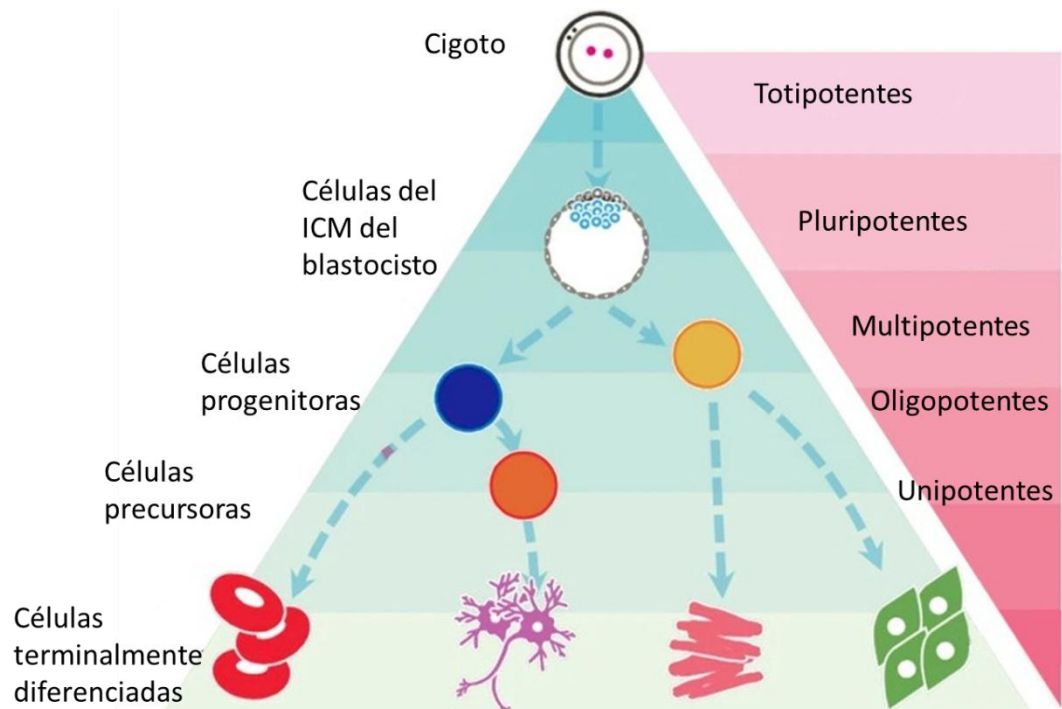


Figura 1.1. Clasificación de las células madre según su potencial de diferenciación. Se muestran diferentes tipos de células madre y su potencial y células terminalmente diferenciadas. Adaptado de ¹².

1.3 Células madre en el contexto del desarrollo embrionario

La proliferación de los distintos tipos celulares, entre ellos, de diferentes tipos de células madre, permite el crecimiento del embrión que lo lleva a convertirse en un organismo adulto.

Alrededor de los 3 días luego de la fecundación y la formación del cigoto, el embrión de ratón forma una estructura denominada “blastocisto temprano”, donde se encuentran las células del ICM y las de la capa externa, el trofoectodermo ¹³, como muestra la Figura 1.2. El primer evento de diferenciación que ocurre en el desarrollo es el que da lugar al ICM o al trofoectodermo, siendo estos destinos mutuamente excluyentes ¹⁴. Este primer evento constituye un punto de inflexión que define si una célula permanece pluripotente o se diferencia ¹⁵; la evidencia sugiere que las interacciones celulares y la comunicación intercelular son claves en esta definición, asegurando la correcta especificación hacia los primeros linajes ¹⁵.

Muchos antecedentes destacan además que ciertas propiedades del entorno cumplen un rol fundamental en la regulación de los eventos de diferenciación y desarrollo. Destacamos en particular las señales mecánicas, tanto provenientes del exterior como aquellas involucradas en la comunicación entre células del embrión ¹⁶; estas señales se han emulado en células en

cultivo, demostrando, por ejemplo, que la elasticidad del sustrato modula la diferenciación hacia distintos linajes ¹⁷, como discutiremos más adelante (Capítulo 3).

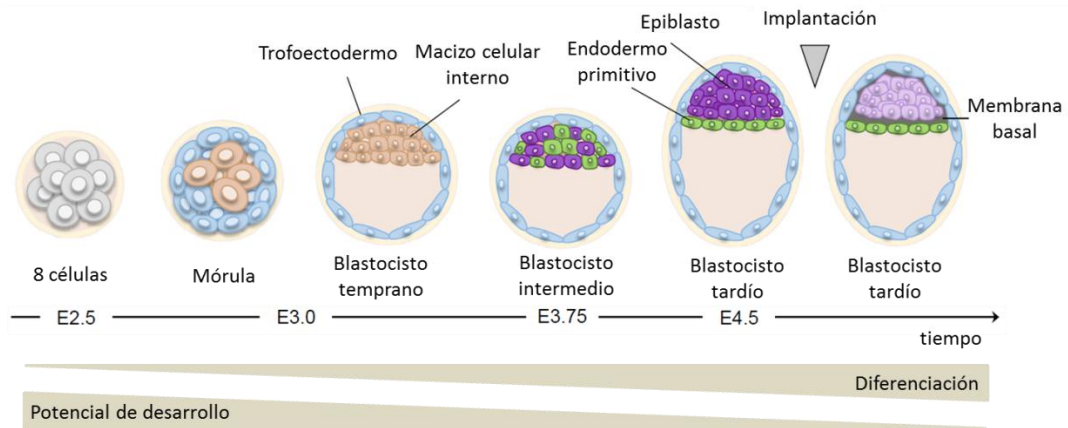


Figura 1.2. Etapas del desarrollo embrionario de ratón. Se muestran embriones de 8 células, mórula y blastocisto temprano, intermedio y tardío. Se destacan las células del trofoectodermo (celeste) y las del macizo celular interno (ICM, marrón) presentes en el blastocisto temprano. Luego del día E3.5, surgen dos capas del ICM; el endodermo primitivo o hipoblasto (verde) y el epiblasto (violeta). Después del día 4.5, ocurre la implantación del embrión donde las células del epiblasto comienzan a especificarse (lila) y se forma la membrana basal. Adaptado de ¹⁸.

Alrededor del día 3.5 del desarrollo, una de las capas que surge del ICM, el epiblasto pre-implantatorio, está formado por una población de células relativamente homogéneas. Este estado se denomina “*naïve*”, ya que las células poseen la capacidad de convertirse en cualquier linaje y aún no están comprometidas a algún destino celular específico ^{19,20}. Posteriormente ocurre la implantación y, a partir de este momento, se considera que las células del epiblasto se encuentran en un estadio “*primed*” ya que han comenzado a especificarse a diversos linajes, generando una mayor heterogeneidad entre ellas (Figura 1.2) ²¹. Si bien las células de estos dos estadios (*naïve* y *primed*) son pluripotentes, presentan diferencias relevantes tales como los niveles de expresión de algunos factores de transcripción (TFs) claves para la pluripotencia (Sección 1.5), las marcas epigenéticas y el perfil de unión de los TFs en el genoma a nivel global, definiendo distintos patrones de expresión génica ²². La transición de un estado a otro (*naïve* a *primed*) representa un continuo de configuraciones y no estadios discretos ²³.

El objeto de estudio de nuestro trabajo son las CME, que son un tipo de CMP que deriva del ICM de ratón. Las CME se obtienen a partir del ICM del blastocisto (Figura 1.3) y se utilizan desde hace más de 4 décadas como referencia para estudiar el desarrollo embrionario de mamíferos ^{24,25} y, en particular, los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación ²⁶.

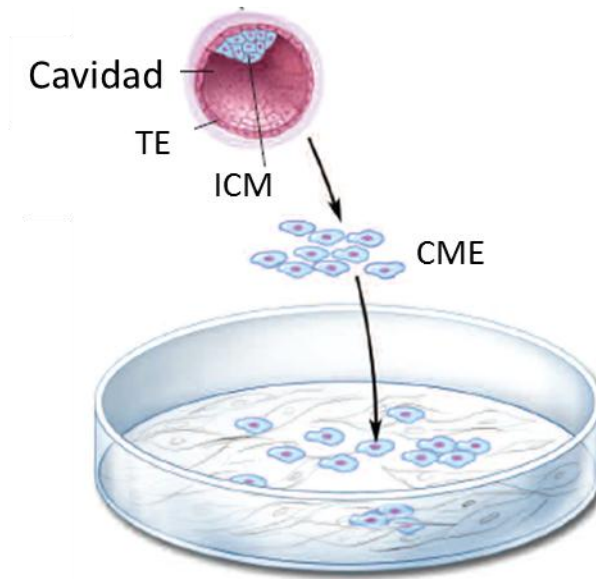


Figura 1.3. Esquema representativo de la obtención de CME. Obtención de CME partir del ICM de un blastocisto de ratón, se señala también el TE y la cavidad del embrión. Adaptado de ²⁷.

Si bien hay ciertas diferencias entre las CME humanas y de ratón, este último sistema es relativamente más sencillo, su mantenimiento en cultivo celular y diferenciación es de menor costo y, aunque algunas vías de señalización son diferentes entre estas especies, los mecanismos involucrados en la regulación génica por los TFs de pluripotencia se encuentran altamente conservados ²⁸.

Es importante destacar que las CME de ambas especies comparten el perfil transcriptómico general ²⁹, tienen perfiles similares de expresión de genes marcadores de pluripotencia, y de diferenciación a linajes de las tres capas germinales ³⁰. En este sentido, un *preprint* reciente ³¹ compara regiones regulatorias y motivos de unión de TFs entre ratón, humano y cerdo, y sugiere que hay una gran conservación en aquellos *super-enhancers* (SE) asociados a genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia entre las tres especies.

1.4 Células madre en el contexto de la medicina

El interés en las células madre se intensificó en las últimas décadas dado su potencial de generar, en el contexto adecuado, tipos especializados de células. Así, comprender los mecanismos moleculares que gobiernan el destino celular se ha convertido en un campo de interés no sólo para el estudio del desarrollo embrionario ³² sino para la medicina regenerativa ^{10,33,34}. Para el tratamiento de pacientes con diversas enfermedades se está evaluando el potencial terapéutico de diferentes tipos de células madre ^{35,36} entre las que se encuentran

células pluripotentes ¹⁰, como veremos a continuación; multipotentes, provenientes de diferentes fuentes ^{37,38} y sus derivados para terapias libres de células, particularmente, exosomas provenientes de células mesenquimales ³⁹. En este capítulo analizamos con más detalle el uso de las CME, ya que fueron el objeto de estudio de esta tesis.

La potencial aplicación de células pluripotentes a la medicina humana inició un debate bioético, ya que la obtención de CME involucra la destrucción del embrión del que provienen ^{40,41}. Por otra parte, los embriones serían una fuente muy limitada para la obtención de estas células y su uso también conlleva riesgos, ya que los tratamientos con células derivadas de éstas provocarían un rechazo inmunológico ^{40,41}. Estos obstáculos motivaron la búsqueda de otras fuentes de células madre pluripotentes.

Esta búsqueda continuó hasta el año 2006 cuando Shinya Yamanaka describió el primer protocolo *in vitro* para obtener CMP a partir de células diferenciadas. La generación de estas células, denominadas CMP inducidas (iPSCs) ⁴², revolucionó el campo de las células madre a tal punto que le valió el Premio Nobel a Yamanaka en 2012. En 2007, tan solo un año después de su descubrimiento, el grupo de Yamanaka obtuvo las primeras iPSCs humanas ⁴³ (Figura 1.4). Actualmente, este tipo de células puede obtenerse mediante la reprogramación de células somáticas humanas y de múltiples especies ⁴⁴⁻⁴⁶.

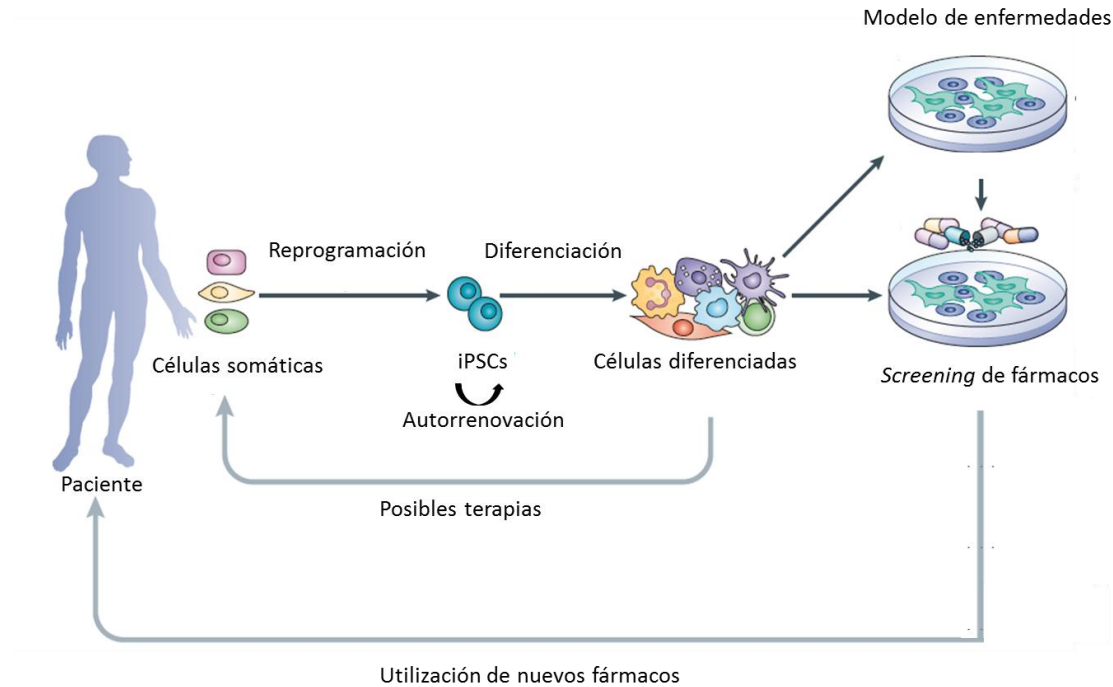


Figura 1.4. Esquema representativo de la obtención de iPSCs humanas. Obtención de células somáticas a partir de una biopsia; las células se reprograman para la obtención de iPSCs y posteriormente, se pueden propagar indefinidamente o diferenciar hacia linajes de interés. Una vez diferenciadas, las células pueden generar modelos de enfermedades y se espera que puedan ser utilizadas para posibles terapias y el *screening* de fármacos. Adaptado de ⁴⁷.

Al igual que las CME, las iPSCs pueden autorrenovarse indefinidamente y diferenciarse a cualquier tipo celular derivado de las tres capas embrionarias y a la línea germinal, exhibiendo la misma morfología, propiedades de crecimiento y genes marcadores de CMP ⁴². Así, una vez obtenidas, las iPSCs pueden dividirse generando un número ilimitado de células e inducirse su diferenciación hacia linajes de interés utilizando protocolos específicos.

De esta manera se soluciona el problema ético de la obtención de CMP y a su vez, se aborda el problema del rechazo inmunológico con la posibilidad de generar células diferenciadas a partir de iPSC de cada paciente. Como mencionaremos más adelante, esto último es poco factible en el corto-mediano plazo, sin embargo, se está trabajando en la creación de bancos de iPSC que puedan tener representada a la población. Las iPSCs de estos bancos, generadas a partir de personas con diferentes afecciones y diferentes *backgrounds* genéticos, pueden ser sometidas a protocolos de diferenciación específicos y así generar tanto modelos de enfermedades para su estudio, como células y tejidos para ser utilizados en el futuro en terapias de medicina regenerativa ⁴⁸, como mencionamos previamente.

La generación de iPSCs, que en sí constituye un tipo particular de reprogramación celular, se realiza mediante la expresión ectópica de ciertos factores de transcripción de pluripotencia, originalmente Oct4, Sox2, c-myc y Klf4, denominados los “TFs de Yamanaka” ⁴². Esto pone en evidencia que la expresión de dichos TFs no sólo tiene un rol muy importante en el mantenimiento de la pluripotencia de CME, sino que su expresión ectópica puede inducir cambios drásticos en la identidad celular en múltiples contextos.

Desde la generación de las iPSCs humanas, muchos grupos han estado estudiando la posibilidad de su uso en distintas áreas de la medicina. La Figura 1.5 sintetiza distintos ensayos clínicos donde se utilizan células diferenciadas obtenidas a partir de iPSCs o de CME ¹⁰.

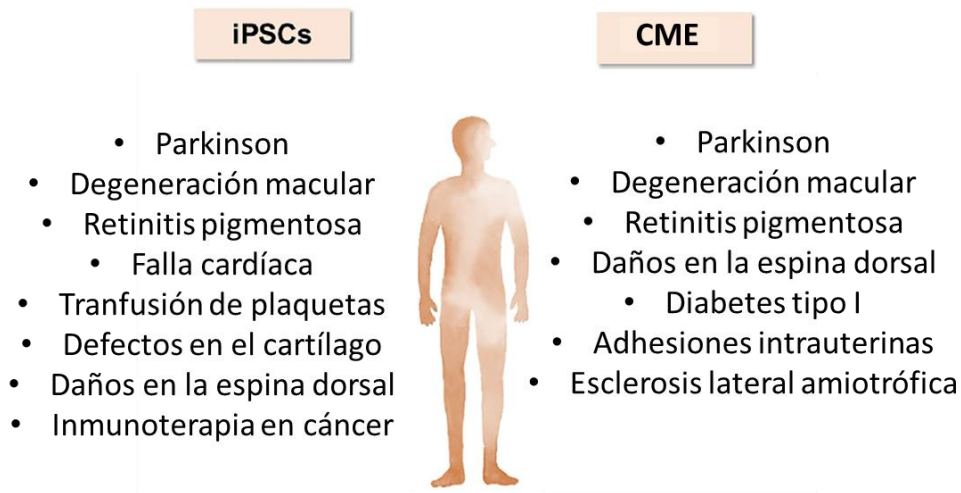


Figura 1.5. Afecciones para las cuales hay ensayos clínicos en curso donde se usan células derivadas de iPSCs (izquierda) o CME (derecha). Adaptado de ¹⁰.

Específicamente, a partir de iPSCs humanas podrían generarse múltiples tipos celulares de interés terapéutico como hepatocitos, células β , células tiroideas, organoides intestinales o gástricos y células epiteliales de las vías aéreas, que luego podrían ser utilizados en el modelado de enfermedades y en terapias celulares ⁴⁹. Los tejidos y modelos de enfermedades tienen un enorme potencial para la identificación de nuevos blancos terapéuticos y para *screening* de fármacos; por ejemplo, se están utilizando para evaluar hepatotoxicidad y tratamientos para diabetes, fibrosis quística e hipercolesterolemia familiar, entre otras patologías ⁴⁹.

A pesar de las ventajas que presenta el uso de las iPSCs y su enorme potencial, también hay importantes limitaciones. Por ejemplo, generar iPSCs para cada paciente tiene, hasta el día de hoy, un costo elevado y su generación en cultivo lleva mucho tiempo ⁵⁰. En sus orígenes, la eficiencia en la obtención de iPSCs era muy baja ⁴² y si bien en los últimos años pudo mejorarse ampliamente por la introducción de nuevas tecnologías ⁵¹, aún se sigue evaluando si los métodos utilizados son compatibles con la posterior aplicación médica de las iPSCs. Otros

motivos de preocupación son las mutaciones que pueden acumular las iPSCs y las células a partir de las que éstas se generen, por lo que aún se requieren más estudios para su validación ⁵⁰.

Por otra parte, los protocolos de diferenciación tienen aún ciertas limitaciones en la recreación de señales similares a las que reciben las CMP en organismos vivos. Este problema se ha resuelto parcialmente con la generación y cultivo de organoides tridimensionales, que son estructuras derivadas de CMP utilizadas como modelos de órganos simplificados ⁵², pero los protocolos para cultivarlos son complejos, consumen más tiempo y suelen ser menos funcionales ⁵³.

Otros desafíos que presenta el uso de iPSCs son la posible tumorigenicidad en caso de que queden células indiferenciadas entre las células a utilizar en la terapia y, por otra parte, cierto grado de rechazo inmunológico, aunque sean células compatibles. Además, las iPSCs presentan heterogeneidad en los niveles de expresión génica y en las marcas epigenéticas. En este sentido, una gran preocupación respecto a las iPSCs es la integridad y el alto grado de hipometilación de su genoma ¹⁰.

En síntesis, dada la complejidad del modelo, sus ventajas y desventajas, es crucial la comprensión de los mecanismos moleculares fundamentales involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación de las células madre para poder aprovechar al máximo el potencial de las CMP y desarrollar nuevas terapias que podrían servir para el tratamiento de un gran número de patologías.

1.5 Factores de transcripción de pluripotencia

La preservación de la pluripotencia se debe principalmente a la acción coordinada de tres TFs centrales, OCT4 (también conocido como POU5F1), SOX2 y NANOG, denominados en conjunto “el core de pluripotencia”, que inducen la expresión de genes esenciales para la autorrenovación y la pluripotencia y reprimen aquellos que promueven la diferenciación hacia distintos linajes ^{54,55}. La expresión de estos TFs ocurre muy temprano en el desarrollo, comenzando en el estadio de 8 células para luego restringirse a las células del ICM ⁵⁶. Asimismo, estos TFs se expresan en CMP en estado indiferenciado, son esenciales para el mantenimiento de la pluripotencia, y su expresión disminuye durante la diferenciación, con diferente cinética para cada uno de ellos, como veremos más adelante ⁵⁷.

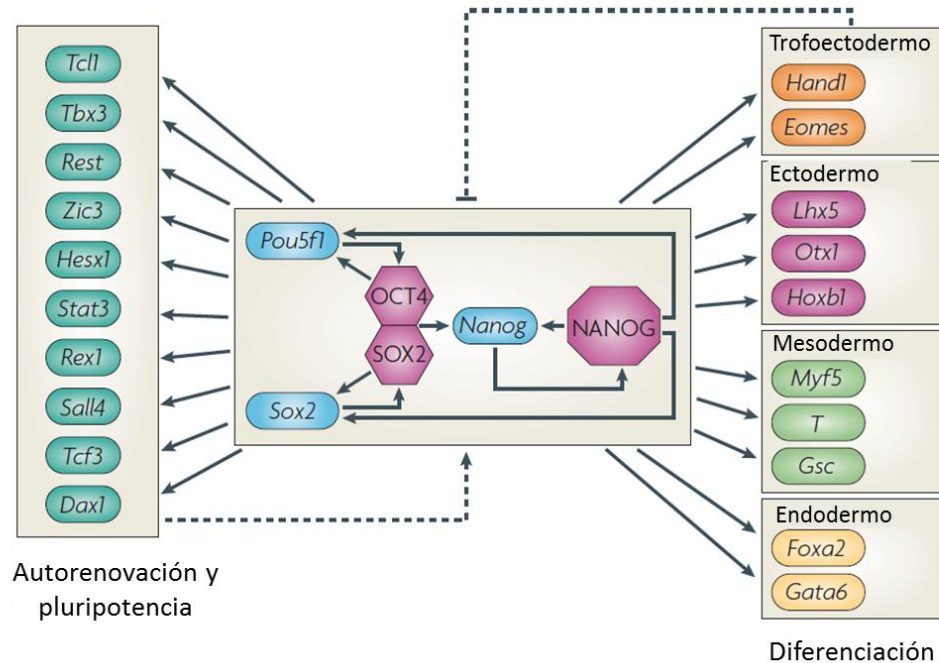


Figura 1.6. Esquema representativo de la actividad de OCT4, SOX2 y NANOG. Estos TFs inducen su propia expresión mediante un *loop* autorregulatorio y la expresión de otros genes requeridos para el mantenimiento de la pluripotencia. Además, reprimen genes que promueven la diferenciación hacia distintos linajes. Los óvalos representan genes y los hexágonos proteínas. Adaptado de ²⁸.

En conjunto, estos TFs co-ocupan múltiples sitios de unión en regiones regulatorias de una gran cantidad de genes blanco ²⁸, actúan cooperativamente y de manera sinérgica, e interactúan con otros TFs y co-reguladores, formando así una compleja red interconectada que orquesta la expresión génica ⁵⁸.

Particularmente OCT4 y SOX2 forman heterodímeros uniéndose juntos a la mayoría de sus genes blanco ^{59,60}, aunque también pueden formar homodímeros y heterodímeros con otros TFs ⁶¹⁻⁶⁴. Es interesante destacar que OCT4 es fundamental tanto para el mantenimiento de la pluripotencia *naïve* como para salir de ella ^{65,66}, lo que sugiere un rol de este TF dependiente del contexto, por ejemplo, con qué TFs interactúe y en qué regiones del genoma se una ⁶⁷.

Entre otras de sus funciones, estos TFs (OCT4 y SOX2) tienen actividad de pioneros ya que pueden modificar la accesibilidad de la cromatina ⁶⁸⁻⁷¹, hecho fundamental para el cambio de programas de expresión génica tanto en la diferenciación como en la reprogramación. Esta función se ha reportado para NANOG en otros sistemas biológicos ⁷² y, dado que colocaliza con remodeladores de la cromatina en CME ⁷³, es factible especular que este TF central para la pluripotencia también esté implicado en la remodelación de la cromatina.

Los niveles de expresión de estos TFs y sus niveles relativos regulan finamente la definición de la identidad celular y varían durante la diferenciación. Como veremos más adelante (Sección 1.6) NANOG es el primero de estos TFs cuya expresión se inhibe, mientras que OCT4 y SOX2 continúan expresándose a tiempos más largos ⁵⁷. En este trabajo, nos focalizaremos principalmente en OCT4 y SOX2 por motivos que describiremos más adelante; sin embargo, destacamos que NANOG también cumple un rol clave en la definición de la identidad celular ⁷⁴.

Los niveles de OCT4 y SOX2 presentan cierto grado de heterogeneidad en CMP, aún en estado de pluripotencia *naïve* ^{75,76}. Esta característica es muy relevante ya que las fluctuaciones en los niveles endógenos de estos TFs afectan el destino celular ante las mismas señales de diferenciación; niveles elevados de SOX2 aumentan levemente el compromiso celular hacia neuroectodermo y disminuyen el compromiso hacia mesendodermo, mientras que niveles elevados de OCT4 dirigen a las células hacia destinos de neuroectodermo y mesendodermo ⁷⁵. Esta heterogeneidad dinámica en los niveles de expresión de estos TFs de pluripotencia, las hace más o menos propensas a definirse hacia un destino celular particular ^{77,78}. Es relevante mencionar que, en CME humanas, se demostró que estos niveles se heredan a la célula hija luego de la división celular, determinando que células hermanas adquieran el mismo destino ante una señal de diferenciación ⁷⁹.

1.6 Regulación de la pluripotencia y su mantenimiento en cultivo celular

Es posible recapitular *in vitro* las propiedades del embrión pre-implantatorio bajo determinadas condiciones de cultivo de CME utilizando señales moleculares que simulan aquellas que reciben las células en el contexto del embrión. En este sentido, las CME pueden mantenerse en estado indiferenciado *naïve*, proliferando por largos periodos de tiempo (en teoría, indefinido) por su capacidad de autorrenovación ilimitada ^{18,80}.

Con este fin, las CME deben ser cultivadas sobre superficies recubiertas con gelatina ⁸¹ complementando el medio de propagación con LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) ⁸², suero fetal bovino (SFB) e inhibidores farmacológicos de la quinasa GSK3 y MEK denominados en conjunto “2i”. LIF inhibe la actividad de la quinasa GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*), enzima que reprime la expresión de TFs como NANOG y c-Myc, necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia ⁸³. El SFB, comúnmente usado en el cultivo de la mayoría de los tipos celulares, contiene distintas moléculas que promueven la proliferación y, particularmente en el caso de CMP, contribuyen a la inhibición de la diferenciación, entre ellos el factor BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*) que inhibe la vía de señalización de ERK, involucrada en la diferenciación ^{84,85}. Por último, la utilización de “2i” da como resultado un contexto de señalización que favorece la homogeneidad de la expresión génica en la población ⁸⁶⁻⁸⁸.

En este medio de cultivo, las CME de ratón se encuentran en un estado *naïve* que recapitula las propiedades del embrión pre-implantatorio ⁸⁹. Si estas moléculas (LIF y 2i) son removidas del medio de propagación, se induce la salida del estado pluripotente *naïve*. Al comienzo de esta salida, los niveles de expresión de OCT4 y SOX2 se mantienen constantes durante las primeras 48 horas aproximadamente, mientras que los niveles de NANOG, decaen rápidamente, ya en las primeras 9-12 horas ⁵⁷. En este sentido, se ha denominado a NANOG como TF de pluripotencia *naïve*, mientras que OCT4 y SOX2 son considerados TFs de pluripotencia generales. A medida que transcurre el tiempo en condiciones de diferenciación, las células son cada vez más susceptibles a diferenciarse ⁵⁷.

Es importante destacar que la eliminación de LIF y 2i del medio de cultivo se utiliza de rutina como un protocolo de diferenciación no dirigido. El mantenimiento de las células en estas condiciones por un tiempo prolongado (>7 días) ^{90,91} determina que las células se diferencien dando lugar a una población heterogénea.

Capítulo 2: Organización del núcleo celular y el paradigma de condensados líquidos

2.1 Introducción

El núcleo celular preserva el material genético esencial para la vida y provee el entorno necesario para la transcripción, preservación y replicación del genoma ⁹². Es la organela de mayor tamaño y rigidez de las células eucariotas y se encuentra separado del citoplasma por una envoltura ^{93,94} con poros que permiten un intercambio selectivo de moléculas ⁹⁵ que contribuye a regular los procesos biológicos que ocurren en su interior.

Una propiedad relevante del núcleo es la de estar superpoblado por una diversidad de biomoléculas cuya distribución no es al azar ^{93,94}, como discutiremos más adelante. En este sentido, el núcleo celular contiene compartimentos con composición y funciones específicas ⁹⁶ pero que, notoriamente, no se encuentran separadas del entorno por membranas biológicas ⁹⁷. Esta organización interna facilita una eficiente coordinación de vías de señalización y procesos nucleares ⁹⁸.

En este capítulo, describiremos brevemente la organización de la cromatina, los mecanismos propuestos para la formación de compartimentos nucleares, enfocándonos en los llamados “condensados transcripcionales” y su rol en la modulación de la transcripción; por último, ahondaremos en la relación entre estos condensados y la pluripotencia de CME.

2.2 La organización funcional de la cromatina

Dentro del núcleo de las células eucariotas, el DNA se encuentra interactuando con numerosas biomoléculas formando la cromatina. Este biopolímero complejo se encuentra altamente compactado y con distintas jerarquías de organización, como veremos más adelante (Figura 2.1). La arquitectura de la cromatina es versátil, ya que responde a determinados estímulos definiendo cambios en la accesibilidad al DNA y modulando, en consecuencia, procesos como la replicación, transcripción, la reparación del DNA y la segregación de cromosomas ⁹⁹.

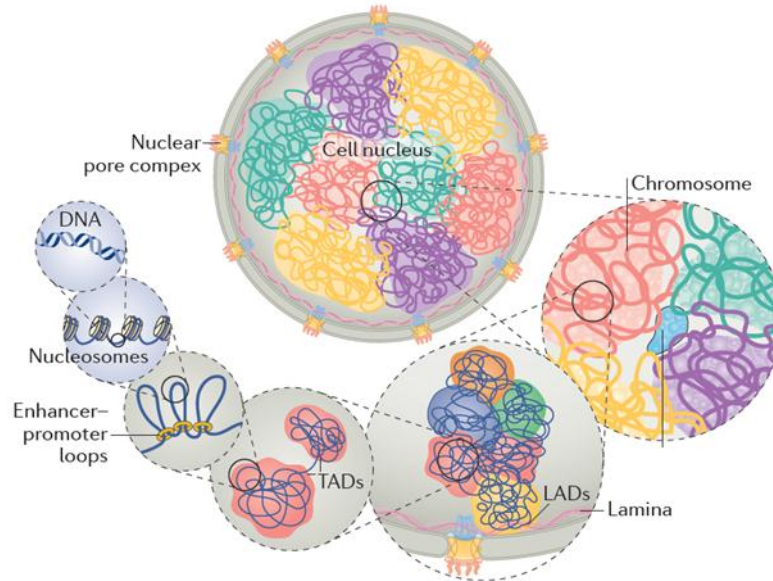


Figura 2.1 La organización funcional del genoma. El DNA se empaqueta formando nucleosomas, las fibras de cromatina resultantes se enrollan y forman bucles, por ejemplo, mediante la interacción de secuencias regulatorias como *enhancers* y promotores. Estas fibras se condensan formando TADs (*Topologically Associating Domains*) que, a su vez, se organizan en compartimentos de transcripción activa o inactiva (por ejemplo, heterocromatina). Algunas regiones de heterocromatina interactúan con la lámina nuclear formando LADs (*Lamin Associated Domains*). Adaptado de ¹⁰⁰.

La estructura fundamental de la cromatina consiste en la cadena de DNA empaquetada con proteínas conformando los nucleosomas, compuestos por un octámero de histonas (dos de cada una) mayoritariamente de las variantes H2A, H2B, H3 y H4, rodeadas por 147 pares de bases de DNA ^{101,102}. Cada una de estas proteínas posee una “cola” N-terminal susceptible de experimentar modificaciones postraduccionales, las cuales modulan la accesibilidad al DNA a través de diferentes mecanismos ^{103,104}, algunos de los cuales mencionaremos más adelante.

A su vez, la fibra cromatínica se asocia con otras proteínas y se organiza formando bucles o *loops*, como consecuencia, algunas regiones del DNA quedan físicamente próximas aunque las separen miles de pares de bases en su cadena ^{100,105–107}. Estas fibras se condensan en subcompartimentos llamados *Topologically Associating Domains* (TADs), los cuales se caracterizan por tener una alta tasa de interacción dentro de sí mismos y poca interacción con otros TADs, restringiendo las interacciones de elementos regulatorios a los genes dentro del dominio ¹⁰⁷. En la formación de TADs se involucran interacciones entre proteínas como CTCF, TFs y complejos de cohesinas ^{100,108,109}.

Por otra parte, se observan regiones de cromatina silenciada y de mayor grado de compactación asociada a la lámina nuclear; estos *Lamin Associated Domains* (LADs) contribuyen

a la organización funcional de la cromatina en el núcleo celular y poseen un rol relevante en la regulación de la expresión génica ^{110,111}, como discutiremos en el siguiente Capítulo.

En el grado de plegamiento de mayor orden se encuentran los cromosomas que se distribuyen en el interior del núcleo formando “territorios cromosómicos” en células en interfase ^{107,112,113}. Cada cromosoma ocupa un lugar distinto y su posicionamiento dentro del núcleo correlaciona con su tamaño, densidad génica y actividad transcripcional; los cromosomas de mayor tamaño y con pocos genes suelen estar ubicados en la periferia nuclear, mientras que aquellos más pequeños y con mayor densidad de genes están ubicados en el interior ¹⁰⁰; esta segregación promueve una distribución asimétrica de los genes según su actividad; los genes silenciados se encuentran frecuentemente en la periferia nuclear mientras que los activos se encuentren usualmente en el interior ¹³. Como resultado, en esta arquitectura tridimensional los cromosomas con niveles de expresión génica similares suelen estar más próximos físicamente entre sí que con cromosomas con distinta actividad génica ¹⁰⁰. Esta distribución asimétrica de territorios cromosómicos provoca una compartimentalización del genoma en grandes regiones de transcripción activa y silenciada ¹⁰⁷.

La organización, el plegamiento y grado de compactación local de la cromatina influyen sensiblemente en su función; dentro de estas estructuras destacamos a los *loops*, que favorecen la interacción entre elementos regulatorios y genes blanco para modular su transcripción ¹⁰⁷ y a los TADs, descritos previamente. Estos últimos favorecen la transcripción mediante la interacción de elementos regulatorios en *cis* con sus genes blanco dentro de un mismo TAD, y la reprimen, mediante la exclusión de interacciones entre secuencias regulatorias como *enhancers* y sus genes blanco entre diferentes TADs ¹⁰⁸.

2.2.1 La accesibilidad de la cromatina

La fibra cromatínica puede presentar variaciones locales en su grado de compactación definiendo un continuo de estados con distinta accesibilidad ¹¹⁴ que determina, en última instancia, la unión de TFs y de la maquinaria transcripcional, impactando en la expresión génica ¹¹⁵. La accesibilidad es una propiedad altamente dinámica y su modulación cumple un rol muy importante en diversos procesos celulares, entre ellos, establecer y mantener la identidad celular ¹¹⁵.

La accesibilidad local de la cromatina y, en consecuencia, sus interacciones con la maquinaria transcripcional se encuentra también reguladas por una amplia variedad de modificaciones postraduccionales que experimentan las histonas ¹¹⁴. Este grupo de reacciones covalentes ocurren en aminoácidos específicos de ciertas histonas y su efecto es diferente según la naturaleza de la modificación. Éstas influyen en la estructura local de la cromatina afectando las interacciones entre histonas o histonas-DNA. Dentro de este grupo de reacciones

mencionamos la acetilación y la metilación como las marcas epigenéticas más frecuentes y la fosforilación, glucosilación, ubiquitinación y SUMOilación como las más infrecuentes ¹¹⁶.

En conjunto, estas modificaciones constituyen un “código” de marcas reversibles que modulan la interacción de la cromatina con diversas proteínas, incluyendo aquellas que inducen su remodelado y la edición de las marcas de histonas ¹¹⁶. Los remodeladores de la cromatina son proteínas capaces de deslizarse a los nucleosomas sobre el DNA, mediar las modificaciones postraduccionales de las histonas e incluso intercambiar histonas canónicas por variantes de histonas con diferentes propiedades ¹¹⁷. Según la histona, el aminoácido modificado y el tipo de modificación, el resultado puede ser un ambiente represivo o favorable para la expresión génica (Figura 2.2).

Las acetilaciones de histonas reducen la condensación de la cromatina mediante la neutralización de la carga positiva de los residuos de lisina de la cola de las histonas, lo que provoca que las interacciones DNA-histona sean más débiles. En contraste con las acetilaciones, las metilaciones de las histonas no involucran cambios de las cargas sino que favorecen la interacción con proteínas asociadas a la cromatina que contienen dominios específicos de unión. Según el residuo (qué lisina y qué arginina) y el grado de metilación (mono, di o tri-metilación), las marcas tienen efectos represivos o activadores de la transcripción mediante la interacción con diferentes complejos remodeladores; por ejemplo, Polycomb ¹¹⁶.

En conjunto, los mecanismos epigenéticos -que incluyen las modificaciones post traduccionales de las histonas, la metilación del DNA, el remodelado de la cromatina y RNAs no codificantes ^{101,118}- pueden regular finamente la activación o el silenciamiento de genes mediante la modulación de interacciones intermoleculares entre el DNA y proteínas asociadas a la transcripción ¹¹⁹.

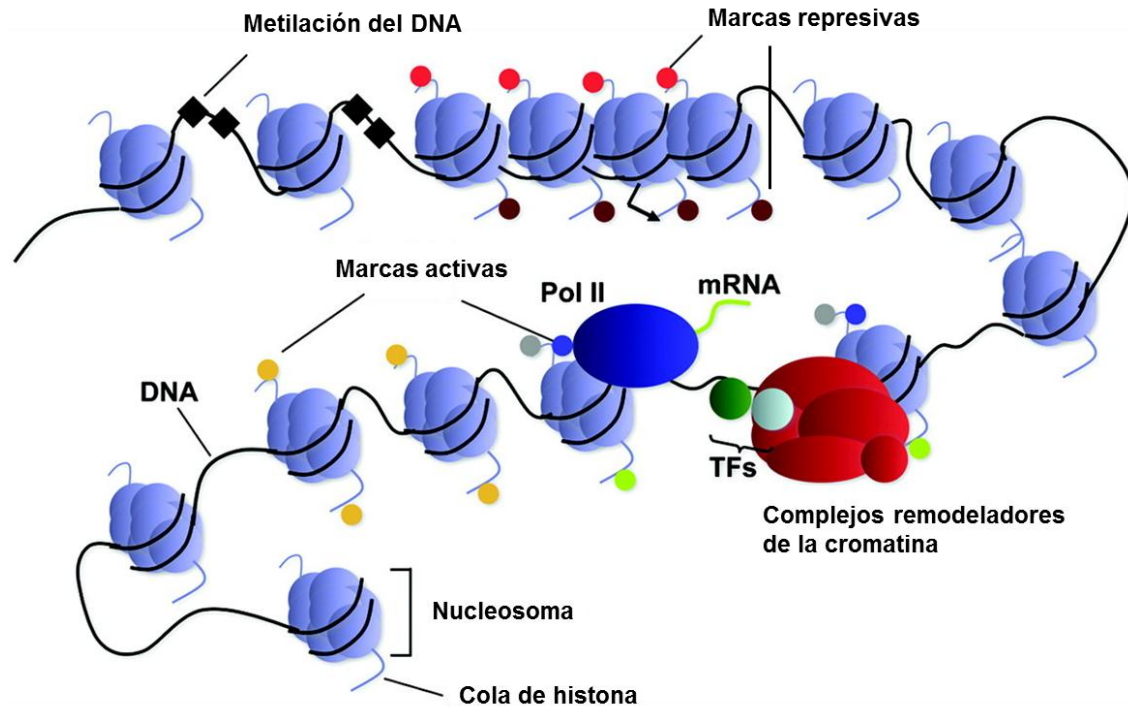


Figura 2.2. Relación entre marcas epigenéticas, accesibilidad a la cromatina y transcripción. Se muestra al DNA (línea negra) enrollado alrededor del octámero de histonas (celestes) formando nucleosomas, la cola de las histonas (líneas celestes) sufren modificaciones postraduccionales (marcas) con efectos represivos (círculos rojos y marrones, por ejemplo H3K27me3) o activadores (círculos amarillos, azules, verdes y grises, por ejemplo H3K9ac) de la transcripción. También se muestra la metilación del DNA (cuadrados negros), la RNA Pol II (azul), TFs (verde) y complejos remodeladores de la cromatina (rojo). Adaptado de ¹²⁰.

Además de los remodeladores, los TFs pioneros (ya mencionados en la Sección 1.5) pueden inducir modificaciones locales en la estructura de la cromatina (Figura 2.3), por ejemplo por reclutar modificadores de la cromatina ¹²¹, modulando la expresión génica ^{122,123}. En el contexto de este trabajo de tesis, es relevante mencionar que se ha reportado que los TFs de pluripotencia, OCT4 y SOX2 tienen actividad como TFs pioneros ¹²⁴⁻¹²⁶.

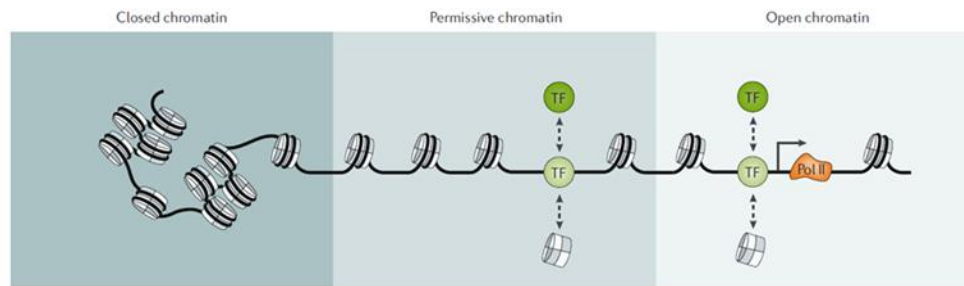


Figura 2.3 Actividad de TF pioneros. En contraste a la cromatina cerrada, la cromatina permisiva es lo suficientemente dinámica para que los TFs pioneros inicien su remodelación y establezcan una conformación más abierta. Adaptado de ¹¹⁵.

2.2.2 La accesibilidad de la cromatina y la pluripotencia.

Se ha propuesto que existe una correlación entre la pluripotencia y la distribución espacial, el tamaño y la compactación de parches de nucleosomas en la cromatina. Por ejemplo, las CME cultivadas en condiciones que recapitulan al embrión pre-implantatorio, muestran regiones de baja densidad de nucleosomas en comparación con células somáticas ¹²⁷.

Por otro lado, la diferenciación de CME incluye una reorganización de la cromatina en la cual genes relacionados con la pluripotencia posicionados en el interior del núcleo comienzan a interactuar con la lámina, mientras que otras regiones conteniendo aquellos genes relacionados con la diferenciación hacia ciertos linajes se disocian de la lámina y relocalizan hacia el interior ¹²⁸.

2.3 Condensados nucleares

Hemos mencionado previamente que el núcleo celular contiene numerosos compartimentos que difieren en su composición y función, y carecen de membranas que los separen del nucleoplasma ^{129,130}. A modo de ejemplo, la Figura 2.4 muestra la distribución no homogénea de ciertas proteínas nucleares, las cuales se concentran en dominios específicos.

A pesar de la gran relevancia funcional de la compartimentalización del núcleo celular, el mecanismo molecular involucrado en la formación de estas estructuras internas permaneció desconocido hasta la actualidad ¹³¹.

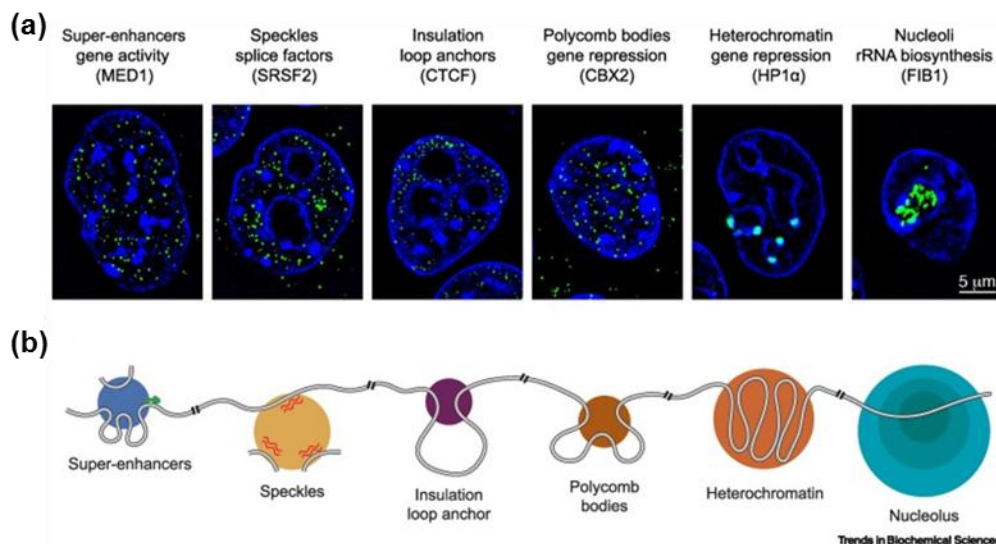


Figura 2.4. Cuerpos o dominios nucleares. Imágenes de inmunofluorescencia en CME de ratón, se observa la cromatina marcada con Hoeschst (azul) y las proteínas en estudio (verde). Los dominios están indicados según su nombre (p. ej., *super-enhancers*) **(a)**. Esquema representativo de distintos dominios organizados en distintas estructuras de la cromatina. La línea gris representa la fibra cromatínica, y las líneas rojas, RNA **(b)**. Adaptado de ¹³².

En la última década, se produjo un cambio de paradigma en el área a partir de los trabajos de Brangwynne *et al* ¹³³ y Feric *et al* ¹³⁴ quienes propusieron que los compartimientos celulares sin membrana podrían formarse por un proceso de separación de fases líquido-líquido (LLPS). Si consideramos una solución de macromoléculas y, por ejemplo, aumentamos su concentración relativa, las interacciones entre las mismas pueden verse favorecidas termodinámicamente frente a aquellas macromolécula-solvente; en consecuencia, se forman dos fases líquidas separadas con distintas concentraciones relativas de macromoléculas ¹³⁵. En el caso del nucleoplasma, se propone que interacciones débiles entre proteínas y/o con ácidos nucleicos desencadenarían el proceso de LLPS ¹³⁵.

La Figura 2.5 muestra un esquema simplificado de un diagrama de equilibrio líquido-líquido, en donde tanto las condiciones locales, como pH, temperatura y concentración de sales, junto a la concentración de biomoléculas, modulan la transición de una fase homogénea a dos fases ¹³⁶.

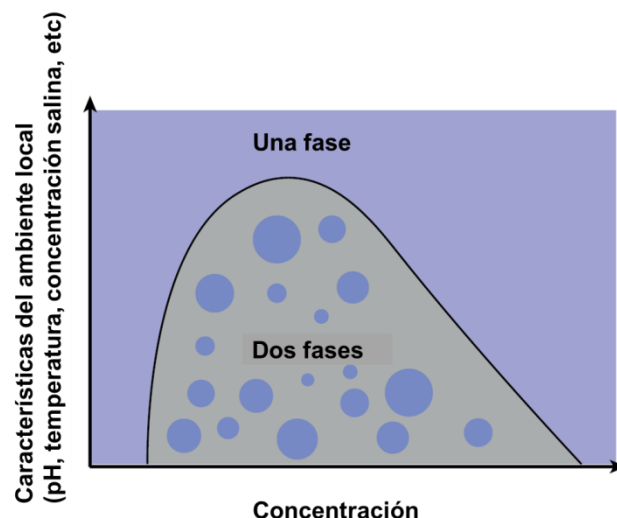


Figura 2.5. Esquema de un diagrama de fases líquido-líquido. Un sistema puede presentar una fase homogénea (violeta) o dos fases (área bajo la curva, gris y violeta) según ciertas propiedades del ambiente local y la concentración de las biomoléculas. Adaptado de ¹³⁶.

De acuerdo a este nuevo paradigma, la separación de fases líquido-líquido en el núcleo celular promueve la concentración de ciertas proteínas y ácidos nucleicos en condensados biomoleculares con estructuras similares a gotas ⁹³. Entre sus funciones más discutidas, se ha propuesto que pueden favorecer o dificultar interacciones entre biomoléculas regulando así procesos biológicos y organizando el espacio interno del núcleo ¹³⁷. Esta propiedad le proporcionaría a la célula plasticidad en la respuesta a estímulos, donde los condensados agregarían una capa de regulación a los procesos celulares.

Independientemente del mecanismo de formación, la compartimentalización puede regular la concentración local y la disponibilidad de biomoléculas, lo que podría modular la cinética de reacciones bioquímicas ¹³⁸. Entre otras funciones, los condensados podrían concentrar ciertos reactivos, favoreciendo la velocidad de las reacciones ¹³⁹⁻¹⁴¹ o secuestrar reactivos, inhibiéndolos ^{142,143} (Figura 2.6); también podrían actuar como reservorios, regulando la concentración de ciertas moléculas que en respuesta a determinados estímulos, podrían incorporarse o liberarse de los condensados ¹⁴⁴.

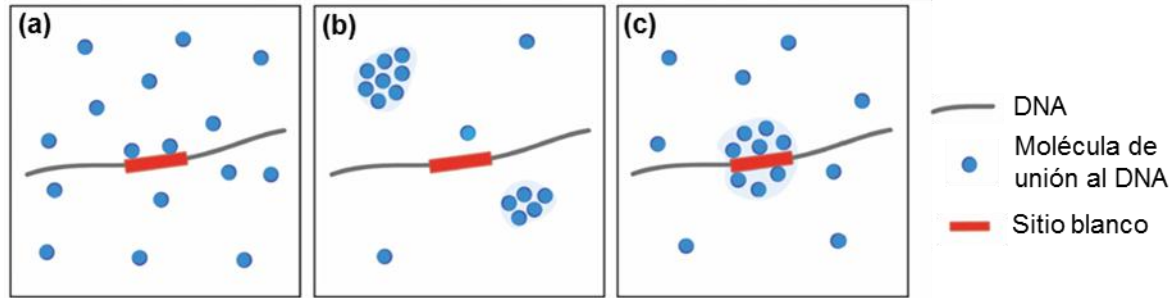


Figura 2.6 Los condensados pueden modular la interacción entre biomoléculas y sus sitios blanco en la cromatina mediante la compartimentalización. Biomoléculas distribuidas homogéneamente **(a)**. Condensados secuestrando biomoléculas lejos de sus sitios blanco en el DNA, disminuyendo la probabilidad de interacción **(b)**. Condensados concentrando biomoléculas en su sitio blanco, favoreciendo la interacción **(c)**. Adaptado de ¹⁴⁵.

Las biomoléculas que forman condensados generalmente son multivalentes ¹³¹ y poseen regiones desordenadas intrínsecamente (IDRs) ¹⁴⁶ que no forman estructuras secundarias o terciarias estables, dando flexibilidad a interacciones inespecíficas ⁹³. Este tipo de estructura molecular permite la generación de una red de interacciones débiles y transitorias ^{132,133,147-149} (Figura 2.7).

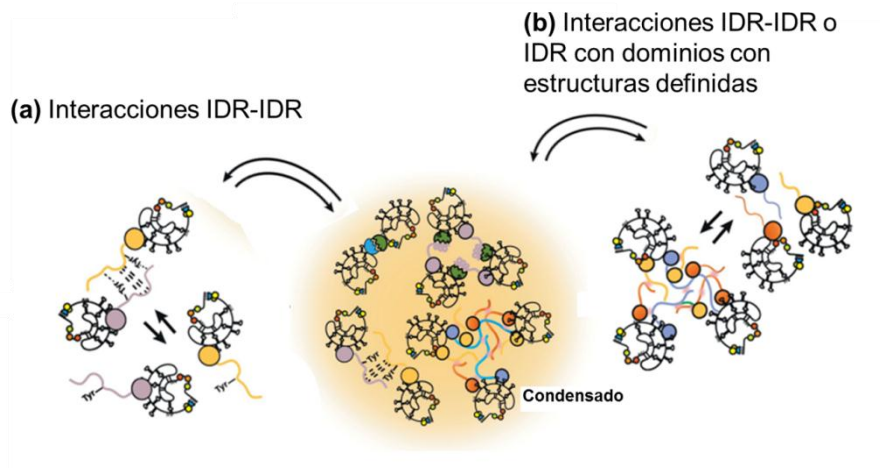


Figura 2.7. Esquema de la red de interacciones entre proteínas. Las proteínas pueden interactuar mediante sus regiones IDR **(a)** o mediante un IDR y un dominio con estructura estable y definida **(b)**. Estas interacciones favorecen el ensamblado de un condensado. Adaptado de ¹⁵⁰.

La separación de fase líquido-líquido también se ha presentado como un mecanismo posible para explicar la compartimentalización de la cromatina ¹⁵¹. Ensayos *in vitro* muestran que las colas de histonas, que poseen IDRs, median el ensamblaje de arreglos nucleosomales formando condensados con propiedades líquidas ⁹³. En particular, se ha propuesto que la histona H1 junto al DNA actúan como anclaje para la formación de dominios de

heterocromatina condensada^{152,153}. Otros reportes, también *in vitro*, muestran que los nucleosomas experimentan separación de fases y que las histonas H2 y H3 favorecen dicho proceso mediante interacciones multivalentes de sus extremos peptídicos¹⁵⁴. La longitud del DNA *linker* que separa un nucleosoma de otro y las modificaciones en las histonas, modularían la separación de fases de la cromatina lo que en última instancia puede influenciar la organización del genoma mediante el establecimiento y mantenimiento de distintos compartimentos cromatínicos^{155–157}.

Sin embargo, en los últimos años, numerosos trabajos han presentado ciertas objeciones al modelo de LLPS para explicar la formación de condensados celulares^{145,151}. Por ejemplo, se argumenta que no existe un criterio experimental claro para definir si un condensado se formó por LLPS dado que es muy difícil establecer un diagrama de fases (Figura 2.5) en el complejo contexto celular, o alterar o perturbar específicamente parámetros del sistema que permitan asignar al proceso unívocamente a LLPS. En este sentido, diversos autores han propuesto mecanismos alternativos para explicar la formación de compartimientos nucleares, por ejemplo, mediante la unión de proteínas a múltiples ácidos nucleicos, formando segmentos entrelazados, denominado separación de fases polímero-polímero (PPPS) o mediante la unión directa de proteínas a sitios específicos de ácidos nucleicos que funcionan como anclaje; esta unión cooperativa favorecería un posterior enriquecimiento local en proteínas¹⁵⁸.

En consecuencia, la naturaleza biofísica de estas estructuras continúa en discusión y distintos mecanismos podrían explicar su formación^{159–161}. Diversos autores tienen opiniones encontradas sobre los condensados nucleares y su formación mediante LLPS, éste es un paradigma reciente que despierta fuertes discusiones en el área de la Biología Celular, del cual todavía queda mucho por elucidar^{162–165}.

Por estas razones, en este trabajo utilizaremos el término *foci* o condensado, sin ninguna implicancia alguna del mecanismo molecular involucrado en su formación.

2.4 Condensados transcripcionales

Unos de los compartimientos subnucleares que han llamado mucho la atención en este campo, son aquellos que concentran en regiones de cromatina, la maquinaria transcripcional, RNAs recién sintetizados, cofactores y/o diversos TFs^{166–173}. Estas estructuras se denominan “condensados transcripcionales”^{174–178} y han sido re-analizadas en el nuevo paradigma de los condensados líquidos. En esta dirección, diversos trabajos han mostrado que muchas proteínas relacionadas con la transcripción son capaces de experimentar separación de fases en solución, por ejemplo, Mediador, RNA Pol II¹⁷⁴, HOXD13, TBP¹⁷⁷, BRD4¹⁷⁵, YAP¹⁷⁹ y el TF de pluripotencia OCT4¹⁷⁶.

Con estos y otros antecedentes, se ha propuesto que los condensados transcripcionales se formarían a partir de una “semilla” o centro de nucleación generada por la unión de TFs y coactivadores a regiones del DNA, que pueden incluir promotores y/o *super-enhancers*⁹³ seguido por el reclutamiento de otros TFs, coactivadores y RNA polimerasas mediante interacciones débiles, que probablemente involucren IDRs y dominios multivalentes^{148,176,180,181} (Figura 2.8). Entre otras funciones, se ha propuesto estos condensados promoverían la activación de *enhancers* en células vivas, facilitando interacciones de largo alcance y la organización del genoma¹⁸⁰.

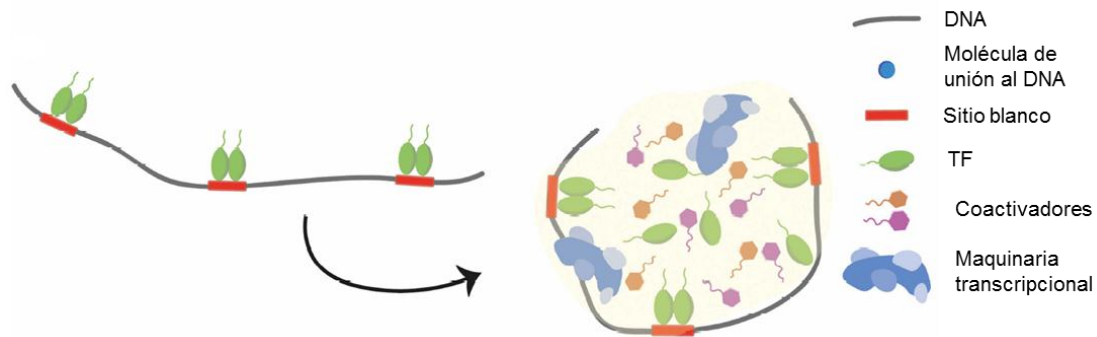


Figura 2.8 Modelo de formación de un condensado transcripcional. Los TFs se unen a regiones específicas en el DNA promoviendo el reclutamiento de otras moléculas como coactivadores, RNA Pol II y otros componentes de la maquinaria transcripcional. La incorporación continua de nuevas moléculas mediante interacciones débiles multivalentes lleva a la formación del condensado. Adaptado de¹⁴⁵.

Este modelo fue respaldado por ensayos *in vitro* y simulaciones computacionales que mostraron que la maquinaria transcripcional formaría condensados en elementos específicos del DNA¹⁸⁰.

Los trabajos iniciales han asociado la formación de estos condensados con una mayor concentración local de la maquinaria transcripcional y una mayor expresión génica^{173,180}. Sin embargo, trabajos recientes muestran que los condensados pueden tener funciones diversas incluyendo la activación^{175,178,182}, represión^{183–187} o no alteración de la transcripción¹⁸⁸. Finalmente, nuestro grupo de trabajo ha observado que condensados de TFs pueden favorecer o reprimir dicho proceso, dependiendo del gen específico¹⁸⁹. Otra función propuesta para los condensados es la de regular la concentración de ciertas biomoléculas en el nucleoplasma. Los condensados pueden incorporar o liberar biomoléculas frente a estímulos específicos; de esta forma, podrían, por ejemplo, contribuir a minimizar el impacto de ruido celular manteniendo constante la concentración de estas biomoléculas en el nucleoplasma^{93,144}.

Además, se ha propuesto que, dentro de un mismo núcleo, pueden coexistir condensados transcripcionales con distinta composición y función y cuyas propiedades dependen, por ejemplo, de modificaciones postraduccionales ¹⁹⁰. En este sentido, se ha observado que la formación de condensados de RNA Pol II y Mediador depende de la fosforilación de la RNA Pol II ^{191–193}, la cual es relevante para la actividad de la polimerasa ¹⁹⁴. Además, Guo y col ¹⁹² mostraron que la fosforilación regula la incorporación de esta polimerasa a dos tipos de condensados con distinta composición: unos que contienen la maquinaria de iniciación transcripcional y otros que concentran la maquinaria involucrada en el *splicing*.

Otras publicaciones indican que la concentración local de RNA modularía la formación o el desensamblado de condensados transcripcionales ¹⁹⁵. Estos trabajos *in vitro* sugieren que, al inicio de la transcripción, las bajas concentraciones de moléculas pequeñas de RNA contribuirían al reclutamiento de otras biomoléculas involucradas en la transcripción mediante interacciones electrostáticas atractivas y, en consecuencia, aumentaría la velocidad del proceso. A medida que la transcripción progresa, la concentración relativa de RNAs de mayor longitud aumenta promoviendo la disolución del condensado por interacciones electrostáticas repulsivas, dando fin a la actividad transcripcional ¹⁹⁵.

Estas evidencias sugieren que la relación entre los condensados transcripcionales y la transcripción no es simple, pudiendo tener efectos favorables, neutros o inhibitorios ¹⁸⁸. Además, muestran que las reacciones que ocurren en los condensados influenciarían su composición supramolecular, lo que a su vez afecta su función, evidenciando una interrelación entre composición y función ⁹³.

2.5 Los condensados y su relación con la pluripotencia

El paradigma de LLPS inició una revisión en el área de CMPs y, en ensayos *in vitro*, se demostró que los TFs de pluripotencia OCT4, SOX y NANOG pueden particionar en condensados líquidos ¹⁷⁶ sugiriendo que este proceso podría contribuir a regular la pluripotencia *in vivo*.

Este trabajo inicial mostró que los TFs serían reclutados mediante interacciones heterotípicas a condensados formados por el coactivador MED1, e incluso SOX2 y NANOG pueden formar estructuras homotípicas similares a condensados líquidos ¹⁷⁶.

Los condensados de OCT4 y MED1 en solución son los estudiados con más profundidad; presentan propiedades típicas de condensados líquidos como forma esférica, sensibilidad a sales y una rápida recuperación luego del fotoblanqueo ¹⁷⁶. La capacidad de OCT4 de incorporarse a estos condensados depende de sus dos dominios de activación, que incluyen IDRs ^{176,196}. De todas formas, las conclusiones de estos experimentos realizados en condiciones *in vitro* no son directamente extrapolables al complejo contexto celular.

El caso de NANOG es particular: este TF se oligomeriza y en solución puede presentar fases líquidas que se reorganizan a sólidas. Se ha propuesto que esta propiedad le permitiría modular la organización de la cromatina acercando físicamente *loci* distantes ¹⁹⁷.

Diversos estudios realizados en CMP han asociado la formación de condensados líquidos con la organización de la cromatina y el destino celular. Por ejemplo, se ha propuesto que moléculas relacionadas con la transcripción, como Mediador y la RNA Pol II, forman *foci* en CME con propiedades de condensados líquidos asociados a cromatina ¹⁷⁴; los autores proponen que estos condensados, que incluirían *enhancers*, permitirían la interacción simultánea de múltiples promotores con la maquinaria transcripcional ¹⁷⁴. Además, se ha propuesto que condensados líquidos formados por OCT4 promoverían una reorganización de TADs que contribuiría a la reprogramación de células somáticas ¹⁹⁸. En esta línea, ensayos *in vitro* en el contexto de la reprogramación han reportado que los condensados de KLF4 se forman en el promotor compactado y altamente metilado de NANOG y reclutan a OCT4 y SOX2; promoviendo la expresión de NANOG mediante el reclutamiento de coactivadores ¹⁹⁹.

Una de las primeras implicancias funcionales propuestas para los condensados transcripcionales es la regulación de la expresión génica por *super-enhancers* ^{175,181}. Estas estructuras son integradas por varios *enhancers* que cooperativamente reclutan moléculas involucradas en la regulación transcripcional promoviendo una alta expresión de sus genes blanco ²⁰⁰. En particular, los TFs de pluripotencia en células madre se unen frecuentemente a SEs asociados a genes involucrados en la definición de la identidad celular ^{201,202} y en genes asociados a la pluripotencia ²⁰³ como Nanog ²⁰⁴, Sox2 ²⁰⁵ y Oct4 ²⁰⁶.

Se ha propuesto que ciertos condensados líquidos podrían incluir SEs y concentrar coactivadores como MED1 y BRD4 ¹⁷⁵, RNA Pol II ¹⁷⁴ y TFs como OCT4 ¹⁷⁶ (Figura 2.9). Es relevante mencionar que los condensados de MED1 y BRD4 compartimentalizan y concentran la maquinaria transcripcional en genes clave para el mantenimiento de la identidad celular, garantizando una transcripción activa de dichos genes ¹⁷⁵. La inclusión de SEs en condensados líquidos tendría efectos aditivos y sinérgicos sobre la transcripción, permitiendo además cambios rápidos en los programas transcripcionales mediante la activación génica ²⁰⁷.

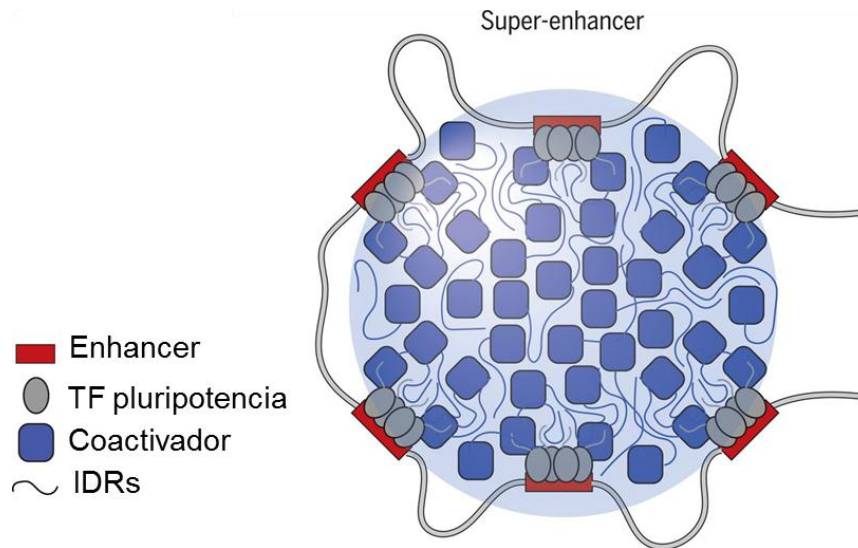


Figura 2.9. Esquema propuesto para un condensado en CME que incluye un SE. Los TFs de pluripotencia (i.e. OCT4) interactúan con coactivadores (i.e. MED1) mediante sus IDRs y con *enhancers*, formando un condensado. En el contexto de CME, los SEs suelen estar relacionados con la expresión de genes clave para el mantenimiento de la identidad celular y la pluripotencia. Adaptado de ¹⁷⁵.

Por otro lado, se ha demostrado que, en CME, los condensados de Mediador pueden concentrar factores de señalización de diferentes vías (p. ej., WNT, TGF- β , JAK/STAT, Hippo-YAP) que definen transiciones a distintos destinos celulares ^{208–211} (Capítulo 1, Sección 1.6).

Por ejemplo, YAP ^{210,211}, un coactivador íntimamente involucrado en el destino celular (Capítulo 3, Sección 3.6), puede formar condensados en SEs de CME con SOX2, OCT4, NANOG, KLF4 y Mediador ²¹². Su hiperactivación promueve dicho proceso, activando la expresión de genes relacionados con la diferenciación preferencialmente hacia endodermo ²¹².

El paradigma de los condensados nucleares podría contribuir a la regulación de la expresión génica. En particular, la formación de condensados en SE modularía la expresión génica en gran escala y distintas señales de diferenciación podrían promover cambios en el número y/o la composición de condensados transcripcionales que, a su vez, promoverían modificaciones en la organización de la cromatina y/o en la accesibilidad de la maquinaria transcripcional o moléculas relacionadas con la transcripción a sus genes blanco.

Así, la organización de la cromatina, la estructura tridimensional de los elementos regulatorios, la concentración de TFs, co-activadores, la maquinaria transcripcional y las modificaciones postraduccionales, modularían la formación de condensados que, en última instancia, regularían los programas transcripcionales guiando el proceso de desarrollo ²¹³.

Capítulo 3: Rol del citoesqueleto en la transmisión de señales mecánicas al núcleo celular

3.1 Introducción

El citoesqueleto es una compleja red formada por tres tipos de biopolímeros: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios ²¹⁴. En conjunto forman una estructura compleja y funcionalmente versátil que se encuentra involucrada en una gran variedad de procesos tales como la división celular, el transporte intracelular, la migración y cambios de la morfología celular ²¹⁵. Las tres redes del citoesqueleto se interconectan a través de complejos moleculares y biomoléculas sencillas. Además, el citoesqueleto se encuentra en constante remodelación por las fuerzas mecánicas que generan tanto los motores moleculares que se mueven y unen a los filamentos, como la propia polimerización/depimerización de los filamentos que lo componen ^{214,216–218}.

Trabajos recientes han demostrado que estímulos mecánicos aplicados a nivel de la membrana plasmática son transmitidos por el citoesqueleto hacia el interior del núcleo, influenciando aspectos clave de la función de esta organela ²¹⁹. En el contexto de CMP, se ha demostrado que las fuerzas mecánicas impactan en la pluripotencia ^{220–222} y regulan el destino celular ²²³. En embriones, las fuerzas mecánicas contribuyen a la especificación de linajes celulares y guían los proceso de desarrollo ²²⁴.

En este capítulo, describiremos aspectos esenciales del citoesqueleto celular, enfocándonos fundamentalmente en su rol en la mecanotransducción en las CME, células que constituyen nuestro modelo de estudio, y otros sistemas celulares relacionados.

3.2 Las redes del citoesqueleto

A diferencia de los numerosos estudios sobre la morfología y función del citoesqueleto en células somáticas ^{225–228}, se desconocen aspectos fundamentales de la organización del mismo en CME. Los pocos trabajos previos disponibles hasta hace unos años, describían al citoesqueleto de este tipo de células como poco organizado ²²⁹. Sin embargo, esta caracterización surge de la observación de imágenes bidimensionales adquiridas en células fijadas; destacamos que la fijación puede provocar alteraciones en la organización de diversos componentes celulares, incluyendo al citoesqueleto ^{230,231}. Además, estas células se caracterizan

por su morfología tridimensional y por crecer en colonias, por lo que su observación en un solo plano no es suficiente para hacer una descripción que contemple la complejidad de la estructura de su citoesqueleto.

3.2.1 La red de actina

3.2.1.1 Propiedades generales de la red de actina

Muy brevemente, la red de actina se compone por filamentos de actina (F-actina) formados a partir de la polimerización de actina monomérica (G-actina o actina globular)²³². En células somáticas, se ha observado que estos filamentos se extienden en todo el citoplasma, ya sea como filamentos individuales o formando estructuras mecánicamente distintas, tales como las fibras de estrés (Figura 3.1)²³³. Esta red tiene funciones muy relevantes en procesos como la adhesión y migración celular, la morfogénesis, la detección y transmisión de estímulos mecánicos²³⁴.

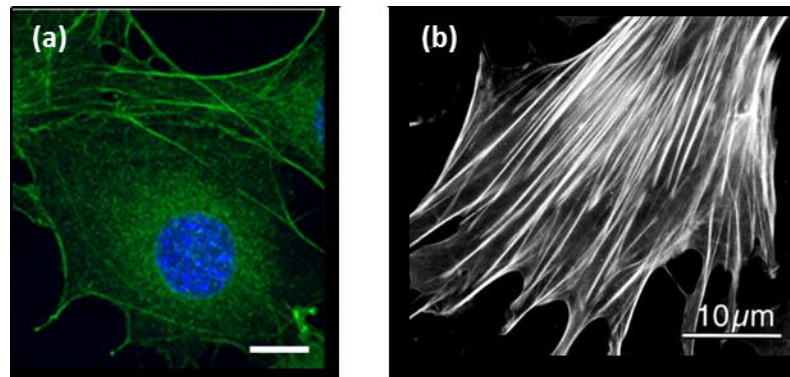


Figura 3.1. La organización de actina en fibroblastos. Los núcleos se muestran en azul y la red de actina, en verde. Barra de escala, 10 μm . Adaptado de ²³⁵ (a). Fibras de estrés periféricas y centrales. Adaptado de ²³⁶ (b).

El rol de la red de actina citoplasmática en numerosos procesos biológicos se encuentra asociado a su capacidad de transmitir y generar fuerzas mecánicas, ya sea mediante la polimerización de sus filamentos, produciendo fuerzas de empuje contra barreras físicas (i.e. organelas) o por constituir vías para el transporte activo de motores moleculares de la familia de las miosinas^{237,238}.

Las señales mecánicas externas son transmitidas desde la membrana celular y propagadas por las diversas redes del citoesqueleto hacia el interior celular. Se ha observado que, en los sitios de contactos de la célula con la matriz extracelular (ECM), se generan adhesiones focales (FA); la dinámica de estos complejos multiproteicos, que se conectan

directamente al citoesqueleto de actina, contribuye a la migración celular y los cambios en la morfología asociados ²³⁹. Como discutiremos en detalle más adelante, la red de actina también se conecta mecánicamente con el núcleo celular contribuyendo, entre otras funciones, a definir su posición y desplazamiento en estos procesos celulares ²⁴⁰.

3.2.1.2 La red de actina en células madre embrionarias

El tamaño relativamente pequeño de las CME y su estructura netamente tridimensional, dificultaron históricamente la observación de detalles morfológicos de su red de actina. Sin embargo, recientemente se ha empleado microscopía de super-resolución para visualizar la red con resolución espacial de ~100 nm ²⁴¹. Este trabajo mostró que la corteza de actina -que recubre interiormente la membrana celular- es una red isotrópica de baja densidad de F-actina y que el motor miosina II no estaría involucrado en la arquitectura y las propiedades mecánicas de esta red. De esta forma, la corteza de actina en CME se caracteriza por ser muy flexible en comparación a la de otros tipos celulares ²⁴¹ y, en consecuencia, los estímulos mecánicos externos serían transmitidos más eficientemente al núcleo celular que en el caso de líneas celulares diferenciadas con cortezas más rígidas ²⁴¹.

Esta red no es un actor pasivo en el mantenimiento de la pluripotencia ni durante la diferenciación ^{242,243} ya que se remodela activamente durante estos procesos ²⁴³ y participa como un importante transductor de señales. En este sentido, también se ha observado que la morfología general de la red de actina es sensible a modificaciones en el estado de pluripotencia de CME ²⁴⁴; por ejemplo, la Figura 3.2 ilustra la organización general de esta red en CME cultivadas en condiciones que recapitulan al embrión pre-implantatorio (LIF+2i) (sección 1.5) o al post-implantatorio (LIF). Estos resultados evidencian una relación estrecha entre pluripotencia, destino celular y la organización del citoesqueleto.

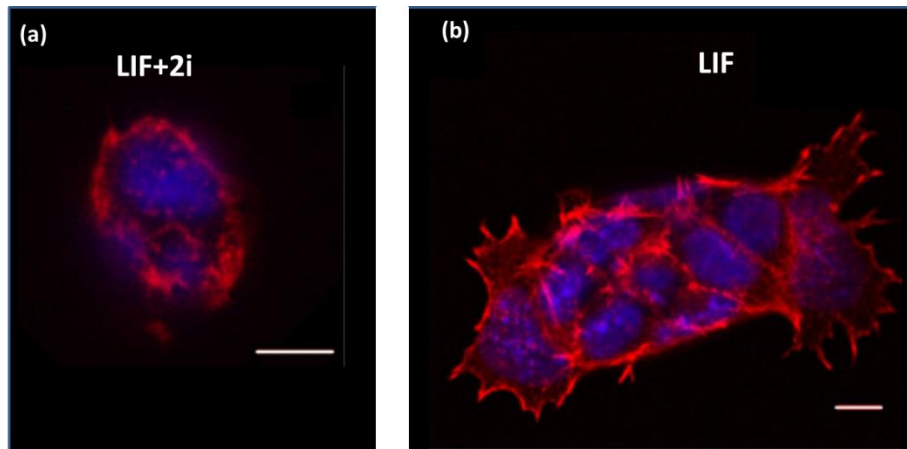


Figura 3.2. Morfología de la red de actina en CME. Imágenes representativas de microscopía confocal de CME cultivadas con LIF+2i **(a)** o LIF **(b)**. Los núcleos están coloreados en azul y la red de actina en rojo. Barras de escala, 10 μm . Adaptado de ²⁴⁴.

Diversos trabajos relacionan las fuerzas transmitidas por la actina cortical y la pluripotencia celular. En particular, se ha observado que las colonias de CME de ratón presentan una corteza supracelular de actina y miosina que puede contraerse generando tensión hacia el interior de la colonia, la cual, indirectamente, contribuiría a la preservación de la pluripotencia ²²⁰. Además, las células del borde de colonias de CME humanas comienzan a diferenciarse antes que las células del interior; se postula que este hecho es consecuencia de la mayor actividad de actina-miosina en las células del borde, lo que define un distinto nicho mecánico ²⁴⁵. Por otro lado, durante la transición del estado *naïve* al *primed* en CME se separa la corteza interna de actina de la membrana plasmática; este proceso es acompañado por una disminución en la tensión de membrana requerida para la diferenciación ²⁴⁶. Por último, se ha observado que las fuerzas generadas por actina modulan la morfología de cuerpos embrioides y su diferenciación hacia distintos linajes ²⁴⁷.

Llamativamente, las fuerzas mecánicas generadas por la corteza de actina en CME pueden inducir la expresión de TFs de pluripotencia como OCT4 y NANOG ²²⁰, lo que seguramente promueve cambios en el programa transcripcional de las células.

La actina no solo transmite señales mecánicas hacia el núcleo sino que también está presente dentro de esta organela, donde contribuiría a regular la transcripción, la remodelación de la cromatina y participar en la reparación del DNA ^{248,249}.

3.2.2 La red de microtúbulos

3.2.2.1 Propiedades generales de los microtúbulos

Los microtúbulos se polimerizan a partir de heterodímeros de α y β tubulina²⁵⁰. Entre sus funciones, forman el huso mitótico, indispensable para la mitosis, componen el axonema de cilias y flagelos, y constituyen vías para el transporte de diferentes cargos celulares como organelas, vesículas y ciertas proteínas, mediante los motores moleculares dineínas y kinesinas^{251,252}. Es relevante destacar para esta trabajo de tesis, que los microtúbulos son vías para el transporte activo de diversos TFs y contribuyen a definir su distribución subcelular y concentración nuclear^{253,254} ya que regulan la cinética de traslocación núcleo-citoplasmática²⁵⁵

Al igual que la red de actina, genera fuerzas mediante su interacción con los motores moleculares y por su polimerización-depolimerización^{238,256,257} y puede transmitir señales mecánicas hacia el núcleo²¹⁹ impactando en su organización interna, como veremos más adelante.

En numerosos tipos de células somáticas, esta red adopta arreglos espaciales específicos (Figura 3.3), concentrando sus extremos negativos en MTOCs (*Microtubule Organization Centers*) localizados en la región perinuclear. El MTOC más caracterizado es el centrosoma²⁵⁸ pero se ha descrito en la bibliografía la existencia de otros tipos de MTOCs acentrosomales que pueden organizarse apicalmente, corticalmente o en la región perinuclear²⁵⁹.

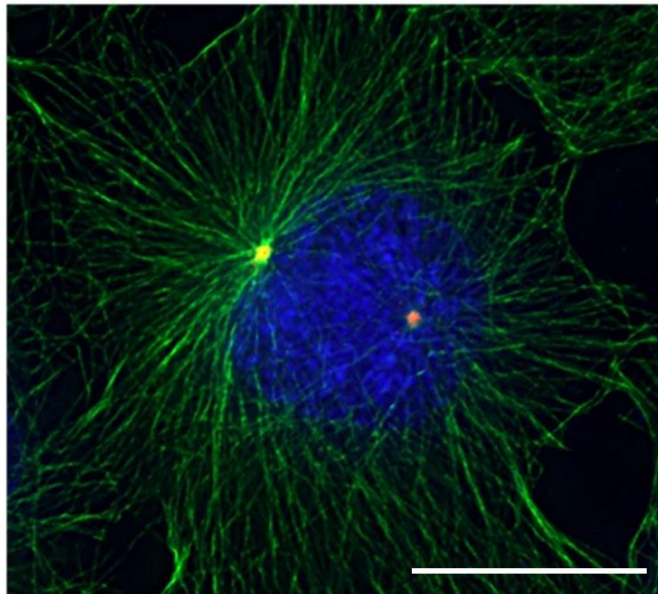


Figura 3.3. La organización de microtúbulos de una célula en interfase. Se muestra la red de microtúbulos (verde) irradiando desde un centrosoma (rojo) y el núcleo celular (azul). Barra de escala, 10 μm . Adaptado de²⁶⁰.

3.2.2.2 Los microtúbulos en células madre embrionarias

Existen muy pocos trabajos en la literatura relacionados con la organización de los microtúbulos en CME.

Se ha descrito que CME hermanas se mantienen unidas luego de la división celular por puentes citoplasmáticos formados por microtúbulos (Figura 3.4) a través de los cuales las células intercambian material citoplasmático ²⁶¹. Estos puentes son muy similares a los que se encuentran entre células del embrión pre-implantatorio ²⁶². Si bien dichas estructuras están presentes en una gran variedad de células eucariotas ²⁶³, incluyendo células somáticas ²⁶⁴ donde persisten por varias horas ²⁶⁵, se ha observado que los puentes son estables por más tiempo en CME ²⁶¹. Además, la dinámica de abscisión del puente es más lenta en CME *naïve* que en estadios más diferenciados ²⁶¹ sugiriendo una relación entre estos puentes y la pluripotencia.

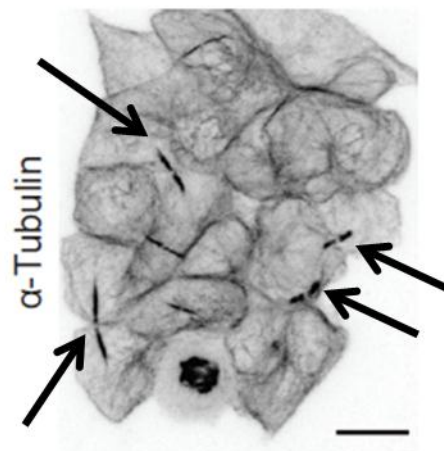


Figura 3.4. Puentes citoplasmáticos conteniendo α -tubulina conectando células en una colonia de CME. Se muestra la estructura de α -tubulina, destacando los puentes citoplasmáticos entre células hermanas (flechas negras) en una colonia de CME. Barra de escala, 10 μ m. Adaptado de ²⁶¹.

Trabajos previos en otros tipos de células madre sugieren que la red de microtúbulos se encuentra involucrada en la preservación de la pluripotencia y la diferenciación. En particular, se ha reportado que los microtúbulos pueden regular la forma del núcleo y la expresión génica en los primeros estadios de la diferenciación de células madre hematopoyéticas ²⁶⁶ y mesenquimales ²⁶⁷. En este último caso, la estabilización de la red puede promover la diferenciación hacia linajes condrogénicos ²⁶⁷.

Por otra parte, se ha reportado que las características nanomecánicas de los microtúbulos estarían involucradas en la mecanotransducción, la velocidad de transporte de proteínas y la pluripotencia en general ²⁶⁸. A modo de ejemplo, señales mecánicas transmitidas por los microtúbulos desde las uniones estrechas entre células hacia el núcleo, podrían modular programas transcripcionales ²¹⁹. Más adelante ahondaremos en los posibles mecanismos moleculares por los que esta red transmite señales mecánicas y modula el transporte y la traslocación de TFs pudiendo modificar, en última instancia, el proceso de transcripción.

3.2.3 Los filamentos intermedios: vimentina.

3.2.3.1 Propiedades generales de los FI

Los filamentos intermedios (FI) constituyen una familia heterogénea de biopolímeros donde cada tipo de filamento se genera por la polimerización de una proteína monomérica diferente ²⁶⁹ cuya expresión es específica de los tejidos y tipos celulares ²⁷⁰. Es importante destacar que la expresión de los distintos tipos de FI varía con el estadio del desarrollo embrionario y durante la diferenciación ²⁷¹, y que participan en distintas vías de señalización involucradas en diversos procesos del desarrollo ^{271,272}.

Entre sus funciones generales se encuentran la modulación de la morfología celular y de las propiedades mecánicas de las redes del citoesqueleto, interconectadas por sus distintos componentes ²⁷³, la protección ante el estrés mecánico, la migración ²⁷⁴ y las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular ²⁷⁵.

A diferencia de los microtúbulos y de la actina, los FI no se asocian a motores moleculares formando sistemas contráctiles que generen fuerzas, sin embargo, son capaces de transmitirlos ^{275,276}. Por otra parte, los FI interactúan con el sitio de unión al cargo de ciertos motores moleculares ²⁷⁷.

En este trabajo nos focalizaremos en dos tipos de FI: la vimentina y las laminas, estas últimas componen la lámina nuclear. A continuación, ahondaremos en la estructura y el rol de la vimentina en CME, en la sección 3.3 discutiremos el rol de las laminas en la mecanotransducción y en la sección 3.4 la expresión de laminas en CME.

3.2.3.2 La vimentina en células madre embrionarias

En diversos tipos celulares como MEF, células epiteliales y mesenquimales ^{270,278,279}, la red de vimentina se distribuye en el citoplasma y se concentra alrededor del núcleo formando una “jaula nuclear” que protege mecánicamente al núcleo ²²⁷ (Figura 3.5).

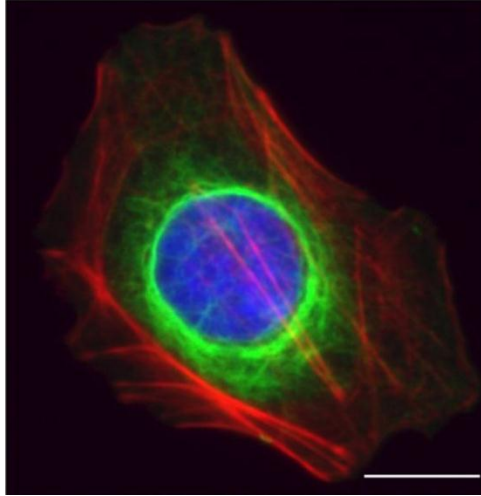


Figura 3.5. La jaula perinuclear de vimentina. Se muestra la estructura de vimentina (verde) alrededor del núcleo (azul), formando la “jaula nuclear” en células HUH7. La red de actina se muestra en rojo. Barra de escala, 15 μm . Adaptado de ²⁷⁹.

Además, se observan estructuras de tipo anillo y/o nudos (*knots*) rodeando al núcleo, que modularían la morfología de la organela en procesos donde las células se encuentran poco adheridas al sustrato, como en el inicio de la adhesión celular o el desprendimiento previo a la mitosis ²⁷⁶.

La vimentina se expresa durante diferentes etapas del desarrollo embrionario; en CME, la expresión de vimentina es baja pero detectable, sus niveles aumentan durante la diferenciación temprana (Figura 3.6), y luego es reemplazada por otros IFs tejido-específicos ^{278,280}.

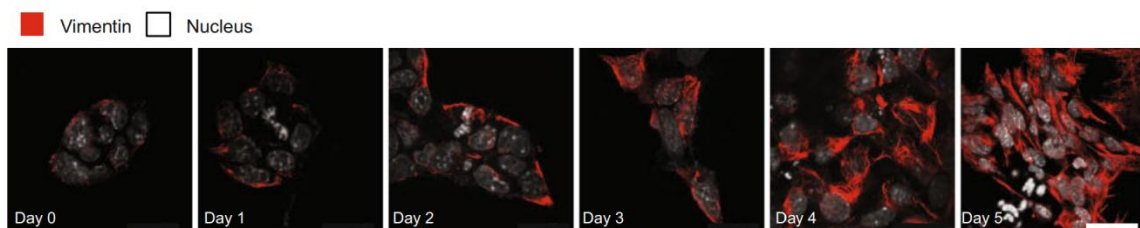


Figura 3.6. Imágenes de inmunofluorescencia donde se muestra la red de vimentina, en CME de ratón diferenciándose. Se muestra la red de vimentina (rojo) y los núcleos (escala de grises) en función del tiempo de diferenciación. Adaptado de ²⁷⁸.

Diversos antecedentes sugieren que la red de vimentina juega un rol relevante en la diferenciación celular ²⁸¹. Por ejemplo, las CME no logran diferenciarse correctamente en ausencia de vimentina, mostrando una particular deficiencia en la diferenciación neural y una

disminución en los niveles de expresión de OCT4²⁷⁸. Otros reportes, generando cuerpos embrioides a partir de CME normales y CME *knockout* para vimentina, muestran que la capacidad de diferenciarse y formar estos cuerpos fue menor en aquellas células sin vimentina, aún cuando los niveles de expresión de OCT4 fue similar en ambos tipos celulares²⁸².

3.3 Comunicación entre el citoesqueleto y el núcleo

La interacción entre las redes del citoesqueleto y el núcleo permite la transmisión directa de señales mecánicas. Esta conexión núcleo-citoplasma se encuentra mediada por distintos conectores moleculares que, como veremos más adelante, contribuyen a la organización interna de la organela²¹⁹.

Uno de los componentes celulares responsables de esta comunicación es el complejo LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*), que conecta a los filamentos de actina, microtúbulos y FI con la envoltura nuclear²⁸³ (Figura 3.7). Esta interacción ocurre a través de ciertas proteínas que poseen dominios KASH y se encuentran ancladas a la membrana externa del núcleo. En los mamíferos, las proteínas KASH se denominan nesprinas; cada tipo de nesprina conecta a una red específica del citoesqueleto, las nesprinas 1 y 2 conectan al núcleo con la red de actina, la nesprina 3 interactúa con FI y por último la nesprina 4 interactúa con microtúbulos a través de motores moleculares²⁸⁴. En el espacio intermembrana, las proteínas KASH interactúan con proteínas con dominio SUN, que atraviesan la membrana nuclear interna y exponen este dominio hacia el lumen. De esta manera, la conexión mecánica mediante el complejo LINC depende de las interacciones entre estos dos dominios, SUN-KASH²⁸⁵.

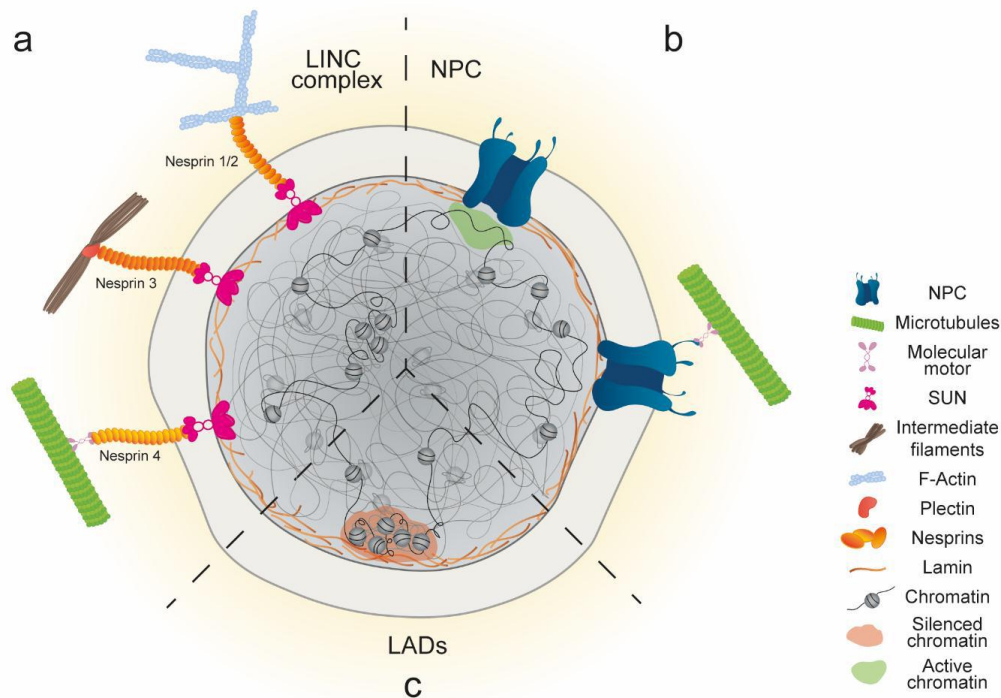


Figura 3.7. Transmisión de fuerzas hacia el núcleo. Representaciones del complejo LINC y sus conexiones con los distintos componentes del citoesqueleto **(a)** y del complejo del poro nuclear (NPC) y su conexión con la red de microtúbulos **(b)**. Estos componentes y la lámina nuclear contribuyen a la organización de la cromatina, definiendo dominios compactados asociados a la lámina nuclear (LADs) y regiones donde la cromatina se encuentra activa y laxa **(c)**. Figura cedida por Candelaria Díaz y Camila Oses.

Otro complejo proteico relevante para la trasmisión de fuerzas mecánicas hacia el núcleo es el complejo del poro nuclear (NPC) (Figura 3.7); el cual puede conectarse físicamente al citoesqueleto y al complejo LINC en su cara citoplasmática^{286,287}, atraviesa toda la envoltura nuclear, y transporta moléculas de manera selectiva y bidireccional hacia o desde el núcleo²⁸⁸⁻²⁹⁰. Trabajos recientes muestran que la tensión mecánica transmitida por actina²⁹¹ o microtúbulos²⁹² podría modular la conformación del NPC²⁹³, modificando el transporte de moléculas a través del mismo, incluyendo proteínas como TFs o coactivadores mecanosensibles como YAP²⁹⁴, lo que podría modificar su concentración dentro de la organela e impactar en la regulación de la transcripción, como veremos más adelante.

Tanto los complejos del NPC como LINC²⁹⁵⁻²⁹⁷ se distribuyen de forma heterogénea en la membrana nuclear y parecen alinearse en regiones donde se concentran fibras de actina apical, por lo que su localización podría modular cómo y dónde se transmiten las fuerzas hacia el núcleo.

En el interior de la organela, LINC y NPC interactúan con la lámina nuclear, una red densa y entrecruzada de filamentos intermedios denominados laminas^{110,298,299}. Estas proteínas

son muy importantes en la mecanotransducción dada su capacidad de responder a estímulos mecánicos, ya sea mediante cambios conformacionales, modificaciones postraduccionales o cambios en su localización subcelular ²⁸³.

La lámina nuclear también contribuye a la organización perinuclear del citoesqueleto, evidenciando que la conexión física núcleo-citoesqueleto impacta en la organización de ambos componentes celulares ^{300,301}.

En mamíferos la familia de laminas incluye a las isoformas de tipo A (laminas A y C) y tipo B (B1 y B2) ³⁰². Las laminas del tipo B se localizan preferencialmente en la membrana nuclear mientras que las de tipo A/C también se encuentra en el nucleoplasma interactuando con diversas biomoléculas, incluyendo a la cromatina ^{303,304}. Las laminas tipo A y B forman redes interconectadas pero distintas, asociadas a la envoltura nuclear ^{305,306}, estando la red de lamina B concéntricamente más cercana al núcleo ³⁰⁷. Además, esta lamina organizaría a las laminas A/C ³⁰⁸, mostrando como estas redes se comunican y regulan entre sí.

En la Sección 3.2.3.1 mencionamos que la expresión de FI es tipo celular y tejido específica. La mayoría de los tipos celulares expresa laminas tipo B mientras que la expresión de las de tipo A depende de los estadios del desarrollo ^{309,310}. Los niveles de lamina A incrementan con la rigidez del tejido ³¹¹ y aquellas regiones de la envoltura nuclear con alta densidad de laminas A/C experimentan menores deformaciones ante estímulos mecánicos ³¹². Por otro lado, mutaciones en las laminas A/C dan como resultado núcleos frágiles ^{313–317}, enfatizando su relevancia en la protección mecánica de la organela ^{303,318}.

La lámina nuclear interactúa directamente con la cromatina contribuyendo a la organización del genoma ³¹⁹. La periferia nuclear suele estar enriquecida de heterocromatina compacta y con pocos genes, con LADs interactuando con la lámina nuclear (Figura 3.7). Diversos trabajos sugieren que las regiones perinucleares asociadas a laminas son regiones represivas para la transcripción; por ejemplo, se ha mostrado que anclar artificialmente genes activos a la lámina nuclear provoca una disminución en sus niveles de expresión ^{320,321}. En el contexto de la pluripotencia, es importante destacar que, durante el proceso de diferenciación celular, la cromatina se reorganiza dando una configuración general distinta para los LADs ^{322,323}.

3.4 Laminas en células madre pluripotentes

Aunque las laminas tengan un rol fundamental en la mecanotransducción y en la organización de la cromatina de células somáticas, su papel en CMP se encuentra poco estudiado. Algunos autores sostienen que las CME no expresan laminas A hasta el comienzo de la diferenciación ^{324,325} mientras que otros proponen que sí se expresan pero a bajos niveles ³²⁶ y que se localizan en la periferia nuclear de CME ³²⁷. Reportes más recientes muestran que las laminas A/C se expresan en CME *naïve*, y que regulan la arquitectura de la cromatina y la conservación de la pluripotencia ³²⁸. Además, se ha verificado que la disrupción de un alelo del

gen de laminas A/C provoca la formación de endodermo visceral y reduce la diferenciación neural y miogénica en cuerpos embrioides formados a partir de CME ³²⁹.

Por otro lado, las laminas B no serían requeridas para la preservación de la pluripotencia ni la autorrenovación en CME, pero serían relevantes durante el desarrollo y para una correcta organogénesis ³³⁰.

3.5 Las fuerzas mecánicas influyen en la regulación transcripcional

En un trabajo fundamental en el área, Engler y col ²²³ demostraron que células madre mesenquimales humanas inducidas a diferenciarse sobre sustratos de distintas elasticidades, se diferencian a distintos linajes como neuronas, mioblastos u osteoblastos según la rigidez del sustrato ¹⁷. Este trabajo fundacional inició una evaluación de las vías por las cuales las señales mecánicas se transducen e impactan en la regulación de la expresión génica.

Ya sea en un organismo en desarrollo (Sección 3.7), en cuerpos embrioides o en cultivos en monocapa, las células madre interactúan mecánicamente entre sí y con su nicho a través de adhesiones moleculares que transducen señales mecánicas manteniendo la homeostasis ³³¹, regulando la autorrenovación y la diferenciación ²²⁴. Dado que la composición y organización del citoesqueleto varía según tejidos y tipos celulares específicos, la transducción de señales y su efecto en el destino celular, variaría entre distintos nichos de células madre ³³². En este sentido, comprender cómo las fuerzas mecánicas regulan el comportamiento de este tipo de células es vital para entender el balance entre pluripotencia y diferenciación, y para el progreso de futuras terapias que involucren células madre ²²⁴.

En la Sección 3.3 describimos la conexión citoesqueleto-núcleo y mencionamos que los estímulos mecánicos pueden promover, directamente y sin la necesidad de activar cascadas de señalización, tanto modificaciones en los compartimentos nucleares (i.e. Cajal Bodies, nucleólo) ^{333,334} como en procesos como la transcripción ³³⁵.

La Figura 3.8 muestra un esquema muy simplificado de una de las vías directas posibles por las cuales los estímulos mecánicos pueden promover cambios en la expresión génica.

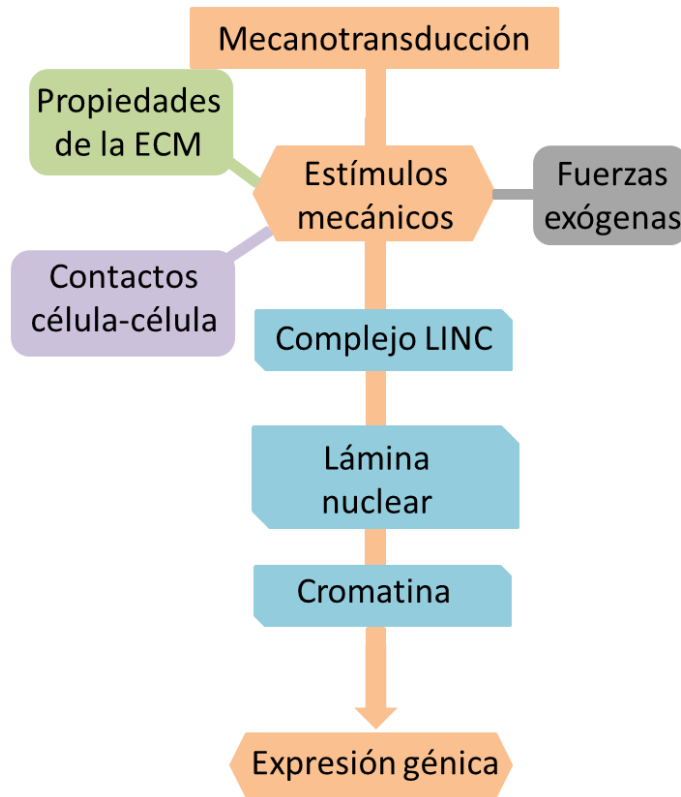


Figura 3.8. La mecanotransducción puede modular la expresión génica. Diferentes tipos de estímulos mecánicos (i.e. fuerzas exógenas, contactos célula-célula o propiedades de la ECM) se transmiten hacia el núcleo mediante el complejo LINC; estas fuerzas pueden promover modificaciones en la estructura y organización de la lámina nuclear y la cromatina, lo que en última instancia impacta en la expresión génica. Adaptado de ³³⁶.

Para estudiar el impacto directo de fuerzas en la organización nuclear, se han empleado “pinzas magnéticas” ³³⁷, las cuales permiten aplicar fuerzas a microesferas magnéticas ³³⁵, conectadas a la membrana celular a través de integrinas. En células CHO, se ha observado que estas fuerzas, propagadas por la red de actina, producen desplazamientos y deformaciones de regiones de cromatina alterando en consecuencia su accesibilidad ³³⁸. Llamativamente, este efecto se pierde a altas frecuencias debido a un incremento en la rigidez de las células que previene que la cromatina se extienda demasiado ³³⁸, sugiriendo que el efecto que tienen las fuerzas sobre la transcripción depende de las propiedades del estímulo mecánico. En el mismo trabajo, los autores muestran que aquellos genes localizados en el interior del núcleo son más sensibles a las fuerzas que aquellos localizados en la periferia ³³⁸, sugiriendo que las fuerzas no se transmiten homogéneamente a todo el núcleo celular. Finalmente, los autores sugieren que ciertas marcas epigenéticas median el reclutamiento de la RNA Pol II y facilitan la activación de genes mediante estímulos mecánicos.

En esta dirección, se ha observado que la compresión de fibroblastos, mediante su confinamiento en canales microfluídicos durante milisegundos, produce una deformación del núcleo e induce la reducción de las marcas epigenéticas represivas típicas de heterocromatina, específicamente H3K9me3. Además, las células sometidas a la compresión en estos canales presentan un aumento en la expresión de laminas A/C y un desacople parcial entre la lámina nuclear y LADs; llamativamente, estos cambios globales en la cromatina producen un aumento en el potencial de reprogramación de fibroblastos a neuronas³³⁹.

Estas observaciones muestran la relevancia del *paisaje* epigenético en la regulación transcripcional mediante estímulos mecánicos.

3.6 Factores de transcripción mecanosensibles

Previamente hemos ahondado en la mecanotransducción directa y su efecto en la expresión génica. En esta sección, desarrollaremos brevemente cómo los estímulos mecánicos pueden modular la transcripción mediante la activación de cascadas de señalización, enfocándonos en las propiedades de TFs.

Los TFs y coactivadores mecanosensibles son aquellos que responden a señales mecánicas y modulan la transcripción, algunos de los más conocidos son KLF4, NF-κB y TEAD/YAP³⁴⁰. Brevemente, KLF4, uno de los TFs de Yamanaka⁴², está involucrado en procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la reprogramación de células somáticas y la diferenciación, regulando negativamente la vía de señalización de ERK1 y ERK2 en CME³⁴¹; como mencionamos en la Sección 1.6, la activación de la vía ERK promueve la diferenciación de CME. Entre las funciones de NF-κB, están la de regular la respuesta inmune, procesos inflamatorios, la activación y diferenciación de células inmunitarias innatas y células T inflamatorias³⁴². Por otro lado, YAP está involucrado en la proliferación celular, la tumorigénesis, la determinación de linajes celulares y en la reprogramación, siendo un efector de la vía de señalización Hippo³⁴³.

Estas vías (i.e ERK, Hippo, la vía canónica de NF-κB) promueven cambios en los programas transcripcionales mediante la activación de cascadas de señalización sensibles a estímulos mecánicos. A modo de ejemplo, la rigidez del sustrato puede regular temporariamente la activación de NF-κB mediante la contracción de la actina-miosina, en células de adenocarcinoma de pulmón, lo que provoca la traslocación del TF hacia el núcleo³⁴⁴.

Por otro lado, la localización nuclear o citoplasmática de YAP también se regula por fuerzas mecánicas transmitidas por la red de actina que modulan la permeabilidad de los NPC²⁹⁴. Cuando YAP se encuentra en el citoplasma, se promueve su degradación³⁴⁵, reprimiendo la expresión génica dependiente de YAP. En CME de ratón, YAP se une a *enhancers* distales de Oct4, activando su expresión, y a *loci* de *super-enhancers* en conjunto a los TFs de pluripotencia²¹². Por este motivo, la regulación positiva y la traslocación nuclear de YAP es crucial en CME,

dado que conducen a la formación de nuevos *super-enhancers* que promueven la expresión de genes relacionados con la diferenciación hacia ectodermo, y reprimen aquellos que promueven la diferenciación hacia endodermo ²¹².

La transmisión de fuerzas mecánicas, ya sea de forma directa o mediante la activación vías de señalización, modifica los programas transcripcionales de las células y, en el contexto de las CME, regula en última instancia la pluripotencia y diferenciación. Hasta ahora no se ha reportado que los TFs de pluripotencia sean mecanosensibles; en esta tesis exploraremos si las redes del citoesqueleto modulan la traslocación núcleo-citoplasma OCT4.

3.7 El citoesqueleto y las fuerzas mecánicas durante el desarrollo

Durante el desarrollo embrionario, las fuerzas mecánicas, ya sean intrínsecas o extrínsecas, están involucradas en el crecimiento, la diferenciación y la organogénesis ²²⁴. Las adhesiones célula-célula transmiten fuerzas de tracción y, a medida que transcurre el desarrollo, las células se acoplan mecánicamente a proteínas de la ECM, regulando la morfogénesis, la correcta posición de las células madre en su nicho y el destino celular ²²⁴. En esta sección, describiremos algunos estudios realizados con embriones tempranos de ratón, un sistema relativamente sencillo que puede ser estudiado en condiciones compatibles con la viabilidad, y que permiten apreciar la relevancia de las fuerzas mecánicas y el involucramiento del citoesqueleto.

La organización de las redes del citoesqueleto en los embriones tiene sus particularidades respecto a células somáticas. A modo de ejemplo, entre el estadio de 2 a 8 células, ocurre una relocalización de la lamina A hacia la periferia nuclear, lo que podría estar regulado por la contractibilidad de la actina-miosina ³⁴⁶. En el estadio de 8 células, las heterogeneidades en el citoesqueleto promueven una división espacialmente asimétrica, lo que segrega a las células hacia el interior o exterior del embrión ³⁴⁷. Hasta los estadios posteriores a 8 células el centrosoma está ausente y la red de microtúbulos conecta pares de células formando puentes que funcionan como un MTOC acentrosomal; el cual coordinaría el transporte de moléculas adherentes como la E-caderina hacia la membrana de las células, dicho transporte es requerido para la formación del ICM, que ocurre en estadios más avanzados ³⁴⁸. La Figura 3.9 muestra la estructura de los microtúbulos y la presencia de puentes conectando células en embriones de ratón.

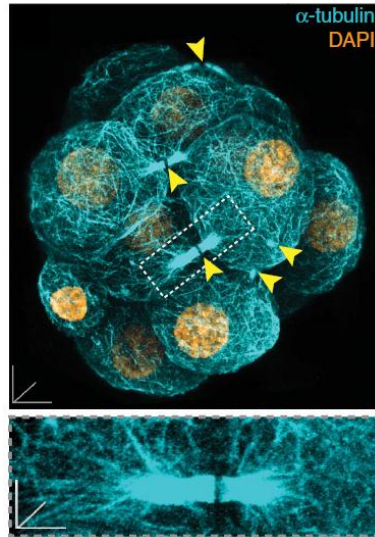


Figura 3.9. Los microtúbulos unen pares de células en embriones tempranos de ratón. Se muestran los núcleos en naranja y los microtúbulos en cian. Las flechas amarillas indican puentes donde se concentran microtúbulos. El panel inferior corresponde a un *zoom* del recuadro con líneas punteadas. Barra de escala, 10 μ m. Adaptado de ³⁴⁸.

Entre los estadios de 8 a 16 células, las células internas del embrión presentan menores niveles de lamina A que las células del exterior, y esta diferencia se mantiene hasta el estadio de blastocisto, entre las células del ICM y el trofoectodermo ³⁴⁶. Como mencionamos en el Capítulo 1, el primer evento de diferenciación es el que da lugar al ICM o al trofoectodermo; estos resultados en embriones muestran la relevancia de la conexión entre las fuerzas mecánicas, la organización del citoesqueleto y la diferenciación celular desde el comienzo del desarrollo.

La compactación ocurre entre la transición de 8 a 16 células, y está regulada por la extensión de filopodios dependientes de E-caderina de las células hacia sus vecinas ³⁴⁹. En el estadio de 16 células, la red de actina se reorganiza formando anillos que posteriormente se extienden y estabilizan las uniones entre células (Figura 3.10); esta reorganización promueve la acumulación localizada de miosina 2, generando la tensión necesaria para la formación del blastocisto ³⁵⁰.

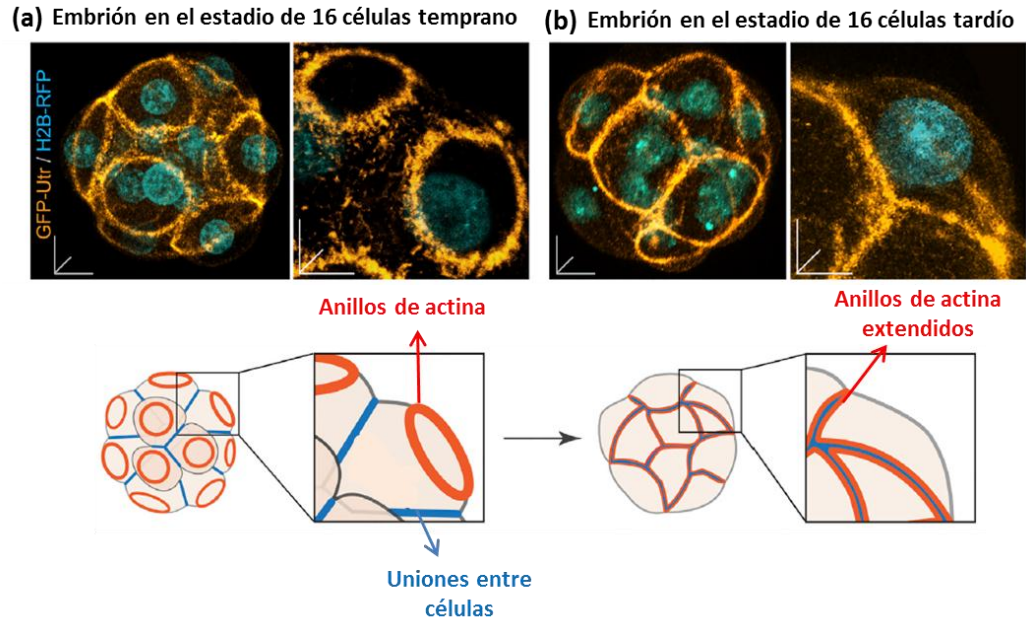


Figura 3.10. Anillos de F-actina cortical se extienden en las uniones entre células en el estadio de 16 células. Imágenes confocales de un embrión de ratón (núcleos en cian) en el estadio de 16 células temprano, donde la actina (naranja) forma anillos **(a)** y en un estadio tardío, donde la actina se extiende en las uniones entre células **(b)**. Barras de escala, 10 μm . Adaptado de ³⁵⁰.

Dada la relevancia del citoesqueleto durante el desarrollo embrionario y en la diferenciación de células madre en cultivo, en este trabajo nos propusimos caracterizar las redes de actina, microtúbulos y vimentina en CME vivas, y estudiar cómo la integridad de diferentes elementos del citoesqueleto puede modular aspectos del TF de pluripotencia OCT4.

Capítulo 4: Hipótesis y objetivos

La transcripción es un proceso complejo con múltiples niveles de regulación a distintas escalas temporales y espaciales. La célula integra múltiples señales de diversa naturaleza que impactan en su programa transcripcional y que, en el caso de las células madre, define el destino celular.

Los factores de transcripción son protagonistas de estos programas y sus niveles de expresión juegan un rol relevante en esta definición; sin embargo, éste no es el único parámetro importante en el control de la expresión génica. En los últimos años, se ha estudiado la relevancia de la compartimentalización nuclear en la regulación de la transcripción y se han observado la existencia de “condensados transcripcionales” donde se concentran tanto factores de transcripción como la maquinaria transcripcional. Por otra parte, se ha determinado que las señales mecánicas cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación.

Comprender los mecanismos moleculares que gobiernan la pluripotencia y la diferenciación es un tema crucial dentro de la biología del desarrollo y la medicina regenerativa, dadas las promisorias aplicaciones de las células pluripotentes en la generación de modelos de enfermedades.

La **hipótesis** subyacente a nuestro trabajo es que ciertos estímulos específicos, incluyendo señales químicas de diferenciación o mecánicas, modulan la distribución nuclear de los TFs de pluripotencia y su dinámica de interacción con la cromatina regulando así el perfil de expresión génica e impactando en el destino celular.

Para testear esta hipótesis, nos propusimos estudiar la distribución y dinámica de TFs de pluripotencia, claves para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las células madre embrionarias, en CME en estado indiferenciado y al inicio de la diferenciación utilizando técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia. Además, ahondamos en la relación entre el citoesqueleto, estructura que interviene en la transmisión de señales mecánicas, y dicha distribución y dinámica.

En este marco, proponemos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar la distribución y dinámica de los TFs de pluripotencia OCT4 y SOX2 en CME de ratón y analizar si se producen cambios al comienzo de la diferenciación celular.
2. Caracterizar la estructura tridimensional de los distintos elementos del citoesqueleto en CME de ratón y estudiar su relación con la dinámica de interacción de OCT4 con la cromatina.
3. Estudiar si los componentes del citoesqueleto afectan la distribución subcelular y nuclear de OCT4 en CME de ratón.

Capítulo 5: Materiales y métodos

5.1 Cultivo Celular

La línea celular de CME de ratón W4 (*Antibody and Bioresource Core Facility, Rockefeller University, EEUU*) y las líneas generadas en nuestro laboratorio a partir de ésta, denominadas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2, fueron cultivadas en medio de propagación compuesto por DMEM alta glucosa (*high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco*) suplementado con 100 U/ml y 100 µg/ml de Penicilina-Estreptomicina (Gibco), respectivamente, 100 mM aminoácidos no esenciales MEM, 2 mM glutamax, 0.1 mM 2-β mercaptoetanol, con 15% de SFB (Gibco). Para mantener su estado pluripotente, se complementó el medio de propagación con Factor Inhibidor de Leucemia (LIF)⁸⁵ y los inhibidores de MEK, 0.5 µM de PD 0325901 (Tocris), y de la quinasa GSK3, 0.3 µM de CHIR 99021 (Tocris), denominados en conjunto “2i”^{86,87}.

La solución de LIF es generada en nuestro laboratorio a partir de una línea de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), modificadas genéticamente para que sobreexpresen LIF y lo secreten al medio de cultivo. Esta línea celular contiene integrado en el genoma el plásmido 8/242 720 LIFD (*Genetics Institute, Cambridge*). Las células se cultivan en DMEM conteniendo 1 mM piruvato de sodio, se dejan crecer hasta un 90% de confluencia, se cuentan las células de una placa y se pone a condicionar medio de cultivo en otras placas de igual densidad durante 48 hs en una relación de 1 ml de medio fresco por cada 1.10^6 células. Se colecta el medio condicionado por estas células y utiliza en la máxima dilución que mantiene a las células indiferenciadas. Con el fin de evaluar que las células no se diferencian por la ausencia de LIF, se compara la morfología de las células cultivadas con la solución de LIF generada, con la de células cultivadas en presencia de LIF comercial (ThermoFisher) y como control negativo, con células cultivadas en ausencia de LIF durante al menos 96 hs.

Las células son cultivadas de rutina en placas, habitualmente de 6 pocillos (MW6) o en placas de 60 mm de diámetro (p60), según la cantidad de células necesarias. Cada pocillo es previamente tratado con una solución de gelatina de piel bovina 0.1% (Sigma) en PBS durante 10 min a 37 °C en la estufa de cultivo⁸¹. El pasaje de células se realiza cada 48 hs aproximadamente. Brevemente, se aspira el medio de cultivo, lava con PBS e incuba con tripsina (Gibco) para romper las uniones entre las células y entre las células y la placa, dentro de la estufa de cultivo por 3 min, luego se inactiva la tripsina con medio de propagación de células de MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblast*) conteniendo 10 % SFB y se centrifuga por 5 min a 196 g para remover los restos de tripsina. Las células se resuspenden en medio fresco y se plaquean en un nuevo pocillo o placa de la superficie adecuada, pretratada con gelatina.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en una estufa a 37°C y atmósfera de CO₂ de 5% v/v.

5.1.2 Protocolo de diferenciación

Para inducir la diferenciación no dirigida de las CME, se removió el medio de propagación, se lavó con PBS y se incubaron las células en medio de diferenciación, el cual presenta la misma composición que el medio de propagación pero no contiene LIF y 2i⁵⁷. Las células se mantuvieron en este medio de diferenciación por los periodos de tiempo detallados en cada caso.

5.1.3 Preparación de muestras para microscopía

Se recubrieron vidrios redondos de 18 mm de diámetro y espesor 0.16-0.19 mm (*Electron Microscopy Science*) con una solución 100 µg/ml de poli-D-lisina (PDL) (Merck) por 1 h a 37 °C y luego con una solución 20 µg/ml de laminina (Invitrogen) en PBS con CaCl₂ y MgCl₂ (sat) por 2 hs a 37 °C.

Se contaron las células en cámara de Neubauer y se sembraron ~70.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos con 800 µl de medio de propagación. 48 hs previas a los experimentos de microscopia confocal, se indujo la expresión de las proteínas de fusión YPet-TF adicionando 0.5 µg/ml (concentración final) de doxiciplina al medio de cultivo.

5.2 Transfecciones de plásmidos

Los plásmidos utilizados durante el transcurso de este trabajo son los siguientes:

- H2B-mCherry: vector de expresión de mCherry fusionado al extremo C-terminal de la histona H2B³⁵¹.
- HP1α-EGFP: vector de expresión de EGFP fusionado al extremo C-terminal de la proteína HP1α²⁸⁰.
- mem-mCherry: vector de expresión de mCherry fusionado a 2 secuencias de localización en membrana plasmática²⁸⁰.
- GFP-vimentina: vector de expresión de GFP fusionado al extremo N-terminal de la proteína vimentina³⁵².
- EMBT-3xGFP: vector de expresión de un tándem de GFP fusionado al dominio de unión a microtúbulos de la proteína ensconsina (MAP 7)³⁵³.
- EB3-GFP: vector de expresión de GFP fusionado al extremo C-terminal de la proteína EB3, que se une al extremo creciente de los microtúbulos³⁵⁴.
- EGFP-actina: vector de expresión de GFP fusionado al extremo N-terminal de actina³⁵⁵.

- GFP-vim(1-138): vector de expresión de GFP fusionado al extremo N-terminal de una proteína mutante dominante negativa de vimentina³⁵². Esta construcción sólo contiene la cabeza y el dominio alfa-helicoidal 1A de vimentina, esencial para el ensamblado de la red de vimentina. Estos péptidos miméticos son potentes disruptores de la red³⁵⁶.

Se plaquearon, el día previo a la transfección, ~70.000 células en cubreobjetos de 18 mm en placas de 12 pocillos pretratados como se describe en la Sección 5.1.3. En 2 tubos diferentes se colocaron 100 µl de Opti-MEM (Termo Fisher). A uno de los tubos se le agregó 1.6 µg de plásmido total y al otro, 4 µl de lipofectamina 2000 (Termofisher). En el caso de cotransfecciones, se agregó igual masa de ambos plásmidos (0,8 µg de cada uno). Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se mezcló el contenido de ambos tubos. Luego de 20 min, se agregó la mezcla de lipofectamina y DNA en opti-MEM, al pocillo que contiene a las células, en 800 µl de medio de propagación. Luego de 6 hs se reemplazó el medio conteniendo la mezcla de transfección por medio de propagación para disminuir la toxicidad del tratamiento. Las observaciones por microscopía fueron realizadas 48 hs luego de la transfección.

5.2.2 Transformación de bacterias para la preparación de plásmidos

Se transformaron, en esterilidad, bacterias *E. coli* ultracompetentes. En cuanto se descongelaron las bacterias en hielo, se tomaron 50 µl de la suspensión y se trasvasaron a un *ependorf* estéril. Luego, se agregó 1-2 µl del plásmido de interés, se incubó por 20 min en hielo y se sometió a la muestra a un shock térmico a 42°C por 90 s, luego del cual se enfrió rápidamente en baño de agua/hielo. Posteriormente, se agregaron 900 µl de LB (definido al final de esta sección) sin antibiótico e incubó por 30 min a 37°C. Se centrifugó 5 min a 400 g, se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en el medio remanente. Se plaqueó en una placa de Petri con LB-agar y el antibiótico correspondiente (ampicilina o kanamicina) y dejó crecer toda la noche a 37°C para la obtención de colonias aisladas.

Al día siguiente, se tomó con una punta de *tip* o con ansa estéril una colonia aislada para inocular 2 ml de LB líquido y estéril, con el antibiótico correspondiente. El cultivo se dejó crecer hasta la mañana siguiente a 37°C con agitación.

Al día siguiente, se verificó la turbidez del cultivo, ya que es un indicador del correcto crecimiento de las bacterias. Antes de continuar con la MidiPrep, se tomaron 500 µl del cultivo crecido en esterilidad y se le agregaron 500 µl de 30% glicerol para criopreservar a -80°C las bacterias ya transformadas, en 15 % glicerol.

El LB, contiene 0.5 % de extracto de levadura (Oxoid LP0021), 0.1 % de peptona (Oxoid LP0037) y 0.1 % de NaCl (Biopack CAS [7647-14-5]). En el caso de necesitar armar placas de Petri, se agregó 1.5 % de agar. Se esterilizó mediante autoclavado.

5.2.3 MidiPrep con extracción orgánica

Para la preparación de plásmidos para transfección, realizamos purificaciones a mediana escala a partir de 200 ml de cultivo LB con bacterias transformadas y el antibiótico correspondiente. Una vez crecido el cultivo, se centrifugó a 3200 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet de bacterias en 6 ml de “Solución I” (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA). Se agregó 6 ml de “Solución II” (1% SDS, 0.2M NaOH), mezcló por inversión suave e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 6 ml de “Solución III” (1.32 M Acetato de potasio, ácido acético glacial) a 4°C y mezcló por inversión rápida y enérgica; en este paso se forma un precipitado blanco. A continuación, se centrifugó por 15 min a 15500 g a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio filtrando con una gasa. Se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol, mezcló por inversión y centrifugó por 15 min a 15500 g. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en 1 ml de H₂O mq, se agregó 50 µg/ml RNAsa e incubó por 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se agregó un volumen de fenol/cloroformo (1:1) preparado en el momento bajo campana de extracción, se mezcló con ayuda de un vórtex y centrifugó por 90 s a 14000 g. Se recuperó la fase acuosa (superior), se agregó un volumen de cloroformo, mezcló y centrifugó a 14000 g por 90 s, repitiendo este paso dos veces para eliminar restos de fenol. Se recuperó la fase acuosa, agregó 0.1 volúmenes de una solución 3 M de acetato de sodio (pH = 5.2) y 0.6 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 14000 g por 15 min, descartó el sobrenadante e incubó por 2 min en un baño de agua/hielo. Finalmente, se lavó el pellet con 100 µl de 50 % etanol, con cuidado de no resuspenderlo, centrifugó 5 min a 14000 g, descartó el sobrenadante y resuspendió en 200 µl de H₂O mq.

Los plásmidos se analizaron mediante espectrofotometría (A_{260nm}/A_{280nm}) y electroforesis en gel de agarosa 0.8% para calcular la concentración obtenida y verificar su pureza e integridad, respectivamente.

5.2.4 Cuantificación de plásmidos

Se realizaron en diluciones 1/200 de los plásmidos en H₂O mq utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se realizó un blanco con H₂O mq y luego se registró la absorbancia de la muestra a 260 nm y 350 nm. La concentración de ADN se calculó como:

$$\text{Ecuación 5.1 } [\text{ADN}] = \frac{(\text{Abs } 260 \text{ nm} - \text{Abs } 350 \text{ nm})}{\epsilon * l}$$

donde l el camino óptico y $1/50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ el valor de ϵ , dado que una absorbancia de 1 ($\lambda = 260 \text{ nm}$) equivale a $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ de DNA doble cadena, usando una cubeta de 1 cm de camino óptico a pH neutro³⁵⁷.

5.3 Tratamientos con drogas que interfieren con la función del citoesqueleto

Con el fin de depolimerizar la red de microtúbulos, las células se incubaron en medio de propagación suplementado con $10 \text{ }\mu\text{M}$ de nocodazol durante 30 min en un baño de agua/hielo. Este compuesto se asocia β -tubulina e interfiere en la dinámica de los microtúbulos, provocando su depolimerización^{358,359}.

Con el fin de depolimerizar la red de actina, las células se incubaron con medio de propagación sin suero y $10 \text{ }\mu\text{M}$ latrunculina-B (Sigma Aldrich) durante 15 min a temperatura ambiente. Este compuesto se une a las subunidades de actina favoreciendo la forma depolimerizada³⁶⁰.

En todos los casos, las muestras de células tratadas fueron observadas por un período máximo de 20 min ya que la viabilidad celular se ve comprometida por los tratamientos.

5.4 Preparación de muestras para inmunofluorescencia (IF)

Se pretrataron vidrios redondos de 12 mm de diámetro con Geltrex (ThermoFisher) por 1 h a 37°C en la estufa de cultivo. En esos pocillos, se cultivaron las células W4, W4 YPet-OCT4 o W4 YPet-SOX2 por al menos 48 hs .

Los cubreobjetos fueron incubados con 4% PFA (paraformaldehído) durante 15 min a temperatura ambiente para fijar las células, y se lavaron con PBS por 5 min , repitiendo este paso tres veces para eliminar residuos de PFA. Luego, los cubreobjetos se incubaron con 0.1% PBS-Triton X-100 para permeabilizar las células, se lavaron 3 veces con 0.1% PBS-Tween (PBST) y se realizó el bloqueo con una solución 10% de suero de burro en 0.1% PBST por 30 min .

En el momento, se preparó la dilución del anticuerpo primario en solución de bloqueo, colocó sobre el cubreobjeto y dejó incubar toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Luego se lavaron las muestras 3 veces con PBST por 5 min . Se preparó la dilución del anticuerpo secundario en solución de bloqueo y colocó sobre los cubreobjetos por 1 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron lavados tres veces con 0.1% PBST y se montaron en un portaobjetos utilizando Mowiol Reagent (Calbiochem), preparado siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se dejaron secar durante 12 hs , protegiéndolas de la luz. Luego, se sellaron los bordes de los vidrios utilizando esmalte de uñas incoloro.

Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia de campo amplio Olympus IX71 con una cámara EXi Aque Bio-Imaging (Qimaging) y analizadas posteriormente con Image J ³⁶¹.

Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 5.1.

Nombre	Marca	Dilución
SOX2	Santa Cruz sc-17320	1:500
OCT4	Santa Cruz sc-5279	1:100
NANOG	Peptotech 500-P236	1:200
Anti-goat AlexaFluor 555	Invitrogen A21432	1:2000
Anti-mouse AlexaFluor 488	Invitrogen A21202	1:2000
Anti-rabbit AlexaFluor 488	Thermo Fisher A21206	1:2000

Tabla 5.1. Listados de anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

5.5 Microscopia Confocal

Los experimentos de FCS y la adquisición de imágenes 2D y 3D (z-stacks) se realizaron en dos microscopios confocales Olympus FV-1000, ambos con un objetivo de inmersión en aceite UPLSAPO 60X y apertura numérica 1.35.

Los fluoróforos utilizados, YPet o GFP y mCherry se excitaron con un láser de Argón multilínea a 488 nm y un láser He-Ne (543 nm), respectivamente. La luz de los láseres fue reflejada en la muestra con los siguientes espejos dicróicos: 405/408 o DM405/488/543/635 para experimentos de un color (YPet o GFP) o dos colores (YPet o GFP, y mCherry). Como los microscopios poseían diferencias en los rangos espectrales accesibles para la detección, en uno de los microscopios la emisión fluorescencia de los fluoróforos fue colectada en el rango de 505 a 605 nm para experimentos de un color o dividida en dos, en el rango de 505-525 nm y 585-675 nm para experimentos de dos colores. En el otro microscopio, la fluorescencia de los fluoróforos fue colectada en el rango 500-600 nm para experimentos de un color o dividida en dos, en el rango de 500-530 nm y 610-710 nm para experimentos de dos colores. Los fotomultiplicadores fueron configurados en modo conteo de fotones.

Las imágenes 2D fueron tomadas con un tamaño de 256x256 pixeles (tamaño de pixel de 82 nm) y a un tiempo de barrido de 20 μ s/pixel. Las imágenes 3D fueron adquiridas considerando secciones ópticas de 500 nm, barriendo aproximadamente 12-14 μ m en el eje óptico, el tamaño de pixel (x,y) fue de 200 nm.

En los experimentos de FCS, la potencia del láser de 488 nm fue de ~ 1 μ W. Para la adquisición de imágenes 2D utilizadas para el análisis de *foci*, la potencia fue de ~ 10 μ W. Las imágenes 3D fueron adquiridas con láseres a ~ 10 μ W (488 nm) y ~ 18 μ W (543 nm).

5.5.1 Realización y análisis de experimentos de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

Las mediciones de FCS en un punto fijo fueron realizadas con la configuración descrita previamente en células W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2. El láser fue enfocado en una posición dentro del núcleo celular seleccionada por el usuario/a y la intensidad de fluorescencia fue colectada a 50000 Hz, durante aproximadamente 3 min. Se realizó una sola determinación de FCS por célula para evitar realizar mediciones en células que ya pudieran haber sido fotodañadas.

Las trazas de intensidad fueron analizadas tal como se indica en la bibliografía^{362,363}. En particular, se calculó la función de autocorrelación (ACF) utilizando el programa SimFCS (LFD, Irvine, CA, Estados Unidos) con la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 5.2 } G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle}$$

donde G es la función de autocorrelación, F es la intensidad de fluorescencia en función del tiempo t, τ es el tiempo de correlación, $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ y los corchetes denotan el promedio.

La Figura 5.1 muestra un esquema simplificado de un microscopio confocal y el volumen de observación generado en la muestra. La entrada y salida de moléculas fluorescentes a dicho volumen genera fluctuaciones en la traza de intensidad en función del tiempo; moléculas más lentas resultan en fluctuaciones más duraderas en el tiempo. A partir de la traza de intensidad se obtiene la curva de autocorrelación.

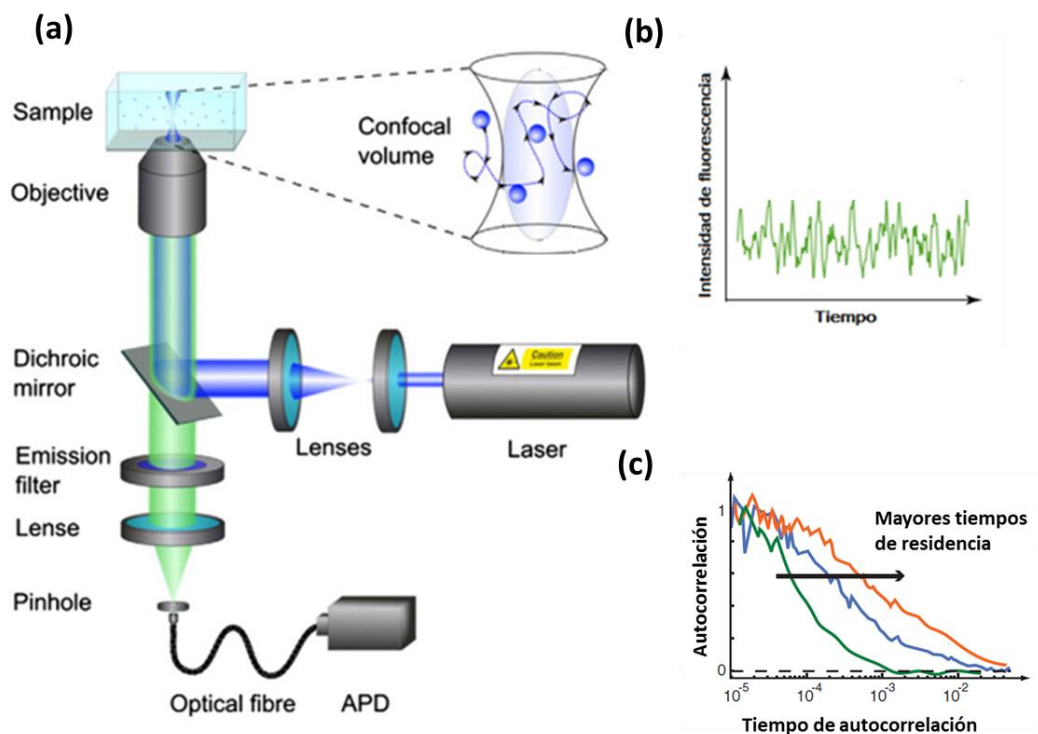


Figura 5.1. Bases de la técnica de FCS. Representación esquemática de la adquisición de datos de FCS en un microscopio confocal. El láser se enfoca en una región de la muestra creando un volumen confocal. Los círculos azules representan moléculas fluorescentes y las flechas, su movimiento **(a)**. Trazas de intensidad de fluorescencia **(b)**. Curvas de autocorrelación obtenidas a partir de las trazas de intensidad de fluorescencia. Las curvas desplazadas hacia la derecha, a mayores tiempos de autocorrelación, corresponden a moléculas con dinámicas más lentas **(c)**. Adaptado de ^{364–366}.

Las ACF experimentales se analizaron considerando un modelo en el cual las moléculas del TF pueden estar difundiendo libremente o unidas a dos poblaciones de sitios en la cromatina con distinta dinámica, denominados sitios lentos o rápidos, según la duración del tiempo de interacción TF-cromatina (Figura 5.2).

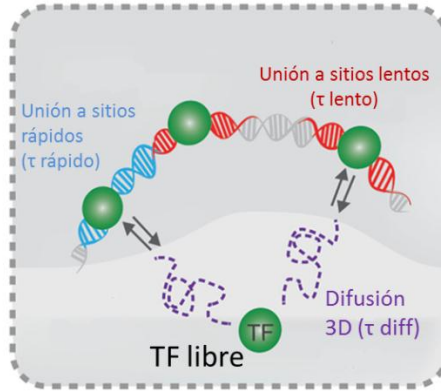


Figura 5.2. Esquema simplificado de la dinámica de TFs en el núcleo celular. Las moléculas de TF (verde) pueden difundir libremente (traza punteada violeta) o interactuar con la cromatina en los sitios rápidos (celeste) o lentos (rojo). Adaptado de de ³⁶⁷.

Considerando que los sitios de interacción se encuentran inmóviles en la escala temporal del experimento y que la cantidad de sitios ocupados es baja, se puede derivar la siguiente ecuación a partir del modelo propuesto ³⁶⁸:

Ecuación 5.3

$$G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[f_{\text{diff}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\omega^2 \tau_{\text{diff}}} \right)^{-1/2} + f_{\text{rápida}} e^{-\tau/\tau_{\text{rápida}}} + f_{\text{lenta}} e^{-\tau/\tau_{\text{lenta}}} \right]$$

donde N es el número medio de moléculas fluorescentes, f_{diff} es la fracción molar de moléculas que difunden libremente, τ_{diff} es el tiempo característico de difusión, ω es la relación entre las cinturas radial y axial del volumen de observación, $f_{\text{rápida}}$ y f_{lenta} son las fracciones molares de TF que presentan interacciones rápidas y lentas con la cromatina, respectivamente, y τ es el tiempo de correlación. $\tau_{\text{rápida}}$ y τ_{lenta} representan los tiempos medios de interacciones rápidas y lentas, y se definen como la inversa de la constante cinética de disociación ($1/k_{\text{off,rápida}}$ y $1/k_{\text{off,lenta}}$) correspondiente a cada una de las interacciones.

Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación 5.3; a modo de ejemplo, la Figura 5.3 muestra el ajuste de dicha ecuación a datos experimentales.

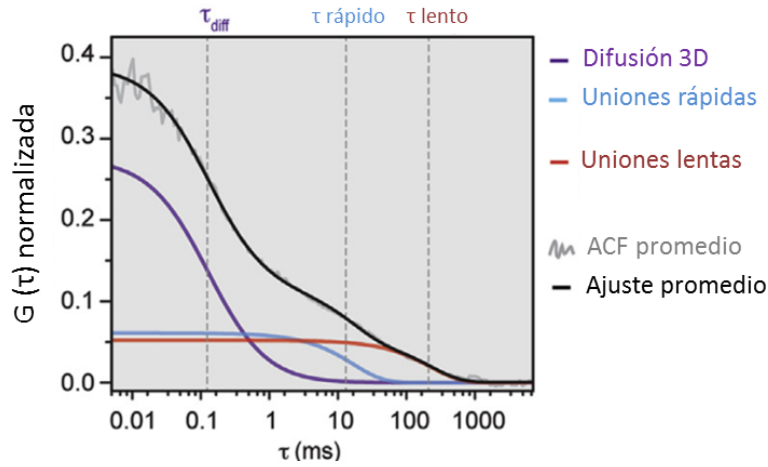


Figura 5.3. Función de autocorrelación para TFs difundiéndose e interactuando con sitios rápidos y lentos. Curva de autocorrelación promedio (línea gris), ajuste de la ecuación 5.3 (línea negra) y términos difusivo (violeta), de interacciones rápidas (celeste) y lentas (rojo). Tomado de ³⁶⁷.

Es importante destacar que este modelo reduce a dos poblaciones la gran variabilidad de afinidades esperadas en el contexto real para las interacciones TF-cromatina; sin embargo, constituye el modelo mínimo para describir la dinámica de TFs en experimentos de FCS ^{367–369}.

5.5.2 Estimación de concentraciones nucleares de TFs por FCS

Las concentraciones de YPet-SOX2 e YPet-OCT4 en el núcleo de células W4 YPet-SOX2 y YPet-OCT4, respectivamente, se estimaron a partir de las curvas de ACF obtenidas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 5.4 } \langle c \rangle = \frac{\gamma}{G_0 \cdot \text{Vol}_{\text{confocal}}}$$

Donde $\langle c \rangle$ es la concentración media de moléculas fluorescentes, G_0 es el valor de G extrapolado a $\tau \rightarrow 0$ y $\text{Vol}_{\text{confocal}} = \pi^{3/2} \omega_{x,y}^2 \omega_z / \sqrt{8}$ es el volumen de observación ^{370,371}.

5.5.3 Estimación temporal de la traslocación núcleo-citoplasma

Los experimentos fueron realizados en la línea W4 YPet-OCT4 expresando el marcador de membrana mem-mCherry. Previo al fotoblanqueo, se adquirió una imagen 3D de la muestra en las condiciones descritas en la sección 5.5 para localizar el espacio citoplasmático. Para

realizar el fotoblanqueo, se enfocó el láser de Argón (488 nm) a alta potencia (~ 250 μ W) durante 54 s en una posición del citoplasma. Finalmente, se colectó otra imagen 3D del mismo campo.

Las imágenes pre y post fotoblanqueo se analizaron como se describe más adelante (Sección 5.6.3), para obtener su reconstrucción tridimensional. La intensidad media de fondo se obtuvo a partir de una ROI 3D que no incluyese células y fue restada a todas las intensidades medias calculadas. Con el fin de cuantificar la intensidad de fluorescencia media del núcleo, antes y después del fotoblanqueo, se realizó una doble normalización utilizando núcleos no fotoblanqueados del campo del z-stack como referencia.

$$\text{Ecuación 5.5 Intensidad doble normalizada} = \frac{\overline{I_{\text{ref, pre}}}}{\overline{I_{\text{ref, post}}}} * \frac{\overline{I_{\text{fotob, post}}}}{\overline{I_{\text{fotob, pre}}}}$$

donde $I_{\text{ref, pre}}$ e $I_{\text{ref, post}}$ corresponden a la intensidad de fluorescencia media en las células de referencia, mientras que $I_{\text{fotob, pre}}$ e $I_{\text{fotob, post}}$ corresponden a la intensidad de fluorescencia media del núcleo de la célula foto blanqueada pre- y post- fotoblanqueo .

5.6 Análisis de imágenes

5.6.1 Análisis cuantitativo de foci

Estos análisis se realizaron en imágenes 2D adquiridas en las condiciones descritas en la sección 5.5 utilizando las líneas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2.

Se generaron máscaras del núcleo a partir de las imágenes utilizando Image J ³⁶¹, excluyendo a los nucléolos, ya que ni los TFs ni las histonas fluorescentes forman parte de estas estructuras. Utilizando las máscaras, se cuantificó el área nuclear, la intensidad media del núcleo ($\bar{I}$) y su desvío estándar (DE). Con estos últimos dos valores se calculó el coeficiente de variación (CV) según:

$$\text{Ecuación 5.6 } CV = \frac{\bar{I}}{DE}$$

Se consideró una estructura como un *focus* si su radio es mayor al esperado de acuerdo a límite de la resolución óptica (> 164 nm) y su intensidad es mayor a la calculada por la ecuación 5.7:

$$\text{Ecuación 5.7 } I_{\text{foci}} > \bar{I} + 2 * DE$$

El área relativa de los *foci* respecto al núcleo se calculó según:

$$\text{Ecuación 5.8 } \text{Área relativa} = \frac{\sum \text{área foci}}{\text{área nuclear}} * 100$$

El número de *foci*, área relativa e intensidad relativa de los *foci* respecto a la del núcleo, se calcularon con el *plugin* "Analyze Particles" de Image J ³⁶¹.

5.6.2 Cuantificación del cociente de partición empírico de TFs entre núcleo-citoplasma

Se adquirieron imágenes de células W4 YPet-OCT4 expresando el marcador de membrana mem-mCherry, este último nos permitió visualizar los límites del citoplasma, mientras que YPet-OCT4, nos permitió identificar los límites del núcleo.

Las imágenes se procesaron con Image J ³⁶¹, primero se segmentaron las imágenes correspondientes al núcleo, excluyendo nucléolos. Para poder segmentar el citoplasma, se utilizó la imagen del marcador de membrana, donde se delimitó toda la célula y luego se le restó la máscara del núcleo, incluyendo nucléolos (Figura 5.4).

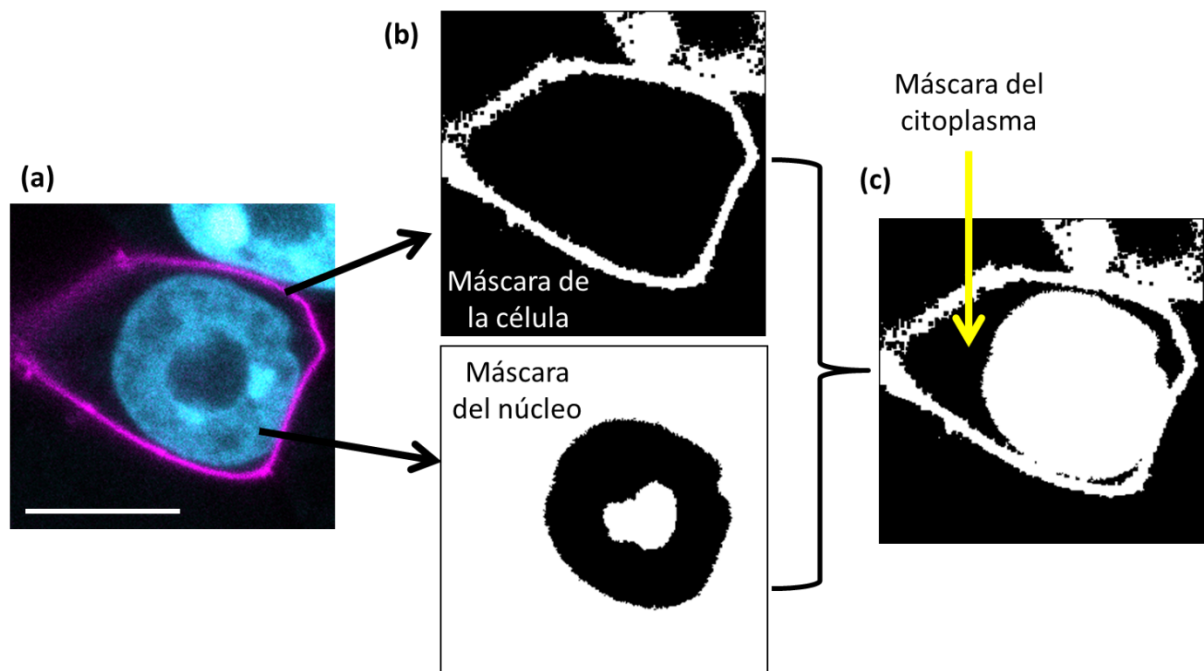


Figura 5.4. Segmentación del núcleo y citoplasma. Imagen confocal representativa de una célula W4 YPet-OCT4 (cian) transfectada con mem-mCherry (magenta) (a). Máscara binarizada de los límites de la célula (b, arriba) y del núcleo sin nucléolos (b, abajo). Máscara del citoplasma (c). Barra de escala, 10 μm .

Una vez segmentado el núcleo y el citoplasma, se calculó la intensidad de fluorescencia media en cada compartimento. A ambos valores se les restó la intensidad de fluorescencia del fondo, calculada delimitando una ROI de la imagen donde no hubiera células.

Para la cuantificación del coeficiente de partición empírico (Kp^*), se ajustó una ecuación lineal a los datos de intensidad de fluorescencia media del núcleo en función de la intensidad de fluorescencia media del citoplasma.

5.6.3 Análisis de imágenes 3D

Los experimentos en los que estudiamos la estructura tridimensional de las redes del citoesqueleto en células vivas, fueron realizados en la línea parental W4 y en la línea W4 YPet-OCT4, aquellos experimentos de fotoblanqueo de OCT4 (Sección 5.5.3), fueron realizados en la línea W4 YPet-OCT4. En ambos casos, se obtuvieron z-stacks con la configuración del microscopio que se describe en la sección 5.5 y se reconstruyeron las imágenes tridimensionales con los programas Image J³⁶¹ e IMARIS (Oxford Instruments).

Como paso inicial, las imágenes fueron procesadas en Image J³⁶¹ y se les aplicó el filtro ROF³⁷² ($\theta = 5$) para reducir el ruido, preservando los bordes de las estructuras. Dichas imágenes fueron analizadas posteriormente con el programa IMARIS, que permite la reconstrucción tridimensional de los z-stacks. Con el algoritmo *Surfaces* se segmentaron los núcleos celulares y/o las redes del citoesqueleto, según cada experimento. Se utilizó el *threshold* calculado automáticamente y la función *Split seeds* con un tamaño de 8 μm para facilitar la detección y segmentación individual de núcleos cercanos, como se muestra en la Figura 5.5. Cuando esto no fue posible, se utilizó la herramienta *cut* para dividir segmentaciones pobremente resueltas por el algoritmo.

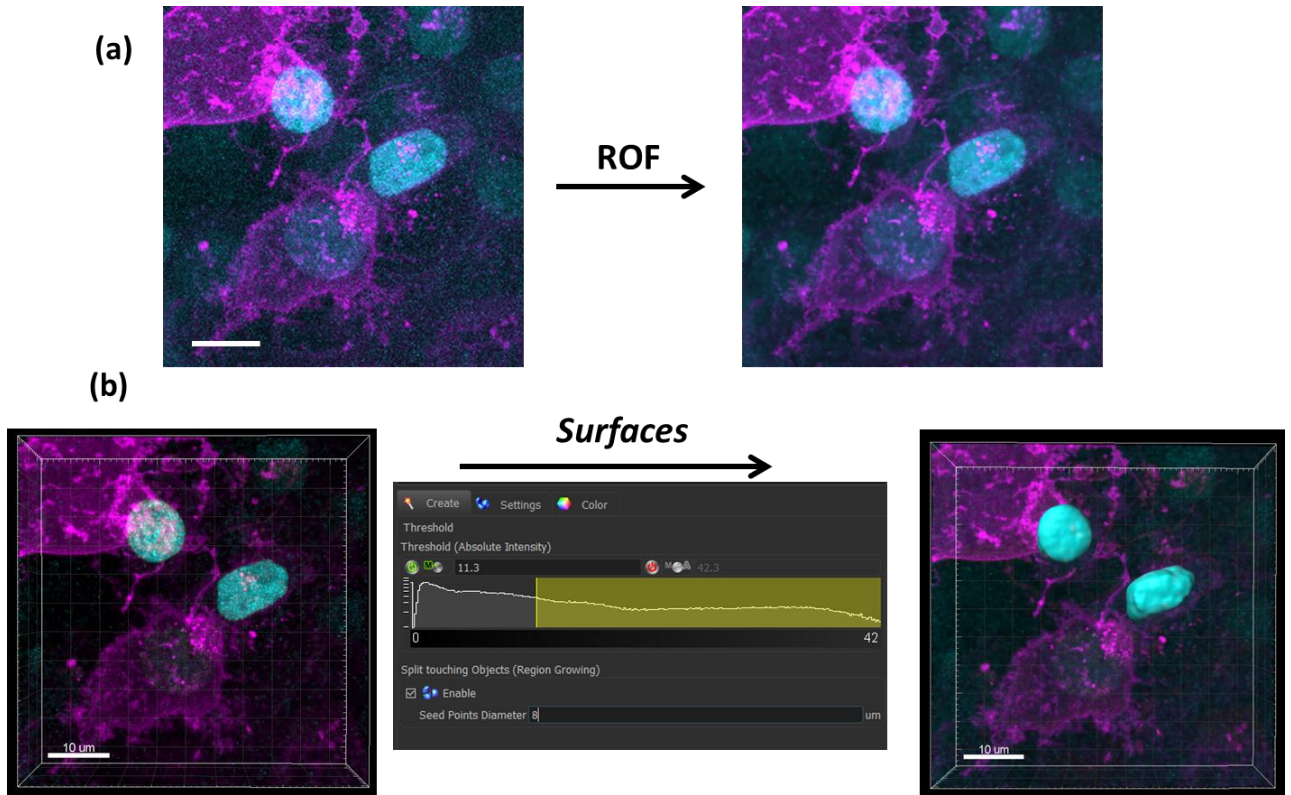


Figura 5.5. Flujo de trabajo para la reconstrucción 3D de imágenes a partir de z-stacks. Utilizando Image J, se aplica el filtro ROF a las imágenes (a), posteriormente se las importa en IMARIS, donde mediante el algoritmo *Surfaces*, se reconstruyen tridimensionalmente los z-stacks y se segmentan las estructuras de interés. Se muestra el umbral de intensidad, calculado automáticamente por el algoritmo, y la función *split seeds* (b). En cian los núcleos, en violeta la membrana plasmática. Barras de escala, 10 μm.

El *software* IMARIS cuantifica automáticamente parámetros como el número de segmentos desconectados entre sí, volumen, esfericidad, posición en la imagen y la intensidad media de cada estructura segmentada.

La esfericidad de una partícula se calcula como el cociente entre la superficie de una esfera (del mismo volumen que la partícula) y la superficie de la partícula³⁷³, dada por la Ecuación 5.9:

$$\text{Ecuación 5.9 Esfericidad} = \frac{\pi^{\frac{1}{3}}(6 * \text{Volumen}_{\text{partícula}})^{\frac{2}{3}}}{\text{Superficie}_{\text{partícula}}}$$

5.6.4 Mapa de flujo de cometas de EB3-GFP

Para analizar las trayectorias de los cometas de EB3, se analizaron las imágenes utilizando el filtro “Despeckle” del *software* Image J ³⁶¹. Las trayectorias de los cometas de EB3 fueron obtenidas con el *plugin* “Trackmate” ³⁷⁴ y los datos fueron exportados a *Icy* para obtener el mapa de flujo ³⁷⁵.

5.7 Análisis Estadísticos

Los resultados experimentales se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas independientes. El número de datos analizados para cada condición en cada experimento fue de ~ 100 , salvo que se indique lo contrario.

La significancia estadística entre grupos se analizó utilizando Modelos Lineales Mixtos, acompañado por comparación de medias utilizando el test de Tukey o Dunnet, según se quiera comparar entre todos los tratamientos o solo respecto al control. En todos los casos, se analizó la normalidad de los datos y la distribución de los residuos mediante los test de Shapiro-Wilks y Levene, junto a sus visualizaciones gráficas, QQ-Plot y Gráfico de Residuos, respectivamente. De no cumplirse el supuesto de homocedasticidad, se modeló la varianza de los datos. En aquellos casos donde no podía asumirse la normalidad y homocedasticidad, se utilizó el test no-paramétrico de Wilcoxon donde no se hacen suposiciones sobre la distribución de los datos. Para los cálculos de diferencia entre proporciones se utilizó el test de Marascuilo ³⁷⁶. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias donde el p-valor obtenido fue < 0.01 o 0.05 según se indique.

Todos los análisis estadísticos fueron analizados con *R Studio*, con *scripts* generados en el laboratorio utilizando los paquetes *glm*, *gls*, *car*, *nlme*, *multcomp*, *emmeans*. Para modelar la varianza de los datos, dentro del paquete *glm* se usaron las opciones *weights = varPower()* y *weights = varExp()*.

Capítulo 6: Distribución nuclear de los factores de transcripción de pluripotencia OCT4 y SOX2

6.1 Introducción

Históricamente, en el campo de estudio de las CMP, los niveles de expresión se utilizaban como único aspecto de los TFs para determinar el estado de pluripotencia y la diferenciación³⁷⁷. Sin embargo, en el Capítulo 2 mencionamos que la regulación de la expresión génica es un proceso complejo con múltiples niveles de control en distintas escalas espaciales y temporales³⁷⁸.

Para comprender en profundidad la función de los TFs pluripotencia, y dilucidar cómo éstos modulan los programas transcripcionales, es entonces necesario considerar otras características además de sus niveles de expresión.

Hemos mencionado también (Capítulo 1, Sección 1.6) que la expresión de NANOG disminuye rápidamente durante la transición del estadio *naïve* al *primed* mientras que los niveles de expresión de OCT4 y SOX2 permanecen constantes en este período, tanto en el embrión como en células en cultivo⁵⁷.

En el Capítulo 2 hemos descrito la compartimentalización nuclear, focalizado nuestra atención en condensados transcripcionales^{129,130,138} (Sección 2.4) y mencionado reportes previos que sugieren que ciertos TFs de pluripotencia forman parte de estas organelas sin membrana (Sección 2.5). Aunque la funcionalidad de los condensados transcripcionales continúa en discusión (Sección 2.4), hipotetizamos que los condensados donde se concentran TFs de pluripotencia pueden aportar otro nivel de regulación transcripcional y, en última estancia, modular la pluripotencia.

En ese contexto, decidimos estudiar la distribución nuclear de los TFs de pluripotencia OCT4 y SOX2, y analizar si la misma se modifica ante señales de diferenciación. Para esto, utilizamos técnicas de microscopía confocal en células vivas, para lo cual se requiere de un sistema que exprese la proteína en estudio fusionada a una proteína fluorescente, como describiremos a continuación.

6.2 Propiedades de las líneas celulares W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2

Como punto de partida en este estudio, decidimos generar líneas estables de CME que expresen niveles moderados de los TFs en estudio fusionados a proteínas fluorescentes. Las líneas estables presentan varias ventajas fundamentales para el éxito de este trabajo en comparación a la expresión transitoria lograda con transfecciones de plásmidos. En particular, las transfecciones transitorias pueden provocar la sobre-expresión de proteínas generando alteraciones en el estado de pluripotencia de las células, los niveles de expresión varían mucho entre las células transfectadas³⁷⁹ pudiendo ser afectado el estado pluripotente y, finalmente, la eficiencia de transfección en líneas de CME es generalmente baja de acuerdo a nuestra experiencia.

Por estos motivos, nuestro grupo de trabajo y, en particular la Dra. Camila Vázquez Echegaray, generó, a partir de la línea W4 de células madre embrionarias de ratón, líneas celulares que expresen OCT4 o SOX2 fusionados a la proteína fluorescente YPet bajo un promotor inducible por doxiciclina (Dox). Las construcciones de TF-YPet inducibles por Dox fueron donadas por David M. Suter quien ha demostrado que los TF-YPet son completamente funcionales (tienen un perfil de unión al genoma similar al de los TFs endógenos, evaluado mediante ChIP-seq) y que cada TF-YPet puede rescatar la pluripotencia y el fenotipo de CME a las que se les indujo el *knockout* del TF endógeno correspondiente, evaluado mediante análisis de complementación⁷⁵.

En esta sección describiremos brevemente las determinaciones más relevantes para caracterizar las líneas celulares generadas.

La Figura 6.1 muestra la cuantificación por inmunofluorescencia de los niveles de OCT4 y SOX2 en la línea parental y en las líneas generadas, denominadas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2, respectivamente. Estas observaciones sugieren que las células presentan niveles de expresión homogéneos de los TFs y similares a los de la línea parental.

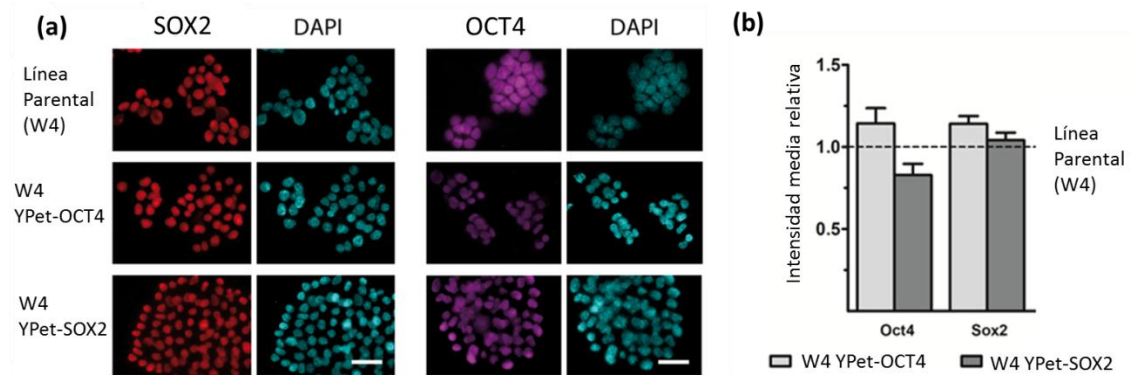


Figura 6.1. Validación de las líneas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de los marcadores de pluripotencia SOX2 y OCT4 en la línea celular parental W4 en comparación a las líneas W4 OCT4-YPet y W4 SOX2-YPet, cultivadas en medio de propagación en condiciones basales (sin doxiciclina). Los núcleos fueron marcados con DAPI. Barras de escala, 30 μ m **(a)**. Cuantificación de la inmunofluorescencia para OCT4 y SOX2 en las líneas W4 OCT4-YPet y W4 SOX2-YPet en comparación a la línea parental (línea punteada). Las barras representan la intensidad de fluorescencia media $\pm$ error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre las líneas W4 OCT4-YPet o W4 SOX2-YPet y la línea parental. El número de células analizadas para cada condición (inmunofluorescencia en células W4 OCT4-YPet y W4 SOX2-YPet) fue de 100-200 **(b)**. Adaptado de ³⁸⁰.

La Figura 6.2 muestra imágenes de microscopía de campo amplio de las líneas generadas en función de la concentración de Dox y del tiempo de inducción. Analizamos la intensidad promedio del campo en cada condición y, a partir de estos resultados, seleccionamos como condiciones de inducción una concentración de Dox de 5 μ g/ml y un tiempo de inducción de 48 hs. En estas condiciones, se logran niveles de expresión moderados y similares entre células de una misma o varias colonias, la intensidad del YPet-TF es también similar y la intensidad de fluorescencia es suficientemente alta para su correcta cuantificación.

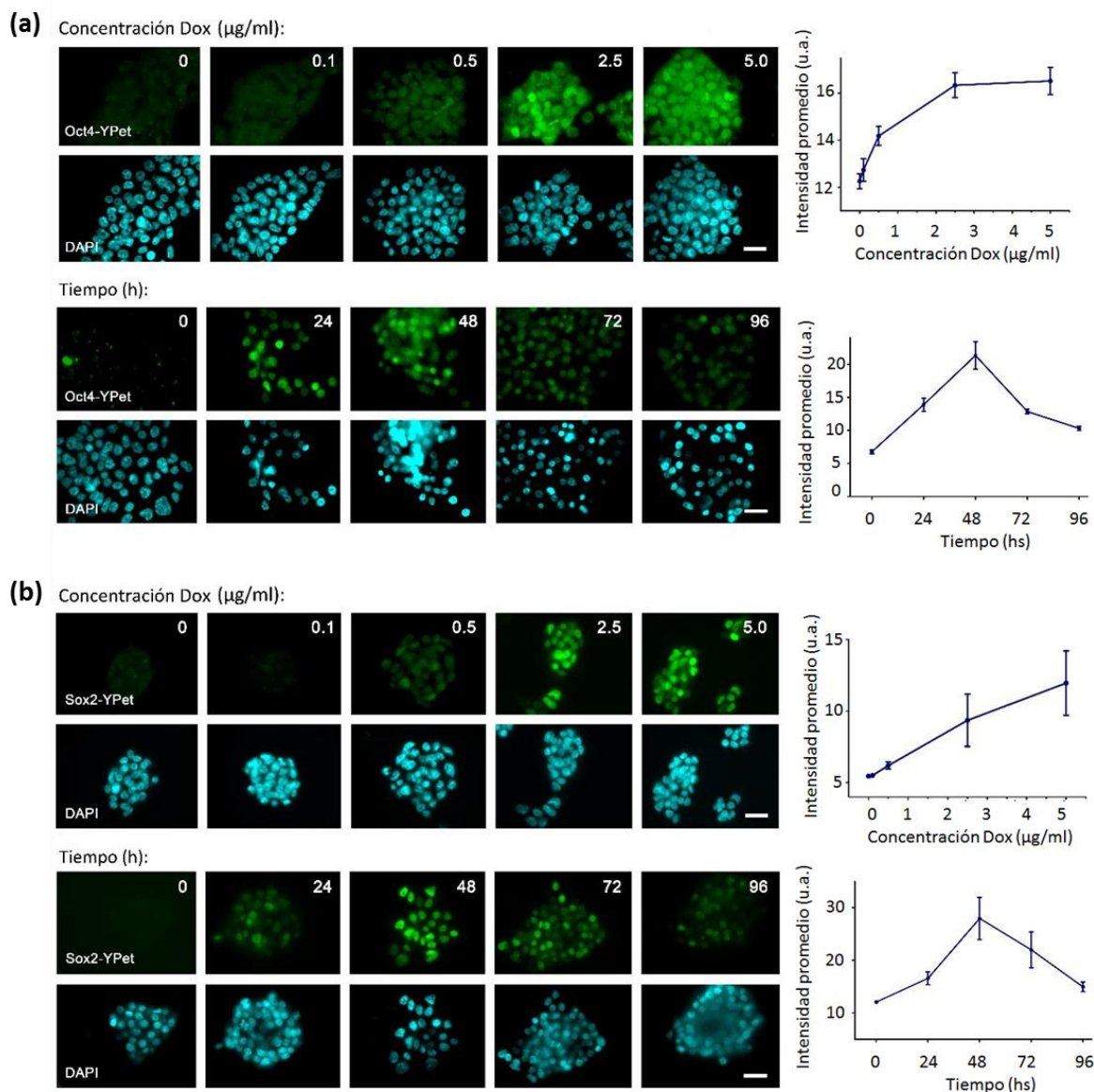


Figura 6.2. Optimización del protocolo de inducción con doxiciclina en las líneas generadas. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de células W4 YPet-OCT4 **(a)** y W4 YPet-SOX2 **(b)** luego de la inducción durante 48 hs con diferentes concentraciones de Dox (paneles superiores) o a diferentes tiempos de incubación (paneles inferiores), utilizando 5 $\mu\text{g/ml}$ de Dox. Barras de escala, 20 μm . Adaptado de ³⁸⁰.

Además, cuantificamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión de Oct4 y Sox2 en las líneas generadas en condiciones de inducción y no detectamos diferencias significativas al comparar cada línea respecto a su condición sin inducir (Figura 6.3) sugiriendo que los niveles de expresión de TF-YPet no son elevados.

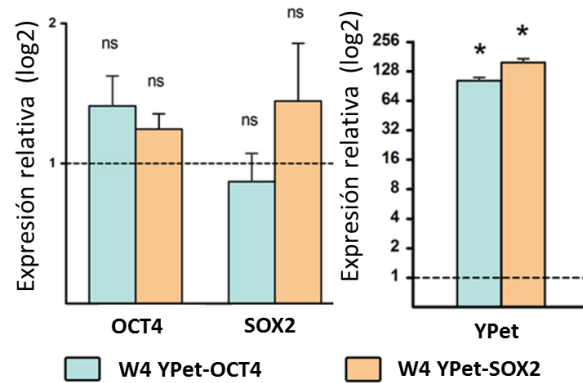


Figura 6.3. Validación de las líneas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2. Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de expresión de OCT4 y SOX2 en las líneas celulares (W4 YPet-OCT4 o W4 YPet-SOX2) cultivadas en medio de propagación suplementado con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxicilina. Los resultados se presentan como la media $\pm$ error estándar en escala log2. Los datos fueron relativizados a la condición basal (sin Dox, línea punteada). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de Oct4 y Sox2 entre las líneas celulares inducidas o no inducidas, a excepción del transgén de la proteína de fusión TF-YPet (panel derecho). Los asteriscos denotan diferencias significativas con $p < 0.01$ y ns, no significativas. Adaptado de ³⁸⁰.

Cuantificamos los niveles proteicos de YPet-OCT4 y de OCT4 endógeno, mediante Western Blot de lisados celulares y observamos que la proteína de fusión YPet-OCT4 representa una pequeña proporción del TF total, el cual fue similar al obtenido en la condición sin inducir. Utilizando Western Blot determinamos también que los niveles de SOX2 endógenos no se modifican respecto a la condición sin inducir, pero debido a la imposibilidad de detectar una banda específica para YPet-SOX2 (especulamos que la fusión a YPet afectó la exposición de la región reconocida por los anticuerpos de SOX2), cuantificamos su concentración en el núcleo utilizando FCS (Sección 5.5.2, Ecuación 5.4), obteniendo un valor de $0.63 \pm 0.03 \mu\text{M}$; este valor es similar a la concentración de TF endógena reportada previamente ($\sim 0.73 \mu\text{M}$) ³⁸¹. Estos resultados sugieren que los niveles totales de los TFs de pluripotencia no se ven significativamente incrementados en las líneas generadas.

6.3 Distribución nuclear de OCT4 y SOX2

Con el fin de caracterizar la distribución nuclear de los TFs en CME en estado indiferenciado, adquirimos imágenes de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2 cultivadas en medio de propagación, el cual contiene LIF y los inhibidores 2i (Sección 5.1). Hemos mencionado en el Capítulo 1 (Sección 1.6) que estas condiciones de cultivo (LIF+2i)

mantienen a las células en su estado pluripotente *naïve*, similar al del embrión pre-implantatorio^{22,382}.

La Figura 6.4 muestra imágenes representativas de las células; observamos que ambos TFs se distribuyen entre el nucleoplasma y algunos dominios con mayor intensidad que denominaremos *foci* o condensados. En este sentido, hemos mencionado en el Capítulo 2 (Sección 2.5) que OCT4 formaría condensados líquidos con MED1 en CME¹⁷⁶ y que SOX2 forma condensados *in vitro*³⁸³.

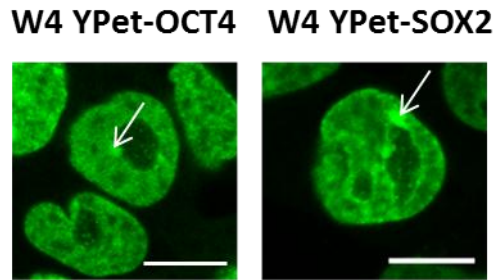


Figura 6.4. Imágenes representativas de microscopía confocal de células de las líneas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2 inducidas con Dox. Las flechas blancas apuntan a un *focus* de cada TF. Barras de escala, 10 μ m.

6.4 Los *foci* de OCT4 y SOX2 colocalizan con regiones de alta compactación de cromatina

Dado que la formación de condensados nucleares está relacionada con la organización y función de la cromatina³⁸⁴ y que dichos condensados pueden favorecer o reprimir la transcripción¹⁴⁵, decidimos analizar si existe alguna correlación entre los *foci* de TFs de pluripotencia y la distribución global de la cromatina.

Con este objetivo, analizamos la organización general de la cromatina de manera simultánea con los *foci* de OCT4 y SOX2, transfectando las líneas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2 con un plásmido que codifica para la proteína de fusión H2B-mCherry. H2B es una histona del *core* de histonas, y su distribución provee información de la compactación relativa de la cromatina en células vivas^{385,386}.

Adquirimos imágenes confocales de las células transfectadas y analizamos la distribución de intensidad de fluorescencia de ambas proteínas de fusión (H2B-mCherry y el correspondiente YPet-TF). La Figura 6.5 muestra que los *foci* de OCT4 y SOX2 colocalizan con *foci* de H2B-mCherry; llamativamente, observamos que no todos los *foci* de H2B-mCherry colocalizan con los de TFs. Estos resultados sugieren que la compactación local de la cromatina estaría involucrada en la formación de los *foci* de TFs pero no sería el único factor determinante,

ya que no todas las regiones de alta densidad local de cromatina se encuentran asociadas con *foci* de TFs.

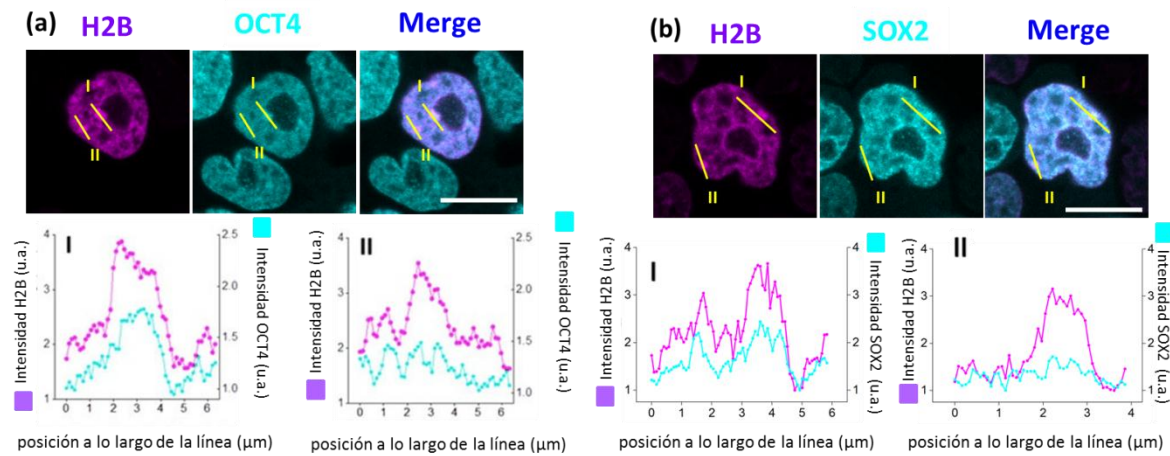


Figura 6.5. Los *foci* de TFs colocalizan con zonas de alta densidad de H2B-mCherry. Imágenes representativas de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 **(a)** y W4 YPet-SOX2 **(b)** transfectadas con H2B-mCherry. A modo de ejemplos, el perfil de intensidad a lo largo de las líneas I muestra un *focus* de H2B-mCherry colocalizando con un *focus* de OCT4 **(a)** o SOX2 **(b)** mientras que el perfil de intensidad a lo largo de las líneas II muestra un *focus* de H2B-mCherry que no colocaliza con un *focus* de OCT4 **(a)** o SOX **(b)**. Barras de escala, 10 μm. Adaptado de ³⁸⁰.

Para complementar el análisis, decidimos estudiar si las regiones de alta densidad de H2B-mCherry en CME corresponden a heterocromatina. Para ello, analizamos la distribución de una proteína que está comúnmente asociada a heterocromatina silenciada esto es, HP1α ³⁸⁷. Con este objetivo, cotransfectamos la línea parental W4 con plásmidos que codifican para H2B-mCherry y para la proteína de fusión HP1α-EGFP y estudiamos la distribución de ambas proteínas de fusión en células vivas.

La Figura 6.6 muestra que las regiones de alta intensidad de H2B-mCherry colocalizan con aquellas de HP1α-EGFP, indicando que estas regiones probablemente corresponden a heterocromatina.

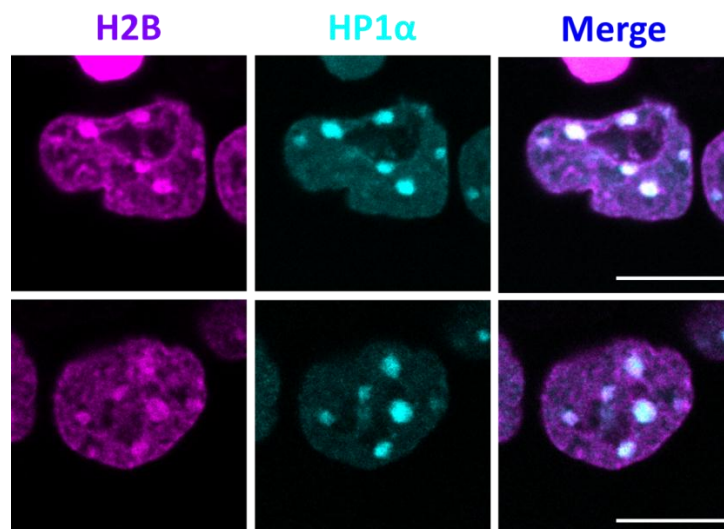


Figura 6.6. Imágenes representativas de microscopía confocal de la línea W4 cotransfectada con H2B-mCherry y HP1α-EGFP. Los *foci* de H2B-mCherry colocalizan con los de HP1α-EGFP. Barras de escala, 10 μ m. Adaptado de ³⁸⁰.

6.5 Reorganización nuclear de TFs de pluripotencia durante el proceso de diferenciación celular

Para estudiar los cambios que ocurren en la organización espacial de OCT4 y SOX2 durante los primeros momentos del proceso diferenciación, utilizamos un protocolo de diferenciación no dirigido que consiste en la remoción de LIF+2i del medio de cultivo. Como mencionamos en Capítulo 1 (Sección 1.6), este tratamiento promueve que las células comiencen a salir del estado de pluripotencia *naïve* y, de ser mantenidas en estas condiciones, se diferencian luego de varios días (> 7 días) dando lugar a una población heterogénea de células con diferentes tipos celulares representantes de las tres capas germinales y que pueden ser identificados mediante el análisis de la expresión de genes marcadores ^{90,91,388,389}. Estos protocolos no dirigidos son muy usados para estudiar las primeras etapas de la diferenciación, que son comunes para los diferentes destinos celulares. En este sentido, el protocolo seleccionado nos permite estudiar la salida de la pluripotencia *naïve* en una ventana temporal que precede a la aparición de marcadores específicos de linajes.

Como punto de partida, sometimos a la línea parental W4 a este protocolo de diferenciación no dirigida y verificamos que, en la ventana temporal elegida (< 48 hs), los niveles de expresión de OCT4 y SOX2 se mantienen constantes mientras que los de NANOG disminuyen (Figura 6.7), como se ha reportado previamente ⁵⁷.

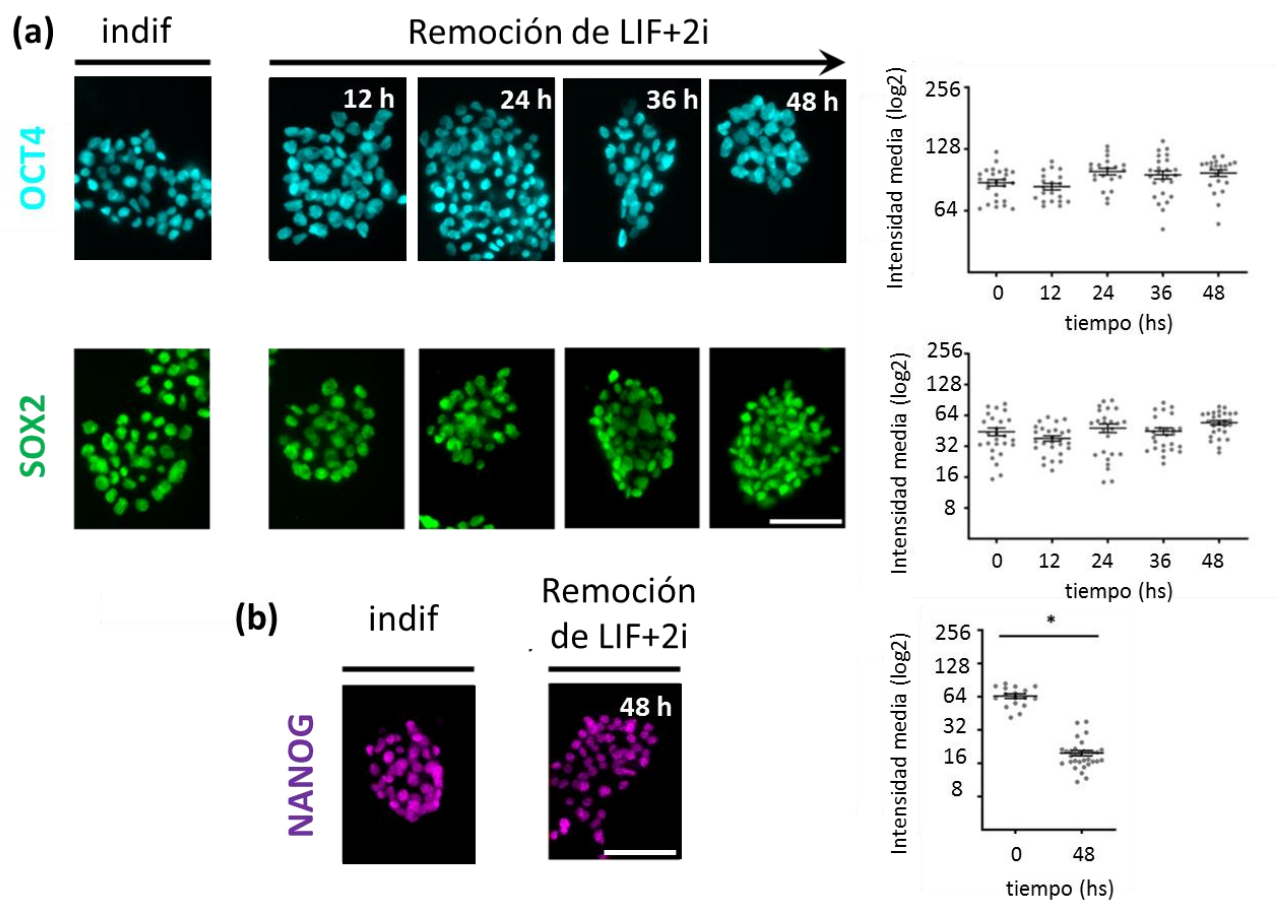


Figura 6.7. Los niveles de expresión de OCT4 y SOX2 se mantienen constantes mientras que los de NANOG disminuyen en la línea parental W4, durante las primeras 48 hs de inducida la diferenciación. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para OCT4, SOX2 (a) y NANOG (b) en células indiferenciadas o a diferentes tiempos luego de haber inducido la diferenciación. Barra de escala, 60 μ m. Los gráficos de puntos representan la intensidad de fluorescencia media (escala log2) $\pm$ error estándar. Cada punto corresponde a al campo de una imagen. No se encontraron diferencias significativas mediante el test de ANOVA y comparación por Tuckey para OCT4 y SOX2. El asterisco representa diferencias significativas. Adaptado de ³⁸⁰.

Posteriormente, adquirimos imágenes de microscopía confocal de las líneas celulares que expresan OCT4 y SOX2 fusionados a YPet en función del tiempo de inducida la diferenciación. La Figura 6.8 muestra imágenes representativas de células W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2 indiferenciadas o a distintos tiempos de haber inducido la diferenciación.

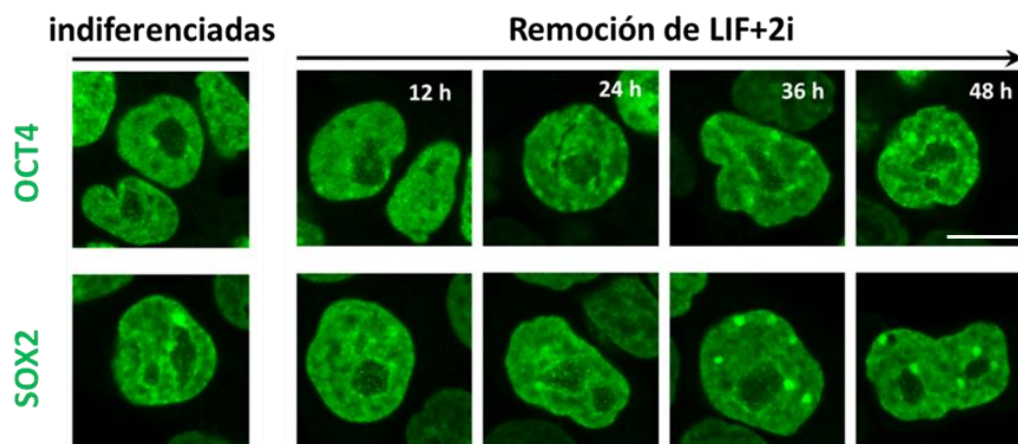


Figura 6.8. Reorganización de los TFs OCT4 y SOX2 al comienzo de la diferenciación celular. Imágenes representativas de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 **(a)** y W4 YPet-SOX2 **(b)** en función del tiempo cultivadas con medio de diferenciación (- LIF+2i). Barra de escala, 10 μ m. El número de células analizadas para cada condición fue entre 60-140 (OCT4) o 70-140 (SOX2). Adaptado de ³⁸⁰.

Para estudiar cuantitativamente la organización nuclear de estas proteínas en función del tiempo de inducción de la diferenciación, utilizamos tres parámetros diferentes. En particular, analizamos el coeficiente de variación (CV), que ha sido ampliamente utilizado en la literatura para describir la distribución general de proteínas nucleares ^{390,391}, el número de *foci* por núcleo y la intensidad relativa de los *foci* respecto a la intensidad nuclear; estos parámetros fueron cuantificados de acuerdo a los procedimientos descritos en el Capítulo 5 (Sección 5.6.1).

La Figura 6.9 muestra los valores obtenidos para los parámetros en función del tiempo de diferenciación.

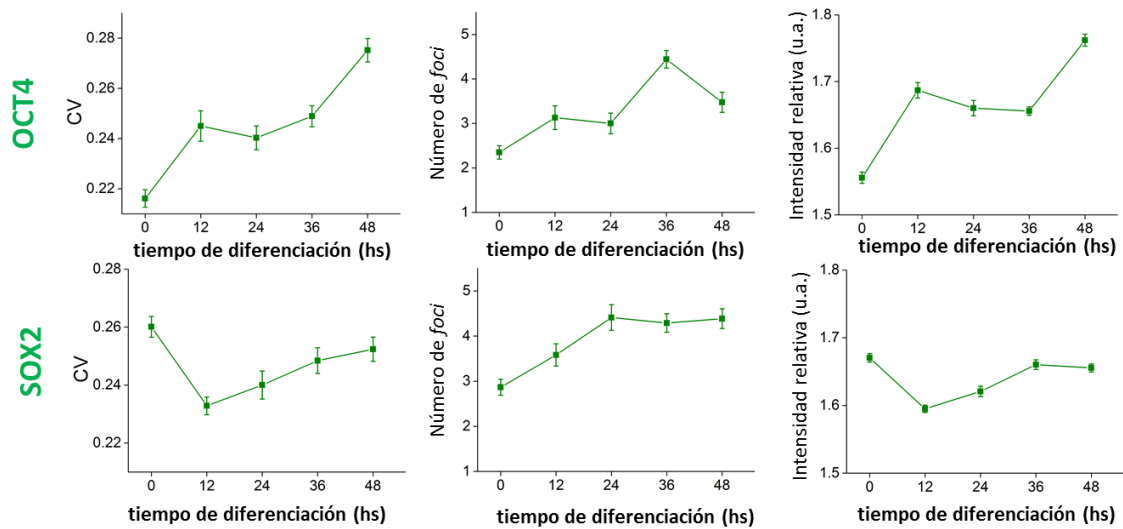


Figura 6.9. OCT4 y SOX2 se reorganizan al comienzo de la diferenciación celular. La distribución nuclear de estas proteínas fue analizada cuantitativamente como se describe en el Capítulo 5 (Sección 5.6.1) para obtener el coeficiente de variación (CV), el número de *foci* y la intensidad relativa de los *foci* para OCT4 y SOX2. El número de células analizadas para cada condición fue entre 60-140 (OCT4) o 70-140 (SOX2). Los resultados se presentan como la media $\pm$ el error estándar. Adaptado de ³⁸⁰.

La Figura 6.9 muestra que el valor de CV, el número y la intensidad relativa de los *foci* de OCT4 aumentan con el tiempo de diferenciación, sugiriendo que este proceso promueve la formación de *foci* de dicho TF.

Por otra parte, la variación de dichos parámetros con el tiempo es distinta para el caso de SOX2. Al comienzo de la diferenciación, se observa una disminución del CV y la intensidad relativa de los *foci*, mientras el número de *foci* aumenta, sugiriendo que este TF se redistribuye desde unos pocos *foci* brillantes a un mayor número de *foci* de menor brillo, es decir, formados por una menor cantidad relativa de moléculas de YPet-SOX2. Luego de las primeras 24 hs, el número de *foci* se estabiliza mientras que el CV y la intensidad relativa aumentan.

Dado que en la sección 6.3 observamos que los *foci* de TFs colocalizan con regiones de alta compactación de la cromatina, estudiamos si la distribución de H2B cambia en la ventana temporal de diferenciación estudiada.

La Figura 6.10 muestra imágenes representativas de microscopía confocal de células transfectadas con el vector que codifica para H2B-mCherry (panel superior) y la cuantificación de su distribución (CV, número de *foci* e intensidad relativa, panel inferior).

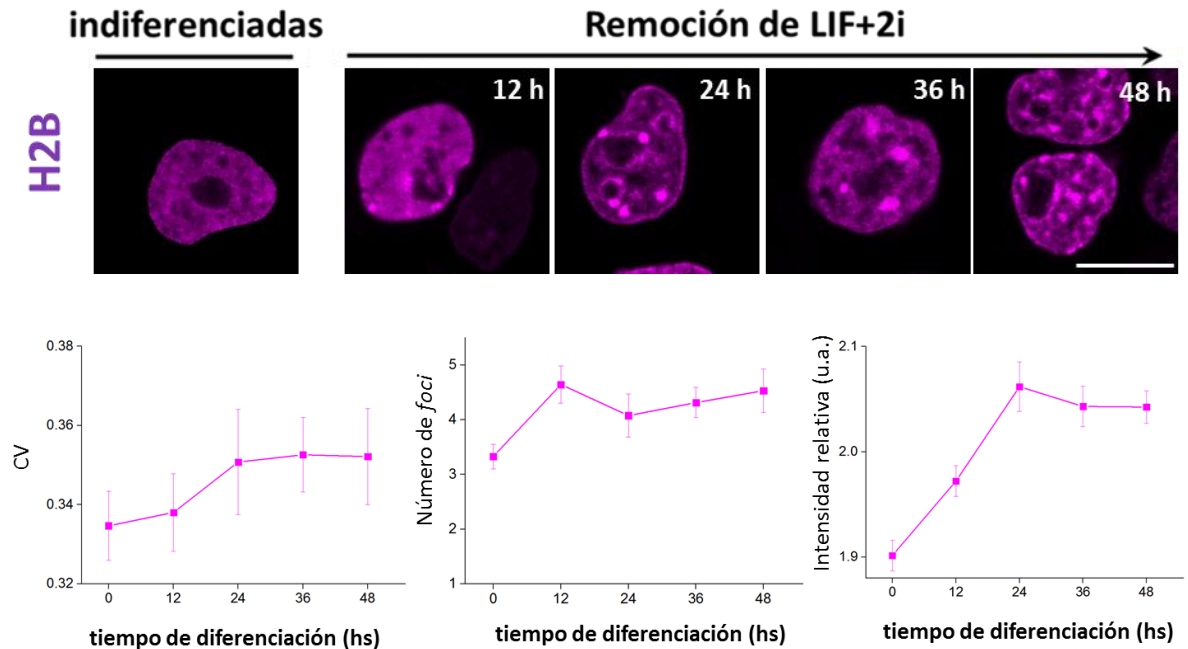


Figura 6.10. Reorganización de la cromatina al comienzo la diferenciación celular. Imágenes representativas de microscopía confocal de células transfectadas con H2B-mCherry en función del tiempo cultivadas con medio de diferenciación (- LIF+2i). La distribución nuclear de esta proteína fue analizada cuantitativamente como se describe en el Capítulo 5 (Sección 5.6.1) para obtener el coeficiente de variación (CV), el número de *foci* y la intensidad relativa de los *foci*. Los resultados se presentan como la media $\pm$ el error estándar. El número de células analizadas para cada condición fue entre 50-60. Adaptado de ³⁸⁰.

La Figura 6.10 muestra que la diferenciación promovería una distribución más heterogénea de la histona H2B en las primeras 24 hs de inducción de la diferenciación. Estos cambios son diferentes a los observados para los TFs en la misma ventana temporal (Figura 6.9) sugiriendo que la reorganización macroscópica de la cromatina, detectada mediante el análisis de distribución de H2B-mCherry, no es suficiente para explicar la reorganización de los TFs.

La cromatina de CME pluripotentes se caracteriza por ser globalmente descondensada y laxa, enriquecida en marcas epigenéticas asociadas a transcripción activa y la coexistencia en ciertos *loci* de H3K4me3 y H3K27me3, marcas asociadas a cromatina transcripcionalmente activa y reprimida, respectivamente, que definen un estado pausado ³⁹² el cual permitiría un rápido cambio en la expresión génica ante determinados estímulos que promueven la diferenciación hacia linajes particulares ^{393,394}. A medida que las células se diferencian, disminuyen estas marcas, aumentan las marcas epigenéticas represivas, se forman regiones de heterocromatina condensada ³⁸⁵ y solo se activan los genes específicos del linaje correspondiente.

El proceso de diferenciación es acompañado por cambios a gran escala en la organización de la cromatina³⁹⁵ que, a su vez, involucra estados transcripcionales dinámicos³⁸⁶. En este contexto, nuestros resultados sugieren que, dicha remodelación, se inicia dentro de las primeras horas de la salida del estadio pluripotente *naïve*.

6.6 Reorganización de OCT4 y SOX2 en clones independientes

Para verificar que los cambios observados no sean particularidades de las líneas estudiadas, realizamos estudios similares a los descritos en la sección 6.5, utilizando clones independientes para cada una de las líneas W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2.

La Figura 6.11 muestra que los parámetros estudiados (CV, número e intensidad de *foci*) varían con el tiempo de diferenciación en forma similar a lo observado previamente (Figura 6.9). Destacamos en estos experimentos que OCT4 y SOX2 se reorganizan de manera diferente, OCT4 forma nuevos *foci* mientras que SOX2 se redistribuye desde *foci* brillantes hacia un mayor número de *foci* con menor concentración relativa del TF en las primeras 24 hs de diferenciación. Es importante destacar que los valores absolutos de los parámetros presentan pequeñas diferencias entre clones probablemente porque estas últimas mediciones se realizaron en otro microscopio confocal con distinta configuración en algunos parámetros como los rangos espectrales accesibles para la detección.

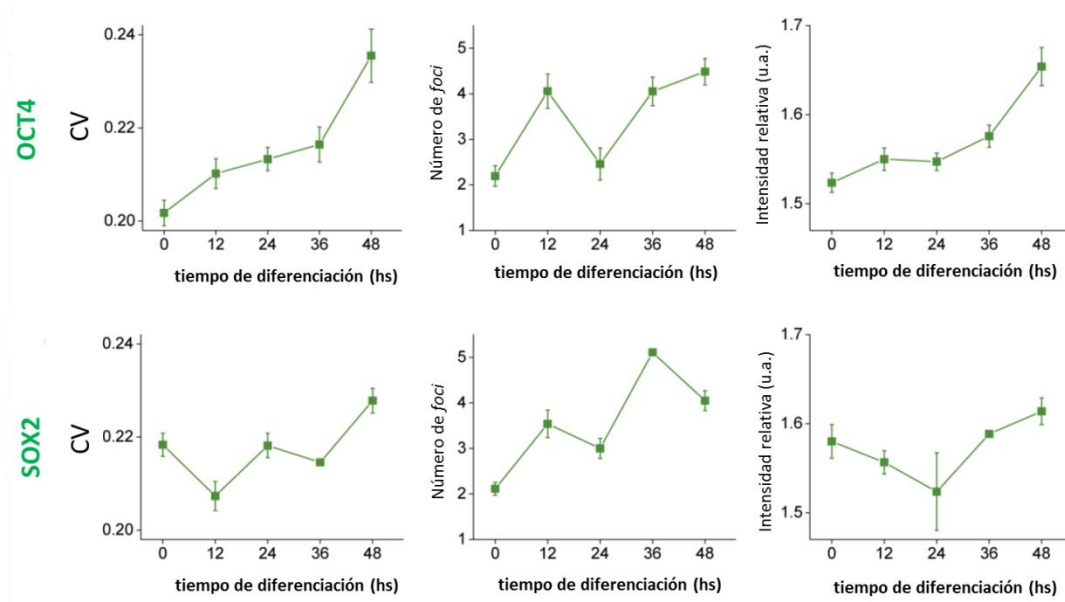


Figura 6.11. OCT4 y SOX2 se reorganizan al comienzo de la diferenciación celular en clones generados independientemente. La distribución nuclear de estas proteínas fue analizada cuantitativamente como se describe en el Capítulo 5 (Sección 5.6.1) para obtener el coeficiente de variación (CV), el número y la intensidad relativa de los *foci* para OCT4 y SOX2. Los resultados se presentan como la media $\pm$ el error estándar. El número de células analizadas para cada condición se encuentra entre 40-60. Adaptado de ³⁸⁰.

6.7 Conclusiones

Hemos mencionado previamente (Capítulo 1, Sección 1.5) que los TFs estudiados tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia y la represión de la diferenciación, e incluso pequeñas diferencias en los niveles de expresión endógenos de OCT4 y SOX2, que existen normalmente entre las células en una población, pueden definir el destino celular ante una señal de diferenciación ⁷⁵. Además, describimos en el Capítulo 2 (Sección 2.3) que el núcleo presenta numerosos compartimentos carentes de membrana, estructuralmente separados del nucleoplasma ⁹³. En particular, describimos los condensados transcripcionales (Sección 2.4) donde se concentran TFs, coactivadores y la RNA Pol II junto al resto de la maquinaria transcripcional, que podrían modular la expresión de genes de diversas maneras, aunque su funcionalidad y sus efectos sobre la transcripción siguen en discusión ^{173,396}.

En este capítulo, utilizamos líneas estables que expresan OCT4 o SOX2 fusionados a la proteína fluorescente YPet para estudiar la distribución de estos TFs de pluripotencia en células en estado indiferenciado y al comienzo de la diferenciación, en una ventana temporal donde sus niveles de expresión se mantienen constantes.

Nuestros resultados mostraron que ambos TFs se distribuyen entre el nucleoplasma y condensados que colocalizan con *foci* de heterocromatina.

En el Capítulo 2 hemos mencionado que, en el caso de SOX2, solo hay unos pocos reportes en la literatura describiendo ensayos *in vitro* que sugieren que este TF forma condensados nucleares junto al DNA y que es reclutado a condensados de KLF4^{199,383}. En contraste, se ha descrito que OCT4 en CME se concentra en condensados líquidos que contienen también al coactivador Mediador e incluyen *super-enhancers*¹⁷⁶. Mediador es un complejo que cumple muchos roles durante la transcripción, como facilitar la interacción entre TFs y la RNA Pol II, y se considera la presencia de una de sus subunidades (Med1) junto a BRD4 como marcador de *super-enhancers*¹⁷⁵. Por otro lado, se ha propuesto que la separación de fases de OCT4 regula la reorganización de TADs durante la reprogramación de células MEF a iPSCs¹⁹⁸. Además, también se ha reportado que la formación de condensados transcripcionales podría remodelar la estructura tridimensional del genoma¹⁷³ y que OCT4 y SOX2 pueden actuar como TF pioneros (Sección 1.5).

En conjunto, estos antecedentes y nuestras observaciones sugieren que los *foci* de estos TFs podrían contribuir a la organización local de la cromatina y/o modulación de su accesibilidad.

Estos resultados y antecedentes parecen en aparente contradicción dada la colocalización de los *foci* de TFs con heterocromatina (Sección 6.4), tradicionalmente asociada a regiones silenciadas del genoma³⁹⁷. Sin embargo, la heterocromatina de las CME se encuentra globalmente poco compactada y asociada a marcas bivalentes³⁹⁸. En apoyo a estas observaciones, trabajos recientes muestran que la heterocromatina de CME no se encuentra muy compactada a escala nanométrica, sino que reside en un estado dinámico de baja nanocompactación, entendiéndose este término como las proximidades entre nucleosomas³⁹⁹. Estas evidencias sugieren que los *foci* de alta densidad de H2B podrían no ser un ambiente totalmente represivo para la transcripción.

Por otra parte, la resolución óptica microscopía confocal no permite visualizar si existen variaciones en la organización interna de estos condensados. Esto puede ser particularmente relevante ya que en numerosos casos se observó heterogeneidad dentro de los diferentes condensados^{134,400,401} con lo cual la compactación de la cromatina puede que no sea homogénea para un mismo *foci*, coexistiendo regiones de mayor y menor accesibilidad para la maquinaria transcripcional. En este sentido, los condensados de OCT4 o SOX2 podrían no ser homogéneos y presentar regiones de cromatina localmente accesible, permisivas para la transcripción.

Otra función complementaria y no excluyente de los condensados de TFs sería la de constituir reservorios de OCT4 o SOX2 que permitan regular su concentración en el nucleoplasma y, por lo tanto, disminuir aquellas fluctuaciones que puedan afectar el mantenimiento de la pluripotencia⁴⁰².

Nuestros resultados mostraron que OCT4 y SOX2 se reorganizan en el espacio nuclear durante las primeras horas de inducida la diferenciación (Figura 6.9). En el caso de OCT4, las moléculas del TF se redistribuyen formando nuevos *foci* y con una mayor concentración relativa del TF, sugiriendo que la concentración de OCT4 en el nucleoplasma disminuye. En contraste, SOX2 se redistribuye en las primeras 12 hs formando un mayor número de *foci* pero con menor concentración relativa de dicho TF. Luego de las 24 h, el número de *foci* se estabiliza y aumenta la concentración relativa de SOX2, por lo que su concentración en el nucleoplasma también se modula durante la salida del estado pluripotente.

Esta reorganización espacial, diferente para ambos TFs, podría estar asociada a sus distintos roles durante el proceso de diferenciación. Si bien OCT4 y SOX2 actúan como heterodímeros regulando en conjunto gran número de genes^{403,404} y comparten muchas vías de señalización²⁸, también forman complejos con otros TFs regulando otras familias de genes⁶⁷. En este contexto, el comportamiento de los condensados de OCT4 y SOX2 durante la diferenciación podría definir la disponibilidad de estos TFs para la formación de los distintos complejos moleculares relevantes para la transcripción e, indirectamente, definir diferentes programas transcripcionales. En particular, se ha reportado que durante la transición de *naïve* a *primed*, Oct4 cambia su patrón de unión a sus sitios blanco en la cromatina y comienza a interactuar con otro *set* de proteínas; estos nuevos heterodímeros se unen a otras regiones del genoma incluyendo regiones de cromatina compactada, pudiendo estar relacionado a la capacidad de OCT4 de actuar como TF pionero^{67,405}. En particular, en la ventana temporal estudiada, se ha mostrado que aumentan los niveles de expresión de Otx2, un gen blanco de OCT4; una vez inducida la expresión de Otx2, este TF junto a OCT4 regula la expresión de múltiples genes que promueven la diferenciación^{405,406}.

Finalmente, hemos observado que los *foci* de H2B comienzan a reorganizarse en una ventana temporal temprana, dado que detectamos cambios a las 12 hs de inducida la diferenciación. Como ya mencionamos (Capítulo 2, Sección 2.2.2), se ha descrito que, a medida que las CME salen del estado pluripotente, experimentan numerosos cambios en la estructura de la cromatina, incluyendo marcas epigenéticas en histonas, el incremento de la metilación global del ADN y una disminución general en la accesibilidad de la cromatina⁴⁰⁷, modificaciones que comenzarían a ocurrir en una escala temporal de horas. Dado que los cambios detectados en la distribución de H2B no acompañan a aquellos observados para los TFs, especulamos que debe haber otros factores que medien la organización de los condensados de OCT4 y SOX2, además de la reorganización macroscópica de la cromatina.

Capítulo 7: Dinámica de los factores de transcripción de pluripotencia OCT4 y SOX2 en el inicio de la diferenciación

7.1 Introducción

En el Capítulo 2 describimos que la transcripción es un proceso complejo con muchos niveles de regulación. En particular, mencionamos que, en la regulación de la expresión génica juega un papel muy importante la distribución de los TFs en el núcleo celular, lo que a su vez podría definir el *paisaje* de interacciones de estas biomoléculas con la cromatina.

A su vez, en el capítulo anterior mostramos que los *foci* de OCT4 y SOX2 se redistribuyen a unas pocas horas de iniciado del proceso de diferenciación, lo que sugiere que podría haber modificaciones en la disponibilidad de estos TFs dentro del núcleo y, en consecuencia, diferencias en sus interacciones con la cromatina.

En este capítulo, evaluamos esta hipótesis estudiando las interacciones TF-cromatina tanto en el nucleoplasma como en los *foci* de estos TFs, en células indiferenciadas y al inicio del proceso de diferenciación.

7.2 La dinámica de interacción TF-cromatina es distinta entre los *foci* y el nucleoplasma

En el Capítulo 5 (Sección 5.5.1) detallamos los fundamentos de la técnica de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) y mencionamos que esta técnica provee información cuantitativa de la dinámica de biomoléculas en células vivas.

En el caso de TFs, hemos mencionado antecedentes de nuestro grupo que indican que FCS permite cuantificar los tiempos característicos de las interacciones TF-cromatina y las fracciones moleculares que se encuentran interactuando con la cromatina o difundiendo libremente³⁶⁷. Por estos motivos, decidimos utilizar esta técnica para evaluar la dinámica de los TFs de pluripotencia, tanto en los *foci* como en el nucleoplasma de las células W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2.

Para ello, el láser se enfocó en el nucleoplasma o en un *focus* (Figura 7.1a) y se colectó la intensidad de fluorescencia en función del tiempo (Sección 5.5.1).

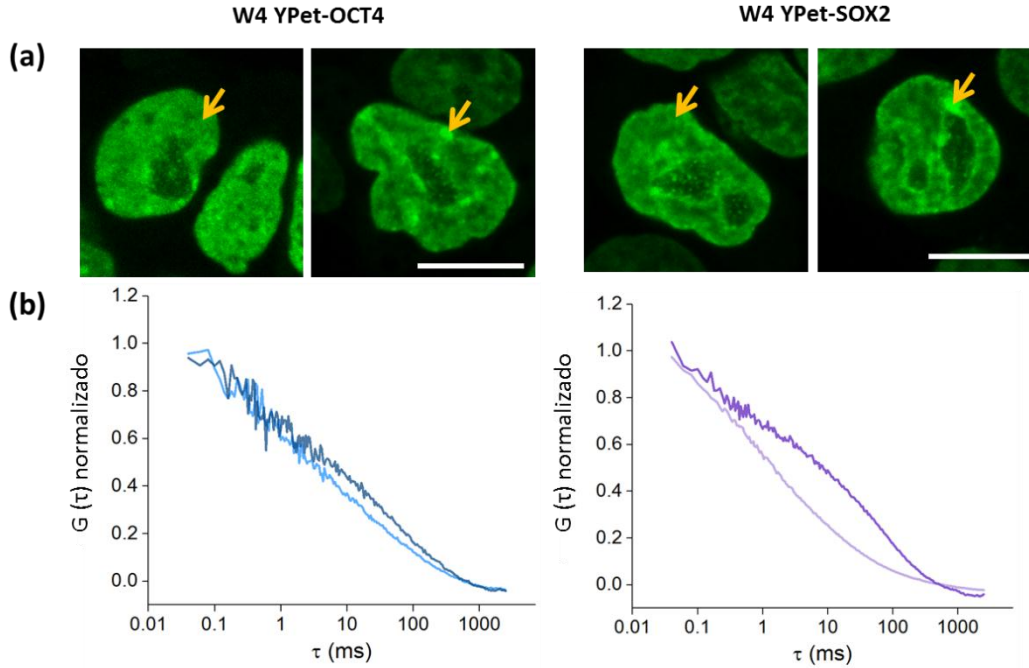


Figura 7.1. Análisis de la dinámica de YPet-TFs en el nucleoplasma o *foci*. Imágenes representativas de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2. Las flechas amarillas muestran la posición en el nucleoplasma (izquierda) o en un *focus* (derecha) en las cuales se enfoca el láser para realizar mediciones de FCS. Barras de escala, 10 μm **(a)**. Curvas de autocorrelación promedio obtenidas para mediciones de FCS realizadas en el nucleoplasma (colores claro) y en los *foci* (colores oscuros) **(b)**. El número de células analizadas fue de 54 y 15 (nucleoplasma y *foci* en W4 YPet-OCT4, respectivamente) y 110 y 20 (nucleoplasma y *foci* en W4 YPet-SOX2, respectivamente).

La Figura 7.1b muestra las funciones de autocorrelación (ACF) promedio obtenidas en el nucleoplasma (colores claros) o en *foci* (colores oscuros) de células W4 YPet-OCT4 y W4 YPet-SOX2. Se observa que las curvas obtenidas en los *foci* decaen más lentamente con el tiempo de retardo τ , sugiriendo que la dinámica de los TFs es más lenta en los condensados que en el nucleoplasma.

Seguimos los procedimientos descritos en el Capítulo 5 (Sección 5.5.1) para analizar las curvas de ACF y obtuvimos, a partir del ajuste de la Ecuación 5.3 a los datos experimentales, las fracciones de TFs difundiéndose libremente o interactuando en dos ventanas temporales diferentes con dos poblaciones de sitios de unión a la cromatina, los cuales hemos denominado sitios de unión rápidos y lentos, respectivamente³⁶⁷.

La Figura 7.2 compila los valores de los parámetros obtenidos a partir del ajuste para los TFs estudiados. Nuestros resultados muestran que, en los *foci*, hay una mayor proporción de moléculas de OCT4 y SOX2 que interactúa con los sitios de unión lentos con una reducción concomitante en la fracción de moléculas difundiéndose libremente, al comparar con el

nucleoplasma. Además, los tiempos de interacción TF-cromatina en los *foci* son significativamente mayores que en el nucleoplasma para ambos TFs. En el caso de SOX2, observamos que el tiempo característico de las interacciones rápidas y lentas es significativamente mayor en los *foci* mientras que, para OCT4, sólo lo es el tiempo característico correspondiente a las interacciones rápidas.

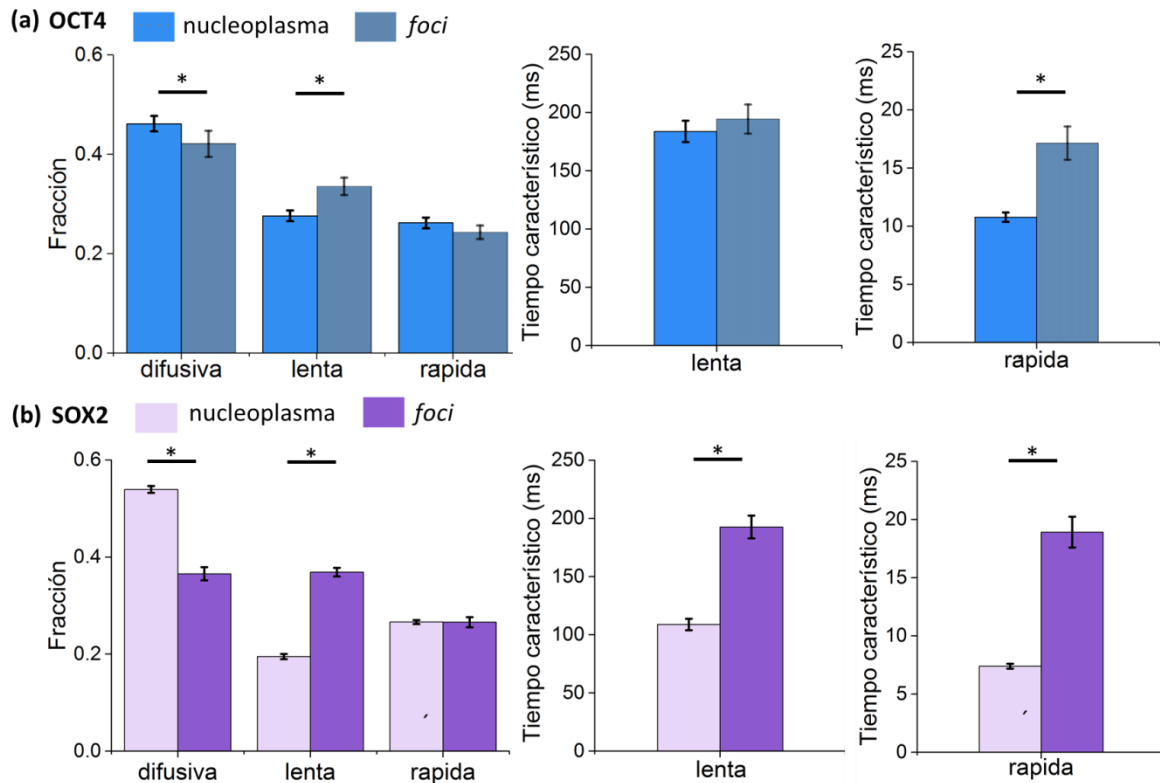


Figura 7.2. Las interacciones TF-cromatina son más lentas en los *foci* que en el nucleoplasma. Valores obtenidos a partir del ajuste de la Ecuación 5.3 para la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones rápidas y lentas, junto a sus tiempos característicos en células W4 YPet-OCT4 **(a)** y W4 YPet-SOX2 **(b)**. Los resultados se expresan como la media $\pm$ el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el nucleoplasma (colores claros) y los *foci* (colores oscuros). El número de células analizadas fue de 54 y 15 (nucleoplasma y *foci* en W4 YPet-OCT4, respectivamente) y 110 y 20 (nucleoplasma y *foci* en W4 YPet-SOX2, respectivamente). Adaptado de ³⁸⁰.

Estos resultados muestran que OCT4 y SOX2 se distribuyen dinámicamente entre *foci* y nucleoplasma, presentando interacciones más lentas en los *foci*.

7.3 La dinámica de interacción OCT4-cromatina es más rápida al inicio de la diferenciación

A continuación, estudiamos si la dinámica de las interacciones TF-cromatina puede verse modificada por estímulos que promuevan la diferenciación celular. Con este fin, realizamos mediciones de FCS en los *foci* y el nucleoplasma de células W4 YPet-OCT4 en estado de pluripotencia *naïve* y luego de 48 hs de inducir su diferenciación mediante su cultivo en ausencia de LIF y 2i (Capítulo 5, Sección 5.1.2); estas últimas serán denominadas "células d-inducidas".

La Figura 7.3 muestra las ACF promedio obtenidas para células W4 YPet-OCT4 indiferenciadas y d-inducidas, tanto en el nucleoplasma como en los *foci*. Nuestros datos muestran que la dinámica de interacción OCT4-cromatina se modifica en el nucleoplasma de células d-inducidas; en particular, detectamos que estas células presentan una menor fracción de moléculas interactuando con los sitios lentos con un aumento concomitante en la fracción difusiva del TF respecto a las células indiferenciadas. Además, los tiempos característicos de interacción OCT4-cromatina son significativamente menores en las células d-inducidas.

Por otra parte, no detectamos diferencias significativas en la dinámica de OCT4 en los *foci* de células d-inducidas con respecto a las indiferenciadas (Figura 7.3).

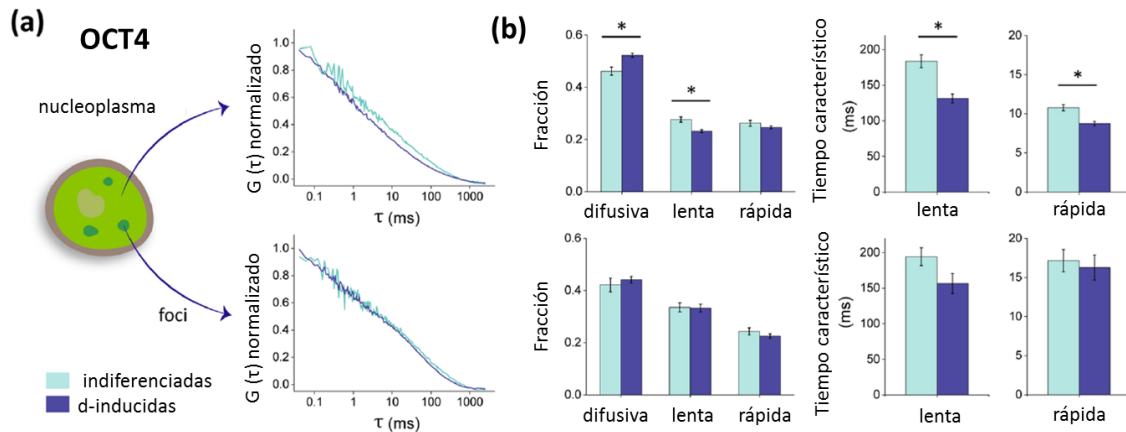


Figura 7.3. Las interacciones OCT4-cromatina en el nucleoplasma cambian al comienzo de la diferenciación. Se realizaron determinaciones de FCS en células W4 YPet-OCT4 indiferenciadas (celeste) o 48 hs luego de la remoción de LIF+2i (azul, d-inducidas). Se muestran las curvas ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma (panel superior) y en los *foci* (panel inferior) (a). Los datos fueron ajustados con la Ecuación 5.3 para obtener la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones lentas y rápidas, junto a sus tiempos característicos. Los resultados experimentales son expresados como la media $\pm$ error estándar. El número de células indiferenciadas y d-inducidas analizadas fue 54 y 73 (determinaciones en el nucleoplasma) y 20 (determinaciones en los *foci*). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.01$) (b). Adaptado de ³⁸⁰.

En el Capítulo 6 observamos cambios en la distribución de OCT4 luego de apenas 24 hs de inducida la diferenciación (Capítulo 6, Figura 6.9). Por este motivo, decidimos explorar si, en el nucleoplasma, las interacciones OCT4-cromatina cambian en una ventana temporal menor a las 48 hs ensayada previamente.

La Figura 7.4 muestra las ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma de células W4 YPet-OCT4 indiferenciadas (celeste claro), a 24 hs de inducir la diferenciación (celeste) y células d-inducidas (48 hs, azul). La dinámica de interacción OCT4-cromatina luego de 24 hs de inducción es similar a la observada para células indiferenciadas, sugiriendo que los cambios descriptos anteriormente ocurren a tiempos mayores, en una ventana temporal entre las 24 y 48 hs.

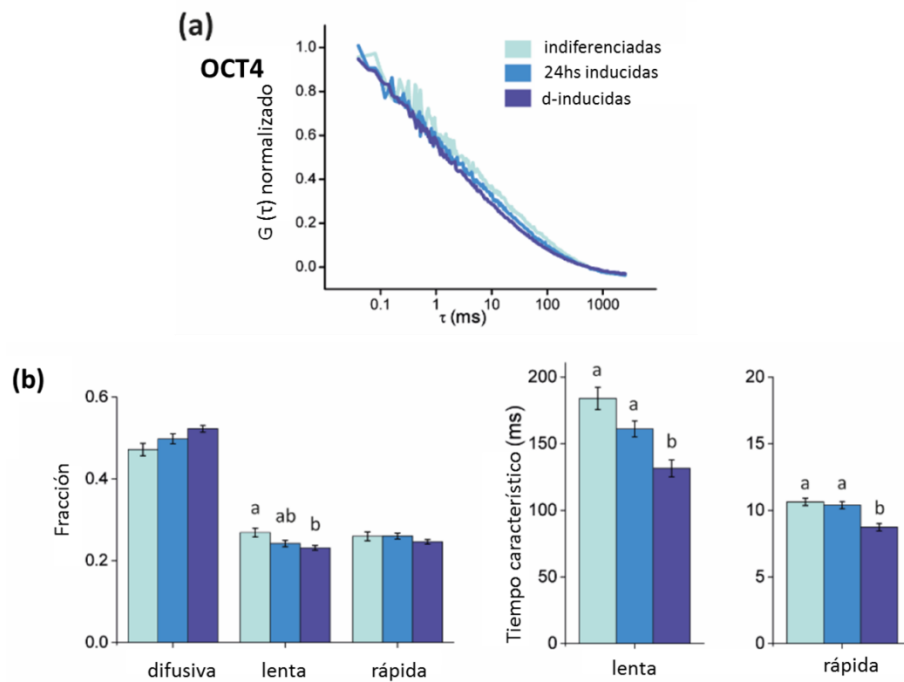


Figura 7.4. La dinámica de OCT4 cambia en una ventana temporal entre las 24 y 48 hs de inducida la diferenciación. Se realizaron experimentos de FCS en células W4 YPet-OCT4 indiferenciadas (celeste claro), a 24 hs (celeste oscuro) o 48 hs (azul, d-inducidas) luego de la remoción de LIF+2i. Se muestran las curvas ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma **(a)**. Los datos fueron ajustados con la Ecuación 5.3 para obtener la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones lentas y rápidas junto a sus tiempos característicos. Los resultados experimentales son expresados como la media $\pm$ error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.01$). Los datos correspondientes a las células indiferenciadas y d-inducidas se reproducen de la Figura 7.3. El número de células analizadas a 24 hs de inducida la diferenciación fue de 61. **(b)**. Adaptado de ³⁸⁰.

7.4 La dinámica de interacción SOX2-cromatina cambia sutilmente al comienzo de la diferenciación

Con el fin de estudiar si la dinámica de SOX2 responde a señales de diferenciación, realizamos ensayos similares a los mostrados en la sección anterior (i.e. FCS en el nucleoplasma o *foci*) en células W4 YPet-SOX2.

La Figura 7.5 muestra las ACF promedio obtenidas para células W4 YPet-SOX2 indiferenciadas (naranja claro) o d-inducidas (naranja oscuro), en el nucleoplasma o *foci*. En contraste con OCT4, observamos diferencias muy sutiles en la dinámica de SOX2 entre las dos condiciones estudiadas; en particular, solo detectamos un aumento pequeño pero significativo en los tiempos característicos de interacciones rápidas SOX2-cromatina en el nucleoplasma de células d-inducidas con respecto a indiferenciadas. Por otro lado, la inducción del proceso de diferenciación no produjo cambios significativos en la dinámica de SOX2 en los *foci*, tal como se observó para el caso de OCT4.

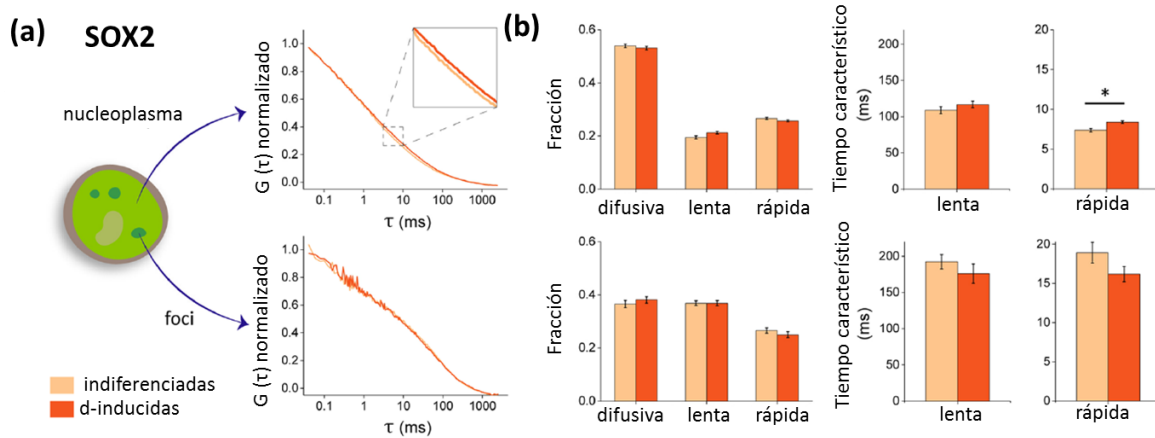


Figura 7.5. La dinámica de interacción SOX2-cromatina cambia sutilmente al comienzo del proceso de diferenciación. Realizamos medidas de FCS en células W4 YPet-SOX2 indiferenciadas (naranja claro) o d-inducidas (naranja oscuro). Se muestran las curvas ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma (panel superior) y *foci* (panel inferior) (a). Los datos fueron ajustados con la Ecuación 5.3 para obtener la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones lentas y rápidas, junto a sus tiempos característicos. Los resultados experimentales son expresados como la media $\pm$ error estándar. El número de células analizadas en el nucleoplasma fue de 110 y 146, y en los *foci* fue de 20, en células indiferenciadas y d-inducidas, respectivamente (b). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.01$). Adaptado de ³⁸⁰.

En el capítulo anterior (Figura 6.8) reportamos que la distribución nuclear de SOX2 se modifica durante el proceso de diferenciación y, en particular, observamos que el CV presentó un valor mínimo a las 12 hs de inducida la diferenciación, sugiriendo una distribución más

homogénea de este TF en el nucleoplasma. Por este motivo, decidimos evaluar la dinámica de SOX2 en el nucleoplasma en ese período de tiempo de inducida la diferenciación.

La Figura 7.6 muestra las ACF promedio obtenidas para células W4 YPet-SOX2 indiferenciadas (naranja claro), a las 12 hs de inducir la diferenciación (naranja) o d-inducidas (naranja oscuro). Nuestros resultados muestran que la dinámica de SOX2, a las 12 hs de inducida la diferenciación, resultó similar a la dinámica luego de 48 hs del estímulo. En particular, el cambio detectado para este TF es un aumento sutil pero significativo en los tiempos de interacción rápidos, sugiriendo que los cambios en la organización de los *foci* de SOX2 ocurren concomitantemente a cambios leves en su interacción con la cromatina en el nucleoplasma.

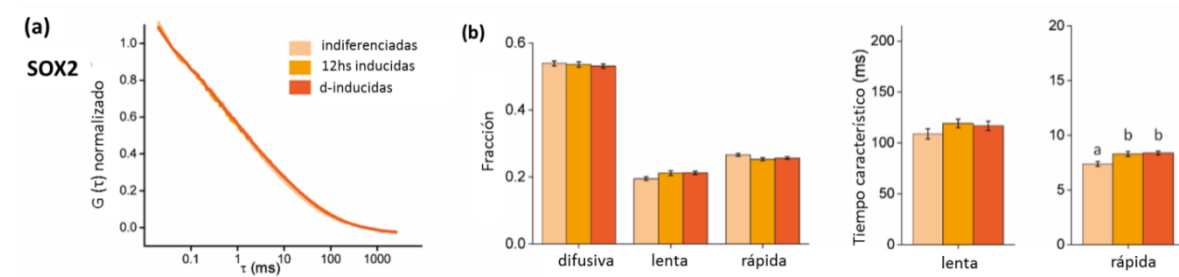


Figura 7.6 La dinámica de SOX2 cambia en las primeras 12 hs de inducida la diferenciación. Realizamos medidas de FCS en células W4 YPet-SOX2 indiferenciadas (naranja claro), a 12 hs de inducir la diferenciación (naranja) o células d-inducidas (naranja oscuro). Se muestran las curvas ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma **(a)**. Los datos fueron ajustados con la Ecuación 5.3 para obtener la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones lentas y rápidas, junto a sus tiempos característicos. Los resultados experimentales son expresados como la media $\pm$ error estándar **(b)**. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.01$). Los datos correspondientes a las células indiferenciadas y d-inducidas se reproducen de la Figura 7.5. El número de células analizadas a 12 hs de inducida la diferenciación fue de 81 **(b)**. Adaptado de ³⁸⁰.

7.5 Dinámica de OCT4 y SOX2 en clones independientes

Para verificar que los cambios observados no sean particularidades de las líneas generadas, repetimos los experimentos de FCS en el nucleoplasma de células indiferenciadas y d-inducidas en clones independientes que expresan YPet-OCT4 o YPet-SOX2. Los resultados mostraron comportamientos similares para la dinámica de interacción de OCT4-cromatina en respuesta a la inducción, apoyando nuestras observaciones (Figura 7.7). En el caso de SOX2, no detectamos los cambios sutiles en los tiempos de interacción rápidos (Figura 7.5) en células d-inducidas del nuevo clon. Especulamos que esto puede deberse a pequeñas diferencias en las

condiciones de adquisición de los datos; de todos modos, estos resultados no afectan las conclusiones obtenidas.

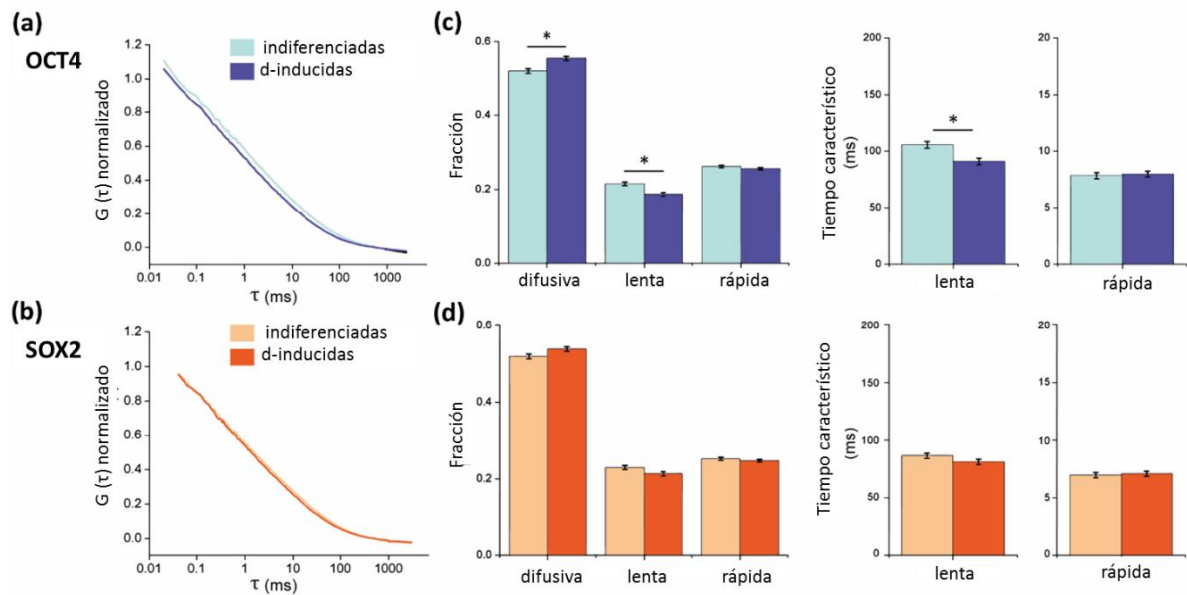


Figura 7.7 Dinámica de OCT4 y SOX2 en clones independientes. Se muestran las curvas ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma **(a-b)**. Los datos fueron ajustados con la Ecuación 5.3 para obtener la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones lentas y rápidas, junto a sus tiempos característicos. Los resultados experimentales son expresados como la media $\pm$ error estándar **(c-d)**. El número de datos para OCT4 es de 78 y 85 para células indiferenciadas y d-inducidas, y para SOX2 es de 65 y 64, respectivamente. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.01$). Adaptado de ³⁸⁰.

7.6 Conclusiones

En este capítulo empleamos FCS para estudiar la dinámica de los TFs de pluripotencia, OCT4 y SOX2, en el nucleoplasma y los *foci* de CMEs.

Nuestros resultados muestran que la dinámica de ambos TFs puede ser explicada por un modelo sencillo que incluye la difusión de los TFs y su interacción con dos poblaciones de sitios en la cromatina, que denominamos lentos (tiempo de interacción ~ 150 ms) y rápidos (tiempo de interacción ~ 10 ms), lo que concuerda con trabajos publicados previamente por nuestro grupo ^{367,369}. Debemos destacar que, la consideración de únicamente dos poblaciones de sitios con distintos tiempos característicos de interacción es una reducción del complejo *paisaje* de las interacciones con la cromatina. Sin embargo, este modelo sencillo es suficiente para describir las observaciones realizadas en los experimentos de FCS.

En este capítulo mostramos que los parámetros característicos de las interacciones TF-cromatina son diferentes en los compartimentos nucleares estudiados (*foci* y nucleoplasma). En

los *foci*, una fracción mayor de TFs se encuentra unido a la cromatina y, globalmente, lo hace por más tiempo.

En el Capítulo 6 observamos que las propiedades de los *foci* de OCT4 y SOX2 varían cuando se induce la diferenciación celular. En este capítulo observamos que la dinámica de los TFs en los *foci* no es afectada por las señales de diferenciación en la ventana temporal estudiada. Estos resultados indican que la diferenciación es acompañada por variaciones en el número de moléculas incorporadas a los *foci* (y, en consecuencia, de la concentración de moléculas de TFs disponibles en el nucleoplasma), pero no parece haber cambios detectables en las interacciones de los TFs dentro de estos condensados. Esto sugiere que los *foci* podrían estar actuando como reservorios de TFs y como *buffer* ante estímulos externos.

De acuerdo a antecedentes previos, los *foci* de OCT4 contienen otras biomoléculas (e.g. Med1¹⁷⁶) que contribuyen a generar una red de interacciones débiles y transitorias^{132,138}. Nuestros resultados sugieren que esta red de interacciones no cambiaría sustancialmente durante estadios tempranos del proceso de diferenciación. Se necesitan más estudios para identificar los componentes de estas redes y analizar si existen cambios que no detectamos en nuestros experimentos.

Por otro lado, observamos modificaciones en la dinámica de ambos TFs en el nucleoplasma al comienzo de la diferenciación; además, estos cambios fueron diferentes para cada TF. Específicamente, la dinámica de interacción OCT4-cromatina se vuelve más rápida entre las 24 y 48 hs de inducida la diferenciación, dado que una fracción menor de moléculas de OCT4 interactúa con los sitios de unión lentos y el TF permanece unido a ambos tipos de sitios por menos tiempo. A su vez, la dinámica de interacción de SOX2 con la cromatina se modifica sutilmente mostrando un leve aumento en el tiempo de interacción con los sitios rápidos en las primeras 12 hs de inducida la diferenciación.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la inducción de la diferenciación inicia una reorganización espacial de OCT4 y SOX2 a distintos niveles. Uno de ellos es, como vimos previamente (Capítulo 6), su distribución dentro del núcleo y otro, sus interacciones con la cromatina. En este capítulo observamos que, dentro de las primeras 48 hs de inducida la diferenciación, se producen cambios significativos en las interacciones de OCT4 con la cromatina, mientras que SOX2 muestra cambios sutiles.

Estas diferencias en cómo responde la dinámica de cada TF puede estar relacionada con su reorganización espacial, sus interacciones con sus sitios blanco en la cromatina y con otras proteínas. A las 48 hs de inducida la diferenciación, OCT4 forma más *foci* y con mayor intensidad relativa del TF, es decir que este TF tiene una distribución más heterogénea, lo que podría estar modificando rápidamente su concentración en el nucleoplasma y disponibilidad, provocando efectos más fuertes en su dinámica a medida que transcurre el tiempo. Estos cambios podrían modificar el *paisaje* de sus interacciones con la cromatina. En particular, se ha mostrado que el mantenimiento de la pluripotencia requiere de una interacción estable entre OCT4 y la

cromatina, lo que mantiene la accesibilidad de *enhancers* de genes relacionados con la pluripotencia ⁴⁰⁸, por lo tanto, especulamos que las señales de diferenciación promueven cambios en esas interacciones. Como mencionamos en el Capítulo 6, durante la transición de *naïve* a *primed*, se modifican las interacciones OCT4-cromatina en sus sitios blanco, OCT4 forma preferencialmente otros heterodímeros y se une a otros sitios de la cromatina, incluyendo regiones compactadas, lo que podría relacionarse a su capacidad de actuar como TF pionero ^{67,405}. Específicamente, en esta ventana temporal, OCT4 se disocia de *enhancers* asociados a pluripotencia *naïve* y se asocia a nuevos *loci* involucrados en el desarrollo del epiblasto postimplantatorio; esta relocalización de OCT4 es mediada por interacción con otros TFs, como OTX2, de manera dependiente del estadio celular ⁶⁷.

En lo que respecta a SOX2, tanto su reorganización nuclear como cambios en su dinámica son sutiles. Observamos que a las 12 hs de inducida la diferenciación, el TF se redistribuye a un mayor número de *foci* con menor concentración relativa. En esta ventana, también detectamos cambios en las interacciones rápidas SOX2-cromatina, diferencias que se mantienen a las 48 hs inducción de la diferenciación. Lamentablemente, nuestros resultados no explican por qué solo se modifican las interacciones rápidas y, dado que los niveles de expresión de los TFs disminuyen a medida que las células salen del estado pluripotente, no es posible realizar mediciones de FCS a tiempos mayores a 48 hs sin considerar efectos relacionados con sus niveles de expresión. Es posible que ocurran cambios en la dinámica SOX2-cromatina en momentos del desarrollo embrionario que no están recapitulados por nuestro modelo y/o ventana temporal estudiada. Especulamos que los cambios sutiles detectados en la dinámica SOX2-cromatina se deben a particularidades de su actividad como TF pionero. En este sentido, mediante ensayos *in vitro* se detectó que SOX2 interactúa con regiones de la cromatina difíciles de deformar, induciendo una conformación más desplegada que podría favorecer la unión de OCT4, que a su vez estabiliza cooperativamente la unión del complejo y una estructura de la cromatina más abierta. En estos casos, la unión de SOX2 sería requerida para una posterior unión estable de OCT4 ⁴⁰⁹.

Por otra parte, un *preprint* reciente muestra que los TF pioneros tienen diferentes mecanismos de explorar la cromatina; en particular, SOX2 presenta una dinámica rápida, donde frecuentemente se encuentra difundiendo e interactúa transitoriamente con la cromatina, lo que causaría que el TF se mueva rápido entre nucleosomas ⁴¹⁰.

Estos reportes junto con nuestros resultados podrían interpretarse considerando que, en la ventana temporal estudiada, OCT4 se relocaliza a otros *loci*, probablemente asociados a la salida de la pluripotencia *naïve*, favorecido por el rol de TF pionero de SOX2.

Finalmente, dado que, como ya mencionamos, estos cambios preceden a la disminución en los niveles de expresión de OCT4 y SOX2, especulamos que los cambios observados, en particular en la distribución de OCT4 y su interacción con la cromatina, podrían modular la expresión de genes específicos relacionados con la diferenciación. En esta dirección, se ha reportado que en esta ventana temporal, algunos genes blanco de OCT4 y SOX2 relacionados

con el mantenimiento de la pluripotencia, como Nanog, Klf4 y Esrrb, disminuyen sus niveles de expresión, mientras que otros blancos relacionados con el proceso de diferenciación, como Dnmt3A, Oct6 y Otx2, aumentan sus niveles de expresión ⁴⁰⁶. Como mencionamos en el Capítulo 6, la transcripción de este último TF, Otx2, está regulada por OCT4 y una vez inducida, ambos TFs promueven la expresión de genes relacionados con diferenciación ⁴⁰⁵.

En síntesis, la salida del estado de pluripotente *naïve* precede al aumento en los niveles de expresión de genes relacionados con el compromiso con linajes específicos, y recapitula las primeras etapas del desarrollo embrionario ⁵⁷, por lo tanto, especulamos que los cambios observados en las interacciones de OCT4 con la cromatina probablemente estén relacionados con la salida de dicho estadio, estableciendo las bases para activar nuevos programas transcripcionales que definan el destino celular.

Capítulo 8: El citoesqueleto de células madre embrionarias

8.1 Introducción

En el Capítulo 2 describimos que la organización de la cromatina y la expresión génica pueden ser moduladas por fuerzas mecánicas ^{239,411}. Estas fuerzas son propagadas al interior celular a través del citoesqueleto, el cual está físicamente vinculado al núcleo mediante diferentes conectores moleculares, entre ellos, el complejo LINC ⁴¹² y NPC. Dada la importancia de diversos componentes del citoesqueleto en la diferenciación de CMP ^{224,336}, las evidencias de su impacto en la regulación de la expresión génica en otras líneas celulares ^{333,335} y la ausencia de estudios adecuados que describan la estructura del citoesqueleto en células CMP (Capítulo 3, Sección 3.2), nos propusimos estudiar la organización del citoesqueleto en este sistema celular. Además, en este capítulo, buscamos comprender si esta estructura celular contribuye, directa o indirectamente, a la organización dinámica de TFs de pluripotencia.

Los resultados descritos en este capítulo fueron obtenidos en colaboración con Juan José Romero, María Cecilia De Rossi y Camila Oses y constituyeron las bases de los estudios que se describirán en el Capítulo 9. Específicamente, participé en algunas determinaciones experimentales, en la adquisición de datos y su posterior análisis e interpretación.

8.2 Caracterización de las diferentes redes del citoesqueleto en células madre embrionarias.

Para comprender en detalle la transmisión de señales mecánicas al núcleo celular y su rol en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación, es necesario contar con una descripción cuantitativa del citoesqueleto en CME. Tal como mencionamos previamente, estas células crecen formando colonias tridimensionales, por lo que no es conveniente realizar análisis observando únicamente un plano ya que se pierde información espacial. Además, los protocolos de fijación suelen inducir modificaciones en las estructuras celulares, por lo que los reportes previos en células fijadas deben ser complementados con estudios en células vivas.

Por estos motivos, decidimos estudiar la distribución tridimensional de microtúbulos, actina y vimentina en células vivas, aprovechando la capacidad de seccionar ópticamente la muestra mediante microscopía confocal. Con este objetivo, adquirimos imágenes confocales (x,y,z) de células de la línea parental W4 transfectadas con vectores de expresión de proteínas

de componentes del citoesqueleto fusionadas a GFP o EGFP (Capítulo 5, Sección 5.2) y la histona H2B fusionada a mCherry (H2B-mCherry) para visualizar el núcleo celular²⁸⁰.

A continuación, describiremos ciertas observaciones cualitativas realizadas en este estudio; en cada caso, informamos el porcentaje de células que presentan una determinada característica de la red del citoesqueleto estudiada del total de células transfectadas. Cabe destacar que estos porcentajes no corresponden a la frecuencia de estas propiedades en CME, ya que únicamente se estudia la población de células transfectadas y ciertos factores experimentales, como los niveles de expresión de las proteínas y parámetros instrumentales, influyen en esta estadística.

Para visualizar la red de microtúbulos, utilizamos un vector que codifica para un dominio de la proteína de unión a microtúbulos ensconsina fusionada a 3 copias en tándem de GFP (EMTB-3xGFP)³⁵³. La Figura 8.1 muestra una imagen 3D representativa de células cotransfectadas con EMTB-3xGFP y H2B-mCherry. Se observa que los microtúbulos se extienden en el citoplasma, en contraste a la distribución desorganizada sugerida previamente, a partir de imágenes adquiridas en un único plano de CME fijadas e inmunomarcadas⁴¹³.

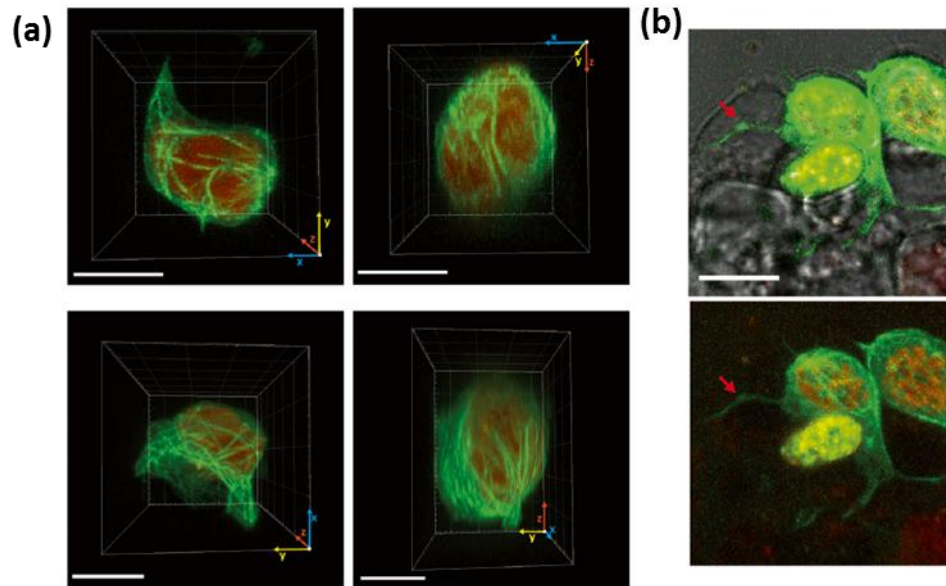


Figura 8.1. Las CME en interfase presentan una organización atípica de la red de microtúbulos. Imágenes representativas de microscopía confocal de CME cotransfectadas con H2B-mCherry (rojo) y EMTB-3xGFP (verde). Reconstrucción tridimensional de una célula vista desde distintos ángulos mostrando la organización de la red de microtúbulos **(a)**. Proyecciones de máxima intensidad superpuestas a la imagen de transmisión (gris) obtenida en un plano del z-stack. Las imágenes fueron saturadas digitalmente para facilitar la observación de protrusiones, señaladas con flechas rojas **(b)**. Barras de escala, 10 μ m. Tomado de²⁸⁰.

Nuestras imágenes muestran que los microtúbulos tampoco presentan la típica distribución en forma de estrella (Figura 3.5) que se observa en numerosas líneas celulares somáticas ²²⁵. Además, el 12% de 93 células transfectadas, presentan protrusiones enriquecidas en microtúbulos (señaladas en Figura 8.1), similares a las observadas en células W4 YPet-OCT4 transfectadas con el marcador de membrana mem-mCherry, que posee dos señales de localización de membrana fusionados a la proteína fluorescente (Figura 8.2). Estos resultados sugieren la presencia de proyecciones citoplasmáticas enriquecidas en microtúbulos, que conectan células vecinas y podrían actuar como vías de comunicación entre ellas.

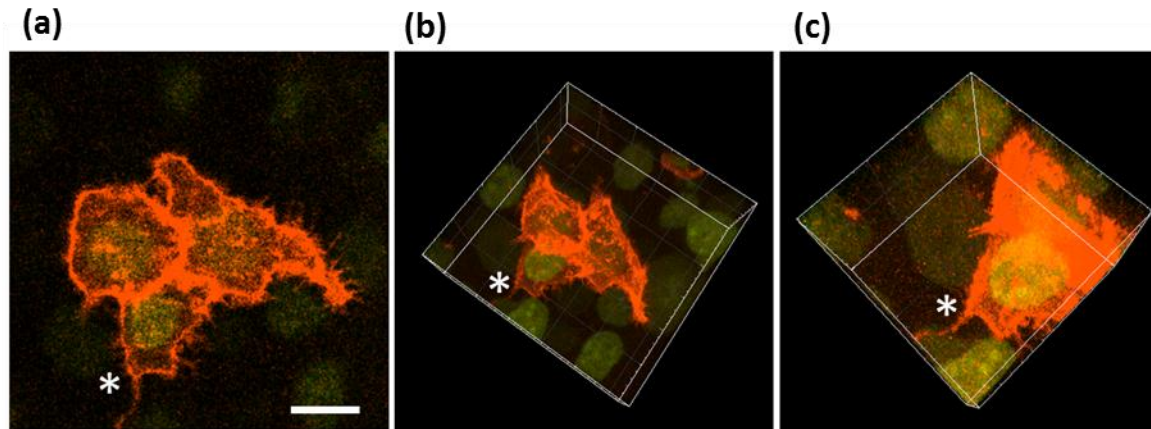


Figura 8.2. Las CME muestran protrusiones de membrana extendiéndose hacia células vecinas. Imágenes representativas de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 (verde) transfectadas con mem-mCherry (rojo). Imagen de un plano de las células expresando mem-mCherry **(a)**. Reconstrucción tridimensional de las células **(b)**. Zoom de la imagen para mejorar la visualización de la protrusión. La imagen fue saturada digitalmente para facilitar su observación **(c)**. Los asteriscos (*) señalan protrusiones. Barras de escala, 10 μm . Tomado de ²⁸⁰.

Para profundizar en la caracterización de la organización de microtúbulos, cotransfectamos las células con un plásmido que codifica para EB3, proteína que se une al extremo positivo de los microtúbulos, fusionada a GFP (EB3-GFP) ^{414,415} y adquirimos imágenes en un plano dado en función del tiempo.

La Figura 8.3a muestra que los cometas de EB3-GFP (verde) se distribuyen en todo el citoplasma; analizamos el mapa de flujo de dichos cometas (Figura 8.3b) como se describe en el Capítulo 5 (Sección 5.6.4) y observamos que en algunos casos (32% de 25 células) los cometas irradian en todas las direcciones mientras que en otros (44% de 25 células) parecen irradiar desde sitios específicos en el citoplasma, sugiriendo la presencia de centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, ²⁵⁹). Es importante destacar que esta observación cualitativa no permite caracterizar la naturaleza de estos supuestos MTOCs. También detectamos cometas en contacto

cercano al núcleo y otros cometas que parecen “golpearlo” (24% de 25 células), sugiriendo que los microtúbulos podrían transmitir fuerzas a dicha organela a través de este mecanismo.

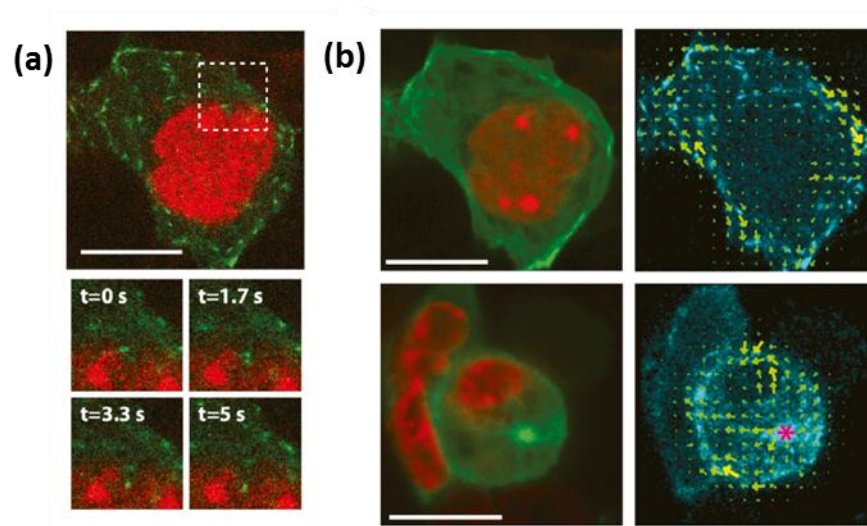


Figura 8.3. Las CME en interfase presentan microtúbulos con centros de nucleación. Imágenes representativas de microscopía confocal de CME cotransfectadas con H2B-mCherry (rojo) y EB3-GFP (verde). Paneles inferiores, zoom del cuadrado delimitado por la línea punteada en cuatro momentos diferentes, mostrando cometas de EB3-GFP en contacto con el núcleo **(a)**. Proyecciones de máxima intensidad obtenidas a partir de un stack de 100 imágenes obtenidas durante 166.6 segundos (izquierda), mapas de flujo mostrando el movimiento de los cometas (derecha). El asterisco rosa muestra un posible centro de nucleación de microtúbulos desde el cual emanan cometas de EB3 **(b)**. Barras de escala, 10 μm . Adaptado de ²⁸⁰.

Con el fin de caracterizar la red de actina en estas células, las cotransfectamos con un vector que codifica para la proteína de fusión EGFP-actina y el vector de H2B-mCherry.

La Figura 8.4 muestra imágenes representativas obtenidas en estos experimentos; se observa que la red de actina posee una organización aparentemente difusa en el citoplasma, con estructuras enriquecidas en actina en contacto con el sustrato (flechas blancas), como es de esperarse dada la participación de este elemento del citoesqueleto en las interacciones con la superficie en la cual se adhieren las células ⁴¹⁶.

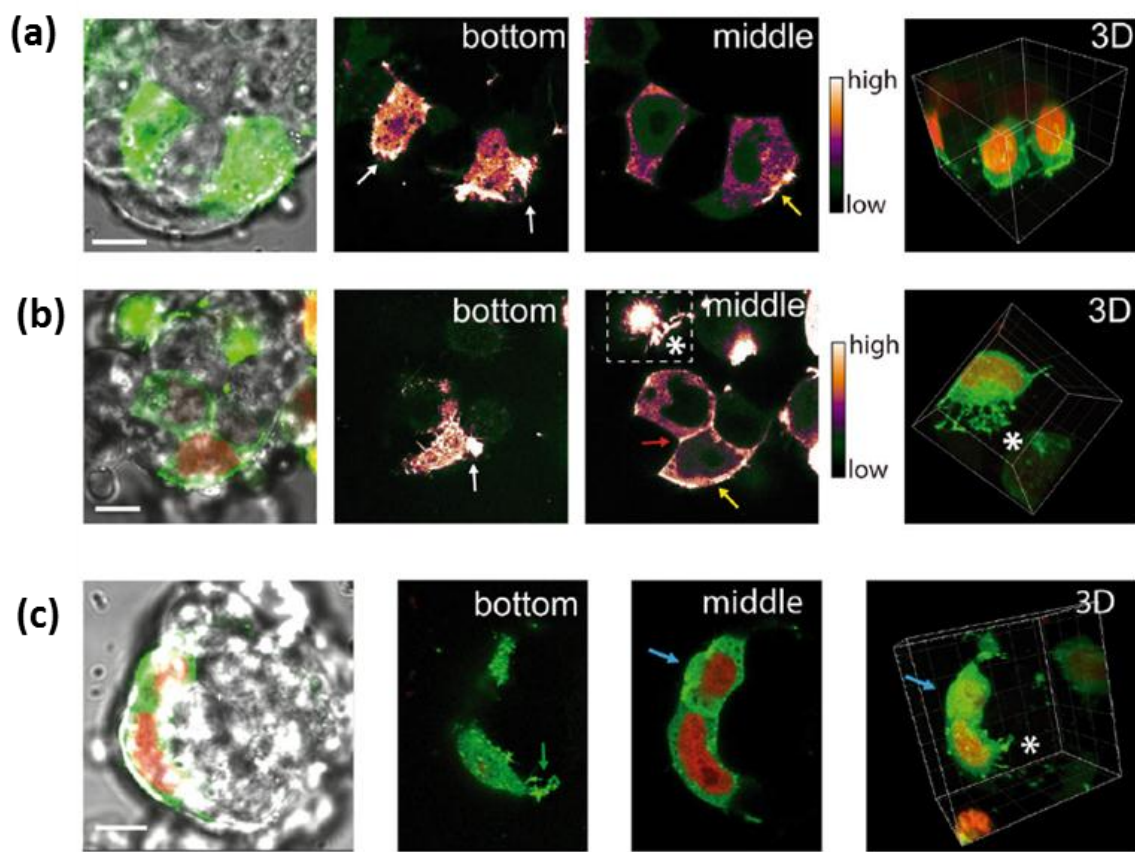


Figura 8.4. Distribución de la red de actina en CME. Imágenes representativas de microscopía confocal de células W4 expresando EGFP-actina (verde) y H2B-mCherry (rojo). Panel izquierdo: Imágenes superpuestas de los canales de transmisión, verde y rojo, obtenidas en un plano óptico que permite la identificación de la posición relativa de las células cotransfectadas en la colonia **(a-c)**. Panel central: Imágenes obtenidas en distintos planos (*bottom*, *middle*) con una escala en pseudocolor para la concentración de actina **(a-b)**; imágenes obtenidas en dos planos (*bottom* y *middle*) donde se señalan filopodios (flecha verde) y *blebs* de la membrana (flecha celeste) **(c)**. Panel derecho: Reconstrucciones 3D de las imágenes obtenidas en los canales verde y rojo **(a-c)**. Las flechas blancas indican estructuras enriquecidas en actina en contacto con el sustrato, las flechas rojas en contactos célula-célula y las verdes, en filopodios. Las flechas celestes señalan a una célula en la periferia de la colonia con deformaciones de membrana, las amarillas señalan regiones de las células que miran hacia el medio extracelular, en el borde de la colonia. Los asteriscos blancos indican la presencia de filopodios enriquecidos en actina. Barras de escala, 10 μm . Adaptado de ²⁸⁰.

Las imágenes (Figura 8.4) muestran un enriquecimiento en actina en los contactos célula-célula (flecha roja, 65% de 195 células) donde probablemente interactúe con moléculas relacionadas con la adhesión celular ⁴¹⁷. Por otra parte, visualizamos filopodios (flechas verdes, 68% de 88 células), protrusiones de pequeña longitud enriquecidas en actina en contacto con el sustrato (flechas blancas, 83% de 88 células) y protrusiones en células de los bordes de la

colonia; estos filopodios también están presentes, aunque en menor proporción (41% de 107 células), en células del interior de la colonia. Nuestras imágenes no permiten visualizar filamentos aislados o manojos de filamentos, en línea con observaciones previas⁴¹⁸.

Antecedentes en hiPSC (Capítulo 1, Sección 1.4) muestran que la red de actina forma una estructura similar a una valla o cerco, formada por fibras de actina gruesas que se organizan paralelas a los bordes de las colonias, empaquetándolas^{245,418}. Nuestros estudios no muestran esta estructura supramolecular en CME de ratón. Esta diferencia en la organización de la red de actina puede deberse a diferencias entre las especies humana y ratón; específicamente, las CMP humanas presentan mayores fuerzas de tracción entre las células y la matriz extracelular⁴¹⁹.

Por otro lado, observamos protrusiones enriquecidas en actina que se extienden de una célula a otra vecina (asteriscos blancos, 23% de 195 células), similares a las estructuras de filopodios observadas durante el desarrollo embrionario de ratón, como discutiremos más adelante.

En algunas células localizadas en los bordes de las colonias (flechas celestes, 13% de 88 células) observamos deformaciones de la membrana o *blebs*. En el Capítulo 3 (Sección 3.2.1.2), describimos que la actina cortical de CME se organizaría como una red isotrópica de baja densidad, independiente de la actividad de la miosina II²⁴¹. Esto sugiere que, dentro de la colonia, algunas células aplican fuerzas sobre sus vecinas mediante los filopodios descritos y/o por fuerzas laterales, lo que puede liberar tensión provocando la disrupción local de la red de actina cortical, generando dichos *blebs*. Otras estructuras similares se observan por la rotura producida en la corteza de actina cuando células adheridas son separadas de su sustrato⁴²⁰. Por otro lado, la presencia de *blebs* aumenta en CME durante la salida de la pluripotencia, proceso en el que ocurren cambios en la tensión de la membrana^{221,246}.

A continuación, nos concentramos en caracterizar la red de vimentina, por lo que cotransfectamos células W4 con un plásmido que codifica vimentina fusionada a GFP (GFP-vimentina)³⁵² junto al vector para H2B-mCherry. La Figura 8.5 muestra un ejemplo representativo de reconstrucciones 3D obtenidas a partir de imágenes de microscopía confocal de estas células en varios planos sucesivos.

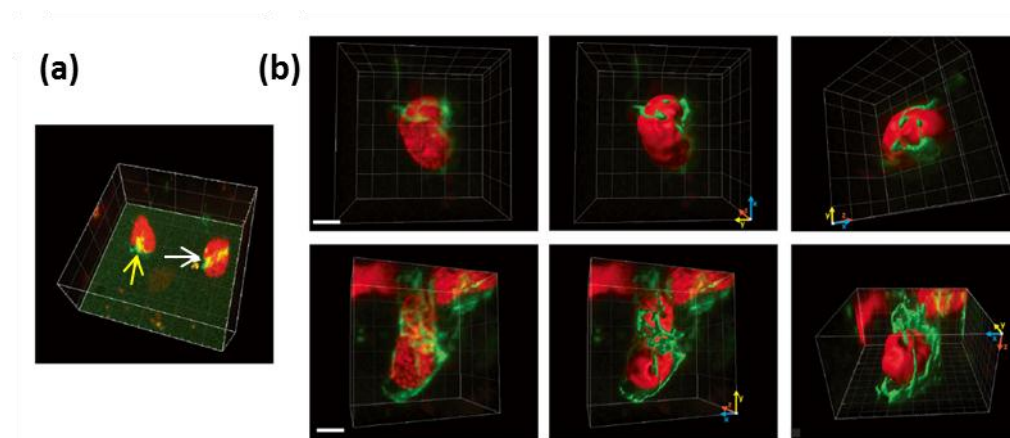


Figura 8.5. La red de vimentina se asocia al núcleo en células en interfase. Imágenes 3D representativas de células W4 expresando H2B-mCherry (rojo) y GFP-vimentina (verde). La flecha amarilla señala a una estructura de vimentina con forma de nudo alrededor de un núcleo, la flecha blanca señala una estructura con forma de anillo **(a)**. Reconstrucciones 3D de células expresando niveles relativamente bajos (panel superior) o intermedios (panel inferior) de GFP-vimentina mostrando una asociación cercana entre la red y el núcleo. Estas imágenes fueron segmentadas como se describe en el Capítulo 5 (Sección 5.6.3) **(b)**. Barras de escala, 5 μm . Adaptado de ²⁸⁰.

Observamos que la red de vimentina se localiza en contacto con el núcleo celular, formando anillos o "nudos" que rodean al núcleo (33% y 37% de 70 células, respectivamente), incluso en aquellas células que expresaban una concentración relativamente baja de GFP-vimentina. Esta observación sugiere que la asociación entre la red y el núcleo no es un artefacto de la sobreexpresión de la proteína de fusión.

Las estructuras con forma de anillo son similares a aquellas que se observan transitoriamente en las etapas iniciales de la adhesión de las células al sustrato y durante la separación de la célula del sustrato que precede a la mitosis ²⁷⁶; este tipo de estructuras podrían estar presentes en células con una morfología poco extendida.

Es importante destacar que, aunque la red de vimentina no puede generar fuerzas por sí misma, las estructuras de este filamento intermedio que rodean al núcleo podrían contribuir en la morfología de la organela ²⁷⁶. En este sentido, se ha descrito que la vimentina forma una "jaula" perinuclear que confiere rigidez al núcleo, protegiéndolo de deformaciones mecánicas en otras líneas celulares ^{227,279} (Capítulo 3, Sección 3.2.3.2).

8.3 La forma y el tamaño del núcleo son modulados por las redes de actina y vimentina.

Dado que las fuerzas, ya sea generadas o transmitidas por el citoesqueleto, pueden modular la forma del núcleo y su volumen^{421,422}, nos propusimos estudiar qué redes del citoesqueleto se encuentran vinculadas al mantenimiento de la morfología nuclear en CME. Para ello, analizamos esta morfología luego de interferir las distintas redes mediante el tratamiento con drogas o la transfección de mutantes dominantes negativas.

Para estos experimentos, utilizamos la línea W4 YPet-OCT4 y segmentamos los núcleos a partir de las imágenes obtenidas del TF fluorescente. En primer lugar, analizamos si los diferentes tratamientos tienen un efecto sobre la morfología general de las células y las colonias y a continuación, estudiamos la morfología nuclear. Para ello, cuantificamos los volúmenes y esfericidades de los núcleos; este último parámetro se aproxima a un valor de 1 cuando el núcleo se asemeja más a una esfera y disminuye con su deformación (Capítulo 5, Sección 5.6.3, Ecuación 5.9).

Para depolimerizar los filamentos de actina, incubamos las células con latrunculina-B³⁶⁰ en las condiciones detalladas en el Capítulo 5 (Sección 5.3). La Figura 8.6 muestra que las células se redondean luego de este tratamiento y los contactos célula-célula disminuyen, tal como es de esperar dado el involucramiento de la actina en las adhesiones célula-célula y célula-sustrato^{416,417}.

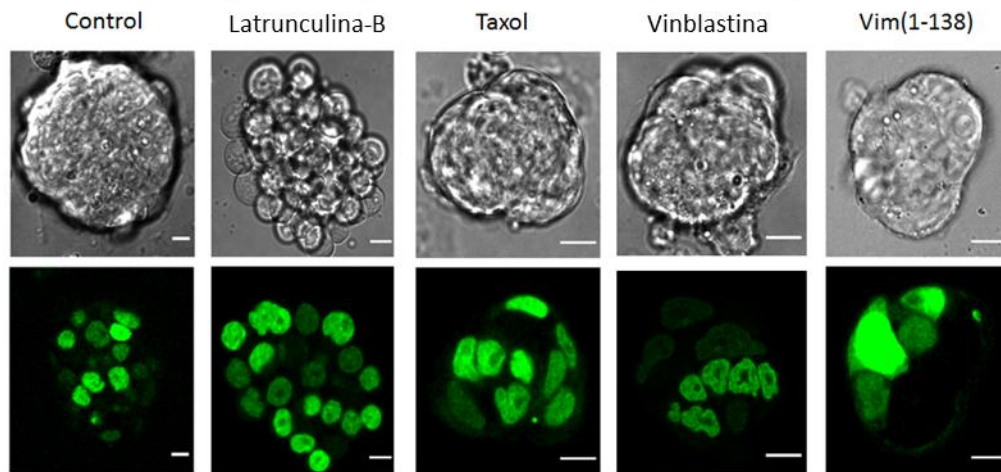


Figura 8.6. Morfología de las colonias de CME luego de los diferentes tratamientos que perturban el citoesqueleto. Imágenes representativas de transmisión (panel superior, gris) y confocal (panel inferior, verde) obtenidas simultáneamente para células W4 YPet-OCT4 tratadas con latrunculina-B, taxol o vinblastina y células W4 transfectadas con GFP-Vim(1-138). La última imagen fue saturada digitalmente para facilitar la visualización de células en otros planos focales. Barras de escala, 10 μ m. Adaptado de²⁸⁰.

Por otra parte, utilizamos dos tratamientos distintos para producir interferencias en la dinámica red de microtúbulos. En una primera instancia, utilizamos paclitaxel (también conocida como taxol), un compuesto que estabiliza los microtúbulos reduciendo la velocidad de despolimerización ^{423,424}. Además, tratamos a las células con vinblastina, que inhibe la polimerización al recubrir los extremos positivos de los microtúbulos ⁴²⁵.

A diferencia de lo observado en el tratamiento con latrunculina-B, la morfología de las colonias se preservó cuando la dinámica de los microtúbulos es interferida (Figura 8.6).

Dada la ausencia de agentes farmacológicos que permitan depolimerizar selectivamente la red de vimentina, utilizamos una mutante dominante negativa de vimentina (vim 1-138) fusionada a GFP que impide la polimerización de los filamentos de vimentina ³⁵². Esta construcción contiene la cabeza y el dominio alfa-helicoidal 1A de vimentina y la GFP unida a su extremo N-terminal. Dado que esta mutante se encuentra fusionada a una proteína fluorescente verde, debimos realizar el estudio de la morfología nuclear en la línea parental W4 en lugar de la W4 YPet-OCT4. Por esta razón, cotransfectamos las células con a H2B-mCherry para poder realizar la segmentación de los núcleos. La Figura 8.6 muestra que la transfección de esta mutante no afectó la morfología de la colonia.

La Figura 8.7 compila los resultados cuantitativos obtenidos en la caracterización de las morfologías nucleares en las distintas condiciones experimentales.

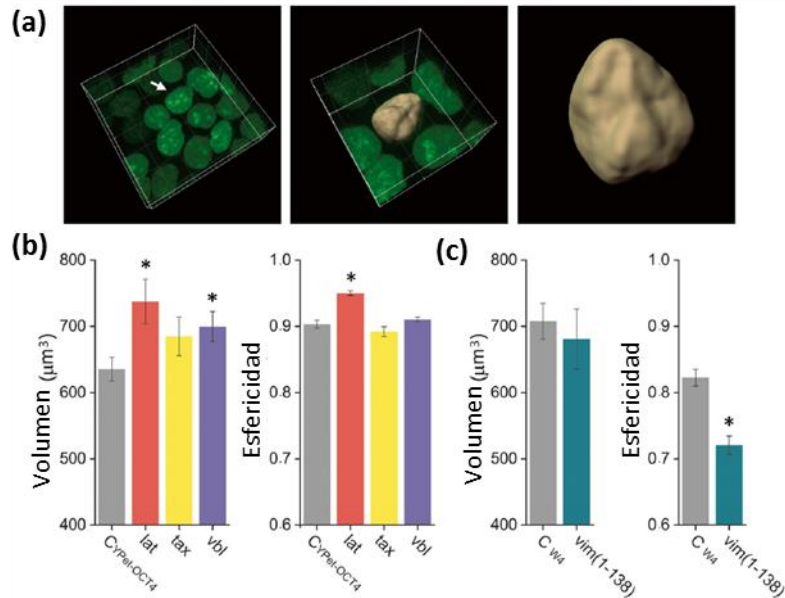


Figura 8.7. El citoesqueleto modula la morfología nuclear en CME. Reconstrucciones 3D representativas de una región de una colonia de células W4 YPet-OCT4. Los núcleos fueron segmentados para cuantificar el volumen nuclear y su esfericidad; a modo de ejemplo, la flecha blanca señala un núcleo segmentado de la colonia, el cual se muestra con mayor zoom en el panel del medio y el derecho (a). Cuantificación del volumen nuclear y esfericidad para células control ($C_{YPet-OCT4}$) y para células incubadas con latrunculina-B (lat), taxol (tax), o vinblastina (vbl) (b). Volumen y esfericidad nuclear para células W4 expresando H2B-mCherry (C_{W4}) o coexpresando H2B-mCherry y (vim(1-138)) (c). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar para cada condición experimental. El número de células analizadas para cada condición fue: $C_{YPet-OCT4}$ = 165, nlat = 55,ntax = 58, nvbl = 146, C_{W4} = 32 y vim(1-138) = 55. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control correspondiente ($p < 0.05$). Adaptado de ²⁸⁰.

Nuestros resultados (Figura 8.7) muestran que la depolimerización de actina provoca un aumento significativo del volumen y la esfericidad celular de CME. Por otra parte, los tratamientos con taxol y vinblastina no producen cambios significativos en la esfericidad, sólo se observa un leve aumento (~ 3%) en el volumen celular al inhibir la polimerización de los microtúbulos. Finalmente, la disrupción de la red de vimentina provoca una disminución significativa de la esfericidad del núcleo respecto al control (células W4 expresando H2B-mCherry).

Es importante destacar que los valores obtenidos para los diferentes controles pueden diferir entre sí por la rutina de segmentación automática usada y/o a que utilizamos la fluorescencia de proteínas que emiten en distintas regiones espectrales para la segmentación de los núcleos (YPet-OCT4 y H2B-mCherry). Si se consideran estas diferencias en la emisión y objetos relativamente pequeños, se prevé que el radio un mismo objeto sea un ~12 % mayor al visualizar mCherry en lugar de YPet y, como consecuencia, el volumen resulta un ~37 % mayor (Figura 8.7c).

Los resultados obtenidos sugieren que en CME, al igual que en otras líneas celulares ⁴²², la red de actina se encuentra involucrada en el mantenimiento de la morfología celular y nuclear como fue sugerido en trabajos previos en fibroblastos ⁴²². Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la red de microtúbulos no modularía la morfología del núcleo. Finalmente, verificamos que la red de vimentina presenta un rol relevante en la morfología nuclear, probablemente protegiéndolo de la acción de fuerzas, tal como se verificó en otras líneas celulares ^{227,279} (Capítulo 3, Sección 3.2).

8.4 Las redes de actina y de vimentina modulan la organización dinámica de OCT4

En la sección anterior mostramos que las redes de actina y vimentina modulan la morfología nuclear. Por otro lado, en el Capítulo 7 demostramos que las interacciones TF-cromatina responden rápidamente a señales de diferenciación, en particular, las interacciones OCT4-cromatina se modificarían al comienzo de la diferenciación (Sección 7.3). Por estos motivos, nos preguntamos si dichas redes podrían estar involucradas en la transmisión de fuerzas mecánicas que, en última instancia, afecten las interacciones de los TFs de pluripotencia con la cromatina.

Para probar esta hipótesis, analizamos si interferir los diferentes componentes del citoesqueleto afectan la dinámica de interacción de OCT4 con la cromatina. Para esto realizamos experimentos de FCS (Sección 5.5.1) en células W4 YPet-OCT4 en condiciones control, expresando la mutante dominante negativa vim(1-138), o tratadas con latrunculina-B para depolimerizar la actina (Figura 8.8).

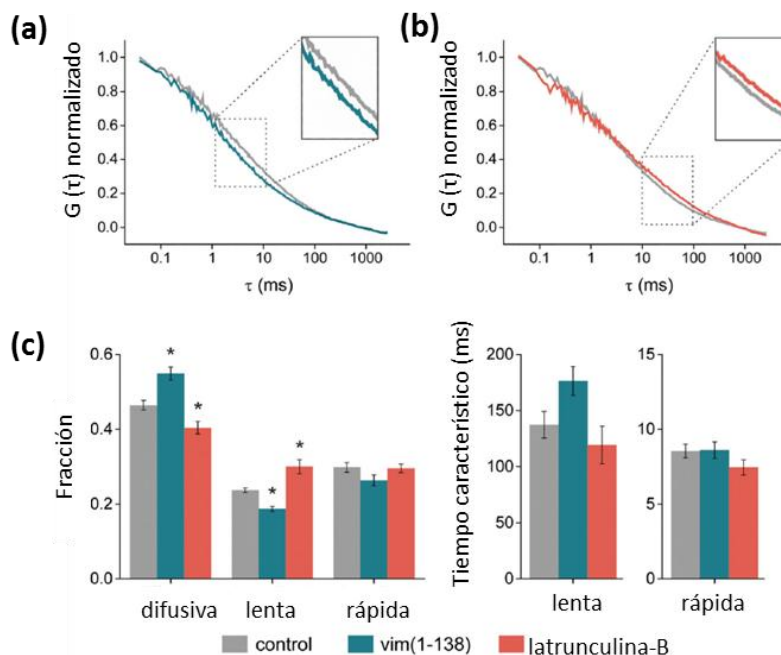


Figura 8.8. Las interacciones OCT4-cromatina son moduladas por las redes de actina y vimentina. Curvas ACF promedio obtenidas en el nucleoplasma de células sin tratar (gris, control), transfectadas con la mutante dominante negativa de vimentina (verde, vim(1-138)) o tratadas con latrunculina-B (naranja, latrunculina-B), (a-b) La Ecuación 5.3 fue ajustada a los datos experimentales para obtener la fracción difusiva y las fracciones correspondientes a las interacciones lentas y rápidas, junto a sus tiempos característicos. Los resultados experimentales son expresados como la media $\pm$ error estándar. El número de células analizadas para cada condición fue de 17 (control), 17 (vim(1-138)) y 12 (latrunculina-B) (c). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.01$). Adaptado de ²⁸⁰.

La Figura 8.8 muestra que las alteraciones producidas en las redes de actina y vimentina modifican la dinámica de OCT4 en sentido opuesto.

En particular, se observa una menor fracción de moléculas del TF interactuando con los sitios lentos y un aumento en la fracción de moléculas difundiéndose libremente luego de impedir la polimerización de vimentina. En base a estos resultados y los mostrados en el Capítulo 7, hipotetizamos que los filamentos intermedios podrían proteger al núcleo de estímulos mecánicos, contribuyendo al mantenimiento de las interacciones OCT4-cromatina y, por lo tanto, a la pluripotencia. En un sentido opuesto, observamos que la depolimerización de la red de actina promueve un aumento en la fracción de moléculas del TF unido a sitios lentos y una disminución en la fracción de moléculas difundiéndose. Este resultado sugiere que la actina podría estar contribuyendo a la transmisión de señales mecánicas al núcleo, lo que afectaría las interacciones OCT4-cromatina promoviendo la disociación de OCT4 de la cromatina.

Nuestros resultados sugieren que las redes de actina y vimentina modularían el *paisaje* de interacciones de OCT4 con la cromatina, lo que en última instancia podría impactar en los programas transcripcionales y, consecuentemente, en la preservación de la pluripotencia.

8.5 Conclusiones

En el Capítulo 3 hemos mencionado que las fuerzas mecánicas transmitidas por el citoesqueleto regulan numerosos aspectos de las funciones celulares^{239,426,427}. En particular, describimos que aquellos estímulos mecánicos transmitidos hacia el núcleo pueden regular propiedades de la organela como la morfología y sus funciones internas, incluyendo la organización de la cromatina y la regulación transcripcional^{266,428–432}, modulando en última instancia el destino celular y guiando procesos de desarrollo^{224,336}.

En este capítulo exploramos y caracterizamos la distribución tridimensional del citoesqueleto en CME vivas, permitiendo visualizar aspectos no revelados en estudios previos que describen imágenes bidimensionales de células fijadas²²⁹.

Observamos que la red de microtúbulos presenta una organización diferente a la comúnmente observada en células terminalmente diferenciadas (i.e. estructura en forma de estrella, Figura 3.5). Esta red se extiende en el citoplasma presentando algunos centros de nucleación o MTOCs de estructura desconocida. Además, detectamos protrusiones hacia células vecinas enriquecidas en microtúbulos; especulamos que estas estructuras contribuyen a mantener las células unidas dentro de la colonia y están involucradas en la comunicación célula-célula, de manera similar a lo observado en la línea germinal de *Drosophila* o embriones de *Drosophila* y Zebrafish⁴³³. Finalmente, nuestros resultados sugieren que los microtúbulos no presentarían un rol relevante en la definición del tamaño y la forma del núcleo.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la red de filamentos de actina presenta una estructura difusa en el citoplasma y se concentra en regiones de contactos célula-célula y célula-sustrato, una característica esperada de acuerdo a su rol en ambos tipos de interacciones⁴¹⁶. En nuestro estudio, también detectamos filopodios enriquecidos en actina que se asemejan a aquellos observados en estadios tempranos de embriones de ratón³⁴⁹ (Capítulo 3, Sección 3.7). En estos embriones, los filopodios se extienden de una célula hacia la membrana apical de sus vecinas y están involucrados en el control de los cambios en la morfología de dichas células; su estructura es tan relevante que la disrupción molecular de sus componentes interfiere con la compactación³⁴⁹. Los autores proponen que los filopodios adheridos a la membrana apical generan la tensión necesaria para acercar a sus células vecinas³⁴⁹.

Por otro lado, observamos que la red de actina podría estar involucrada en el acoplamiento entre la morfología nuclear y celular ya que su depolimerización provoca un aumento tanto en el volumen como en la esfericidad del núcleo y de la célula. Estos resultados concuerdan con reportes en otros tipos celulares como fibroblastos⁴²², células madre mesenquimales⁴³⁴ y células somáticas epiteliales⁴³⁵.

Por otra parte, encontramos que la red de vimentina se concentra alrededor del núcleo formando anillos o “nudos” y también modula la morfología de dicha organela. Este resultado es consistente con trabajos previos que sugieren una comunicación mecánica entre estos

filamentos intermedios y otros elementos del citoesqueleto, modulando la transmisión de estímulos mecánicos hacia el núcleo, protegiéndolo de estrés mecánico^{436–438}.

Utilizando FCS, detectamos que la depolimerización de actina induce cambios en las interacciones OCT4-cromatina. En particular, observamos un aumento en la fracción de este TF interactuando con los sitios lentos con una concomitante reducción en la fracción de moléculas difundiendo. Estas observaciones sugieren que la actina, mediante la transmisión de fuerzas al núcleo, podría modular las interacciones entre TFs y la cromatina. En este sentido, señales mecánicas transmitidas a través de esta red podrían contribuir a la regulación de la pluripotencia y/o la inducción de cambios en la identidad celular.

Estos resultados van en línea con trabajos previos en CME que vinculan el mantenimiento de la pluripotencia con la conexión física entre la red de actina y el núcleo²⁴². Asimismo, se reportó que la corteza de actina-miosina supracelular genera fuerzas que se transmiten al interior de colonias de CME y contribuyen al mantenimiento de su morfología y a la regulación de la expresión de TFs de pluripotencia²²⁰. Un trabajo reciente en embriones tempranos muestra que la comunicación entre la lámina nuclear y la red de actina define la especificación de los linajes celulares en el primer evento de diferenciación³⁴⁶. Esta y otras evidencias sugieren que la actina contribuye a mantener las células unidas dentro de la colonia y que la transmisión de fuerzas a través de esta red sería crucial para la regulación de la pluripotencia y el desarrollo embrionario.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la disrupción de la red de vimentina promueve una disminución de la fracción de moléculas de OCT4 interactuando con la cromatina en los sitios lentos con un concomitante aumento de la fracción de moléculas difundiendo libremente. Estos resultados sugieren que, aunque los filamentos intermedios no produzcan fuerzas *per se*⁴³⁹, la red de vimentina podría influenciar las interacciones OCT4-cromatina por otros mecanismos. En el Capítulo 7 mostramos que, en los primeros estadios de la diferenciación, una proporción menor de moléculas de OCT4 interactúan con la cromatina y permanecen menos tiempo unidas a los sitios lentos y rápidos. En este contexto, hipotetizamos que la red de vimentina protege al núcleo de deformaciones y contribuye a la preservación del estado pluripotente en CME. En línea con esta hipótesis, diversos trabajos correlacionan altos niveles de expresión de vimentina con restricciones a la diferenciación durante el desarrollo y en contextos tumorales^{440–444}.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el citoesqueleto posee un rol crucial en la comunicación de señales mecánicas al núcleo de CME, lo que influye tanto en la morfología de esta organela como en el *paisaje* de las interacciones con la cromatina del TF pluripotencia OCT4, regulando muy probablemente la pluripotencia y el destino celular.

Capítulo 9: Rol del citoesqueleto en la distribución subcelular y nuclear de OCT4

9.1 Introducción

En el capítulo anterior, mostramos que ciertas redes del citoesqueleto modulan la morfología celular y nuclear de las CME y las interacciones dinámicas de OCT4 con la cromatina. A su vez, en el Capítulo 6 observamos que la distribución nuclear de OCT4 y SOX2 cambia durante las primeras horas de inducida la diferenciación. Además, en el Capítulo 3 describimos que los distintos filamentos del citoesqueleto se encuentran físicamente conectados al núcleo, por lo que las fuerzas mecánicas transmitidas por sus diferentes redes podrían modificar diversos aspectos de la organización de las proteínas nucleares. Entre otros factores, estas fuerzas pueden alterar la permeabilidad de los poros nucleares modulando, a su vez, la dinámica de importación núcleo-citoplasma de TFs. Por otro lado, ciertos coactivadores como YAP, se transportan hacia el núcleo transportados a lo largo de microtúbulos por el motor molecular dineína, favoreciendo una importación rápida^{253,254,445,446}.

Los antecedentes mencionados nos llevaron a preguntarnos si el citoesqueleto también regula la distribución nuclear de OCT4 y/o su distribución entre el núcleo y el citoplasma. En este capítulo, evaluamos dicha hipótesis cuantificando la distribución intracelular e intranuclear de YPet-OCT4 en condiciones en las cuales la función de las redes de actina o microtúbulos se encuentra alterada. Nos focalizamos en OCT4 dado que en los Capítulos 6 y 7 observamos que su distribución intranuclear e interacción con la cromatina son sensibles a señales de diferenciación.

9.2 La red de microtúbulos modula la partición núcleo-citoplasma de OCT4.

En primer lugar, decidimos estudiar la distribución de OCT4 entre el núcleo y el citoplasma de CME. Para ello, transfectamos células W4 YPet-OCT4 con un vector codificante del marcador de membrana mem-mCherry; la visualización de este marcador fluorescente es de suma utilidad para delimitar los compartimentos celulares en imágenes de microscopía confocal, tal como explicaremos más adelante. Las células fueron tratadas con latrunculina-B o nocodazol, drogas que promueven la depolimerización de las redes de actina y microtúbulos, respectivamente, como se detalla en el Capítulo 5 (Sección 5.3). Posteriormente, las células fueron observadas por microscopía confocal (Figura 9.1).

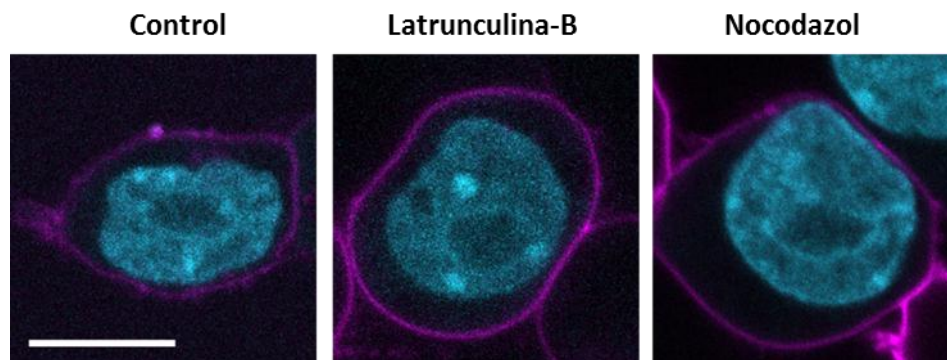


Figura 9.1. Células W4 YPet-OCT4 que expresan mem-mCherry. Imágenes representativas de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 (cian) expresando mem-mCherry (magenta) sin tratar (control) o incubadas con latrunculina-B o nocodazol. Barra de escala, 10 μm .

Para cada imagen obtenida, delimitamos el núcleo y el citoplasma utilizando las señales de YPet-OCT4 y el marcador de membrana, respectivamente, de acuerdo a los procedimientos descritos en el Capítulo 5 (Sección 5.6.2). Luego, calculamos la intensidad de fluorescencia media en cada compartimiento, que puede ser considerada directamente proporcional a la concentración de fluoróforo, si esta última es baja ⁴⁴⁷. Como mencionamos en el Capítulo 6, la concentración estimada para YPet-SOX2 es de $0.63 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ³⁸⁰, dentro del rango de lo calculado para los niveles de SOX endógeno ³⁸¹, y siguiendo la misma metodología (Sección 5.5.2, Ecuación 5.4) cuantificamos la concentración de YPet-OCT4 obteniendo un valor de $1.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$. Cabe destacar que, hasta el momento, no encontramos reportes donde calculen la concentración endógena de este TF para poder realizar una comparación.

La Figura 9.2 muestra una correlación positiva entre las intensidades de fluorescencia del TF en el núcleo y el citoplasma. La intensidad es aproximadamente un orden de magnitud menor en el citoplasma, indicando que la velocidad de importación al núcleo es mayor a la de exportación, tal como es de esperar dada la localización preferentemente nuclear de este TF descrita en bibliografía ⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰ y confirmada en nuestros trabajos previos ^{280,380}.

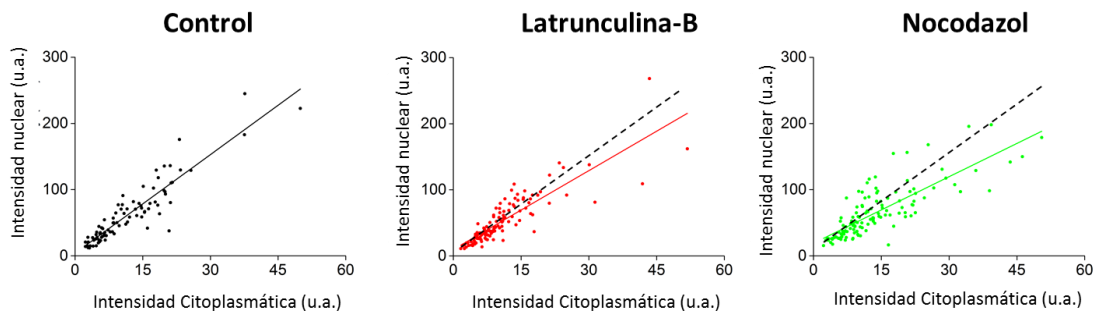


Figura 9.2. Relación entre las intensidades de YPet-OCT4 en el citoplasma y el núcleo en diferentes condiciones de integridad del citoesqueleto. Intensidad de fluorescencia nuclear en función de la citoplasmática en células W4 YPet-OCT4 en tres condiciones: sin tratamiento (control, negro), tratadas con latrunculina-B (rojo) o con nocodazol (verde). Los datos fueron ajustados con una ecuación lineal, la pendiente de las rectas obtenidas corresponde a Kp^* en cada condición. Los puntos representan células individuales, las líneas punteadas corresponden a la recta obtenida en condiciones control. El número de células analizadas fue de 89, 122 y 130 para el control y los tratamientos con latrunculina-B y nocodazol, respectivamente.

Dado que empíricamente observamos que la relación de fluorescencia del TF entre el núcleo y el citoplasma es aparentemente lineal, definimos el coeficiente de partición aparente (Kp^*) como la relación de concentraciones de OCT4 entre el núcleo y el citoplasma (Ecuación 9.1)

$$\text{Ecuación 9.1: } Kp^* = [\text{OCT4}] \text{ núcleo} / [\text{OCT4}] \text{ citoplasma}$$

Así, ajustamos los datos experimentales con una ecuación lineal y obtuvimos Kp^* como la pendiente de la recta. La Tabla 9.1 compila los parámetros obtenidos en cada caso.

condición	Kp^*	Ordenada al origen
control	6.36 ± 0.41	6.22 ± 3.06
latrunculina-B	6.45 ± 1.01	5.01 ± 7.01
nocodazol	$4.98 \pm 0.99^{**}$	11.14 ± 10.35

Tabla 9.1 Kp^* y ordenada al origen para células W4 YPet-OCT4 control o tratadas con latrunculina-B o nocodazol. Los asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El valor de Kp^* obtenido en células tratadas con nocodazol fue significativamente menor al obtenido para células sin tratar. Este resultado sugiere que la depolimerización de la red de microtúbulos produce una disminución relativa en la concentración nuclear de OCT4 respecto a

su concentración en el citoplasma, indicando que los microtúbulos podrían, directa o indirectamente, intervenir en el intercambio del TF entre estos compartimientos. Por otra parte, el valor de Kp^* obtenido en células tratadas con latrunculina-B no difiere significativamente al obtenido en células control, sugiriendo que la red de actina no participa en la distribución núcleo-citoplasmática del TF.

Según nuestro modelo (Ecuación 9.1), la ordenada al origen (intensidad de fluorescencia en el núcleo cuando la intensidad de fluorescencia en el citoplasma es cero) debería ser cero. La Tabla 9.1 muestra que, en el caso de las células tratadas con latrunculina-B, esta condición se cumple. Si bien la ordenada al origen es cercana a cero para las células control o las tratadas con nocodazol, el intervalo de confianza de la ordenada no incluye al cero. Esta pequeña desviación del valor esperado podría deberse a la autofluorescencia de las células, la cual no fue considerada en este análisis.

Nuestras observaciones sugieren que la concentración nuclear de OCT4 podría ser modulada en la escala temporal de los experimentos realizados, esto es, entre 30 y 50 minutos. En este sentido, el proceso de importación/exportación de OCT4 podría ser un mecanismo relativamente rápido que permita regular su concentración nuclear y, en consecuencia, su disponibilidad para interactuar con sus sitios blanco en el DNA.

Para evaluar experimentalmente si la dinámica de intercambio del YPet-OCT4 entre el núcleo y el citoplasma es relativamente rápida, realizamos experimentos en los cuales fotoblanqueamos las moléculas de YPet-OCT4 en el citoplasma (Capítulo 5, Sección 5.6.3.) y analizamos la intensidad de fluorescencia en el núcleo luego del fotoblanqueo.

Específicamente, adquirimos imágenes 3D de un campo de células W4 YPet-OCT4 transfectadas con el marcador de membrana mem-mCherry, para visualizar los límites celulares. Enfocamos el láser con alta potencia en un punto del citoplasma de una célula por aproximadamente 1 min, y volvimos a adquirir una imagen 3D del campo completo. Posteriormente, segmentamos todos los núcleos del campo (Figura 9.3) y calculamos la intensidad media antes y después del fotoblanqueo para cada núcleo. Para corregir los datos por el fotoblanqueo producido durante la adquisición de las imágenes seguimos los procedimientos detallados en la Sección 5.5.2.

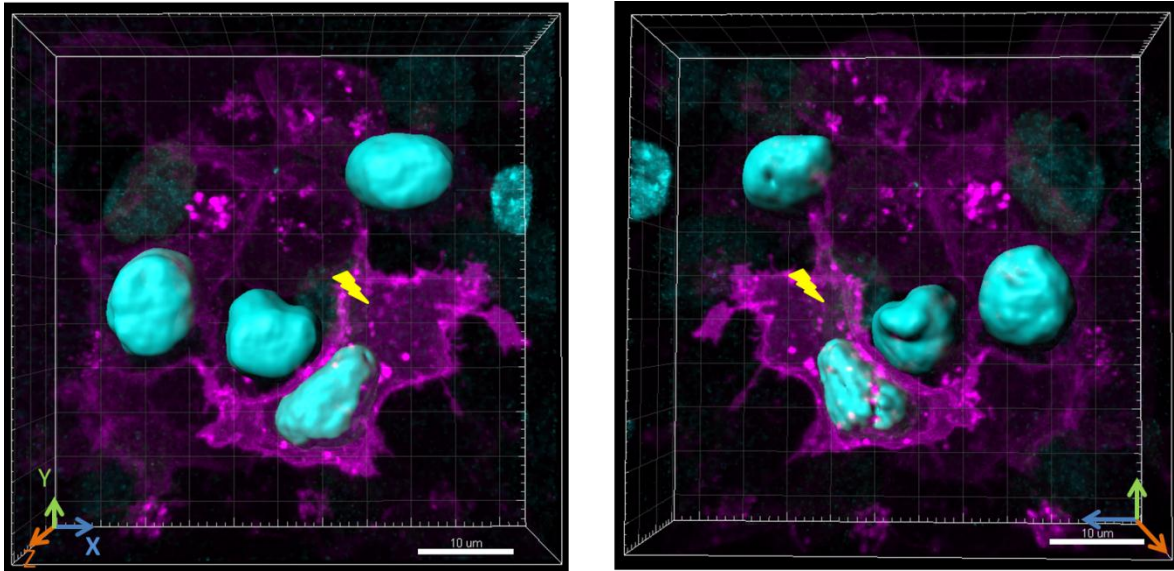


Figura 9.3. Reconstrucción 3D de células W4 YPet-OCT4 transfectadas con mem-mCherry. Los núcleos (cian) se segmentaron como se explica en el Capítulo 5 (Sección 5.6.3), la membrana plasmática se muestra en magenta. El rayo amarillo ilustra el lugar donde se enfocó el láser durante el fotoblanqueo. Se muestra la misma reconstrucción en 2 orientaciones diferentes para enfatizar que el fotoblanqueo se realizó en una región del citoplasma alejada del núcleo, por lo que descartamos que el láser esté irradiando a la organela. Barra de escala, 10 μm .

Nuestros resultados mostraron que la intensidad en el núcleo de células fotoblanqueadas fue del $31\% \pm 5\%$ (número de células = 20), indicando que el fotoblanqueo de YPet-OCT4 en el citoplasma produce una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia en el núcleo.

Para comprender las implicancias de estos resultados, consideramos dos situaciones para el intercambio núcleo/citoplasma esquematizadas en la Figura 9.4. En el primer caso, el intercambio de YPet-OCT4 entre los compartimientos es muy lento en comparación a la escala temporal del experimento (1 min); en consecuencia, la intensidad del núcleo se mantiene constante luego del fotoblanqueo del citoplasma. En el segundo caso, el intercambio se encuentra en la misma escala temporal del experimento por lo cual la fluorescencia del núcleo se reduce, ya sea por la exportación de moléculas fluorescentes de YPet-OCT4 nucleares y/o la importación de las moléculas fotoblanqueadas en el citoplasma.

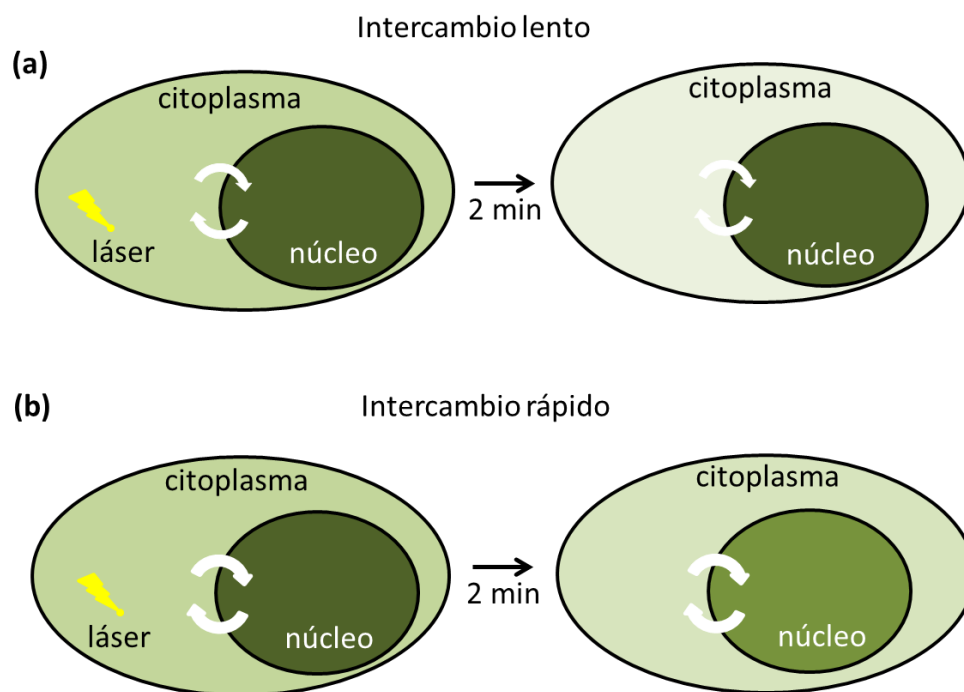


Figura 9.4. Esquema de los resultados esperados luego de fotoblanquear, en el citoplasma, una célula expresando YPet-OCT4, según la escala temporal de su intercambio núcleo-citoplasma. Se muestran los núcleos en verde oscuro y los citoplasmas en verde claro. El rayo amarillo indica la región donde se enfocó el láser y las flechas blancas el equilibrio de exportación-importación nuclear del TF **(a y b, izquierda)**. Luego del fotoblanqueo, si el intercambio de TF es lento, no hay una disminución en la intensidad de fluorescencia del núcleo y la intensidad en el citoplasma disminuye **(a, derecha)**. Por otro lado, si el intercambio está en la escala temporal del experimento, disminuye la intensidad de fluorescencia nuclear y levemente la intensidad en el citoplasma **(b, derecha)**.

Nuestros resultados experimentales muestran una reducción en la fluorescencia nuclear luego del fotoblanqueo, sugiriendo que el intercambio de OCT4 entre el núcleo y el citoplasma es relativamente rápido, ocurriendo en una ventana temporal inferior a los minutos.

9.3 La red de actina modula la distribución intranuclear de OCT4

Para estudiar cuantitativamente el rol del citoesqueleto en la distribución intranuclear de OCT4, tratamos a las células W4 YPet-OCT4 con latrunculina-B o nocodazol (Sección 5.3) y adquirimos imágenes confocales para visualizar la distribución del TF. La Figura 9.5 muestra ejemplos representativos de las imágenes obtenidas en estos experimentos.

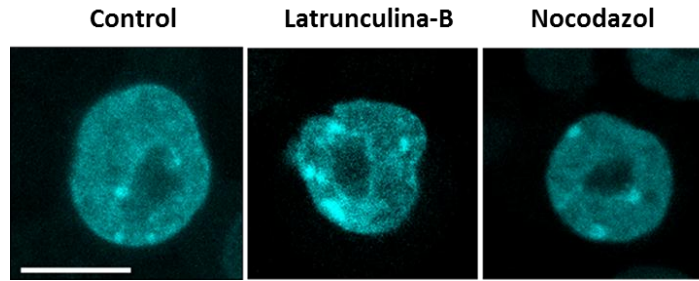


Figura 9.5. La depolimerización de actina promueve una reorganización de OCT4 dentro del núcleo. Imágenes representativas de microscopia confocal de células W4 YPet-OCT4 sin tratar (control) o células tratadas con latrunculina-B o nocodazol. Barra de escala, 10 μm .

Como punto de partida en el análisis, calculamos el porcentaje de células que presentan al menos 1 *focus* en cada condición estudiada. La Tabla 9.2 muestra que la depolimerización de actina y la de microtúbulos produjeron un aumento significativo en el número de células con *foci*. Este resultado sugiere que las redes de actina y microtúbulos modularían la formación de *foci* de OCT4.

Condición	Células con <i>foci</i> (%)
Control	87.2
latrunculina-B	98.6*
nocodazol	96.2*

Tabla 9.2. Proporción de células W4 YPet-OCT4 con *foci* según tratamiento. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$) usando el test de Marascuilo ³⁷⁶.

Por otra parte, cuantificamos la distribución nuclear de YPet-OCT4 en las diferentes condiciones utilizando los tres parámetros descritos en los Capítulos 6 y 5 (Sección 5.6.1); i.e., el coeficiente de variación (CV), el número de *foci* por núcleo y su intensidad relativa. Dado que en algunos casos observamos cualitativamente cambios en el tamaño de los *foci*, cuantificamos además el área del núcleo ocupada por *foci* (Sección 5.6.1). Debemos destacar que todas las propiedades de los *foci* se calcularon considerando únicamente a las células que presentaron estas estructuras.

La Figura 9.6 muestra un aumento significativo de todos los parámetros estudiados en células tratadas con latrunculina-B, sugiriendo que la distribución de YPet-OCT4 es más heterogénea en ausencia de una red de actina funcional. Por otro lado, la depolimerización de microtúbulos sólo produjo un leve aumento en el número de *foci* de OCT4.

En el Capítulo 8 (Sección 8.3) mencionamos que la depolimerización de actina resulta en un aumento pequeño (~13%) pero significativo del volumen nuclear de las células.

Hipotéticamente, en ausencia de intercambio de YPet-OCT4 entre el núcleo y el citoplasma, este aumento del volumen produciría una disminución de la concentración nuclear del TF y, en consecuencia, una posible reducción en el número de moléculas de TFs en *foci*. En este sentido, esperaríamos que el aumento de volumen nuclear promueva menores valores de algún/algunos de los parámetros en estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos para la distribución de OCT4, van en sentido opuesto, sugiriendo que debe haber otros factores involucrados en los cambios observados al depolimerizar la red de actina.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la red de actina modula la organización intranuclear de OCT4, promoviendo una distribución más homogénea del TF mientras que la red de microtúbulos parecería tener un rol menos relevante en su distribución.

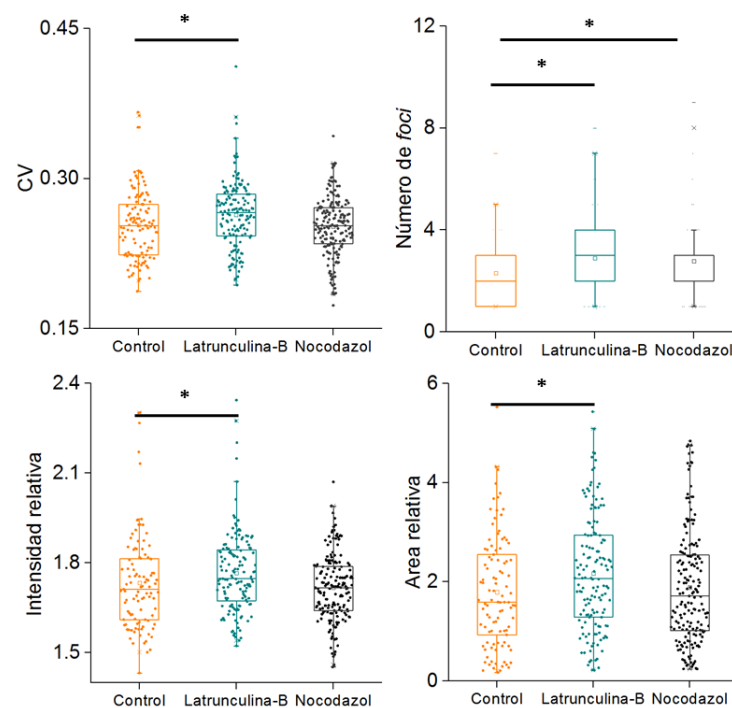


Figura 9.6. La depolimerización de actina provoca una distribución más heterogénea de OCT4. Análisis cuantitativo de la distribución nuclear de YPet-OCT4. Se obtuvo el coeficiente de variación (CV), el número de *foci*, la intensidad y el área relativa de los *foci* (Sección 5.6.1). Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0.05$). El número de células analizadas fue de 117, 146 y 182, para el control y los tratamientos latrunculina-B y nocodazol, respectivamente.

En el Capítulo 6 (Sección 6.4) describimos que los *foci* de OCT4 colocalizan con aquellos de la histona H2B, por lo que decidimos evaluar si los cambios en la distribución nuclear del TF, observados en la Figura 9.6, se relacionan con cambios en la organización de la cromatina. Con este fin, tomamos imágenes de microscopía confocal de células W4 YPet-OCT4 transfectadas con el vector que codifica para H2B-mCherry y las tratamos con latrunculina-B o nocodazol. La

Figura 9.7 muestra que, en contraste con lo observado para el TF, la depolimerización de actina promueve una disminución significativa en el número de *foci* de H2B y en su área relativa. Por otro lado, la depolimerización de microtúbulos no provoca cambios en la distribución de la histona.

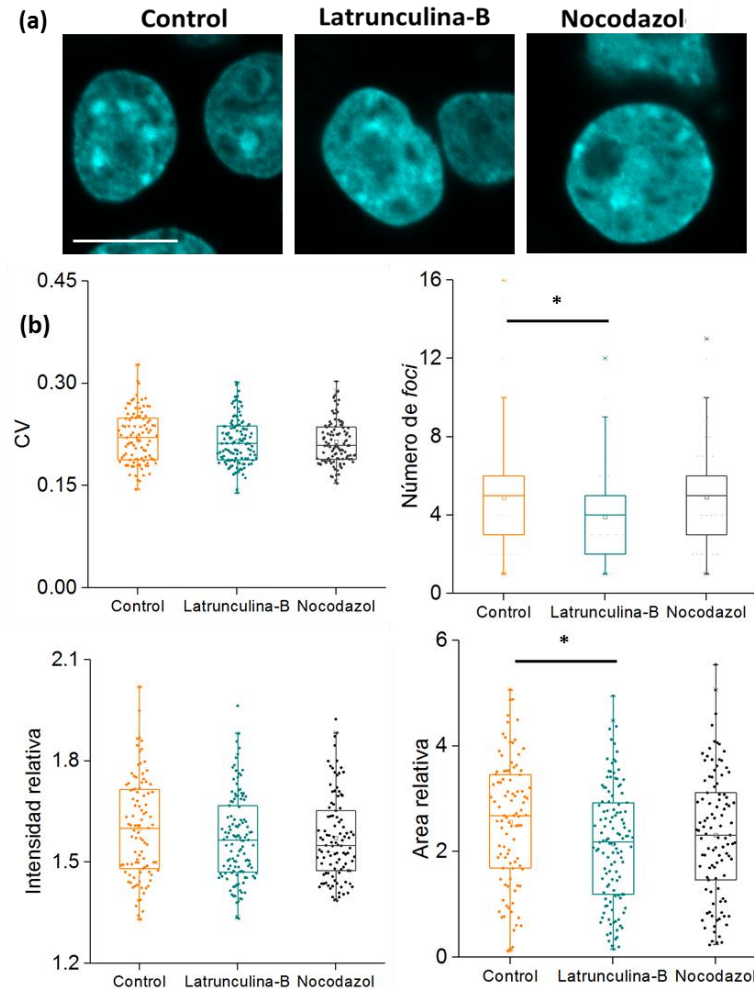


Figura 9.7. La depolimerización de la red de actina provoca una reducción en el número de *foci* de H2B y en su área relativa. Imágenes confocales representativas de células W4 YPet-Oct4 transfectadas con H2B-mCherry sin tratar (control), o tratadas con latrunculina-B o nocodazol. Barra de escala, 10 μm **(a)**. La distribución nuclear de H2B fue analizada cuantitativamente como se describe en el Capítulo 5 (Sección 5.6.1) para obtener el coeficiente de variación (CV), el número de *foci*, su intensidad y área relativas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) **(b)**. El número de células analizadas fue de 97, 127 y 103, para el control y los tratamientos con latrunculina-B y nocodazol, respectivamente.

Estos resultados indican que los cambios observados en la distribución de OCT4 luego de depolimerizar la red de actina, no pueden ser explicados por aquellos observados en la distribución de H2B, sugiriendo que existirían otros factores, además de la organización de la

cromatina -sensada por la visualización de esta histona- que promoverían los cambios en la distribución del TF.

9.4 Conclusiones

En el Capítulo 3 describimos que las fuerzas transmitidas por las distintas redes del citoesqueleto hacia el núcleo modulan diversos procesos de dicha organela³³⁴. Estos estímulos mecánicos son cruciales durante el desarrollo, en el mantenimiento de la homeostasis celular²¹⁹ y están involucrados en diversos procesos celulares como la migración, morfogénesis, el destino celular y la respuesta inmune⁴⁵¹.

Se ha demostrado que fuerzas mecánicas transmitidas por el citoesqueleto pueden modular la traslocación de ciertos TFs y, consecuentemente, regular la transcripción. Por ejemplo, OCT4 tiene una localización principalmente citoplasmática en embriones tempranos de ratón hasta el estadio de 4 células y luego trasloca mayoritariamente al núcleo; resultando dicha traslocación necesaria para el desarrollo correcto del embrión⁴⁵². Por otro lado, el estiramiento mecánico de CME humanas actúa como un estímulo de diferenciación y promueve la traslocación de OCT4 y NANOG (pero no de SOX2) desde el núcleo hacia el citoplasma, promoviendo un incremento en la expresión de marcadores de ectodermo y una disminución de marcadores de endo y mesodermo⁴⁵³. Finalmente, ciertas mutaciones en OCT4 que afectan su traslocación núcleo-citoplasma, disminuyen el potencial de reprogramación de células MEF⁴⁴⁹.

Debemos destacar que, a pesar de que estos resultados sugieren que la traslocación de TFs de pluripotencia sería relevante para definir el destino celular de células madre, aún se desconocen aspectos esenciales de los mecanismos involucrados en la distribución núcleo-citoplasma de dichos TFs.

En este capítulo, observamos que la red de microtúbulos modularía la importación-exportación nuclear de OCT4. Por otro lado, estimamos que su intercambio núcleo-citoplasma estaría en una escala temporal inferior a los minutos. De esta manera, nuestros resultados sugieren que fuerzas mecánicas transmitidas por el citoesqueleto modulan, directa o indirectamente, la traslocación nuclear del TF, lo que podría ser relevante para la preservación de la pluripotencia y/o la diferenciación de CME de ratón.

En la literatura, se han descrito diversos mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en esta modulación. Por un lado, se ha observado que ciertos TFs son transportados por el motor dineína a lo largo de microtúbulos hacia el núcleo celular^{253,254,445,446} regulando la actividad transcripcional. Por ejemplo, el coactivador mecanosensible YAP es transportado por dineína y su traslocación al núcleo es modulada por señales mecánicas, como la rigidez del sustrato y la contracción de actina-miosina⁴⁵⁴. Además, se ha propuesto que las fuerzas mecánicas transmitidas al núcleo cambian las propiedades del NPC, volviéndolo más

permisivo²⁹⁴. Si bien actina sería la red protagonista en la transmisión de fuerzas hacia el NPC²⁹¹, otros reportes señalan que las dineínas, al moverse sobre los microtúbulos, también generan fuerzas que se transmiten hacia estos complejos²⁹².

Estos antecedentes apoyan nuestros resultados y la hipótesis de que la traslocación de OCT4 podría ser modulada por la red de microtúbulos, ya sea al actuar como vías de transporte activo o por la transmisión de fuerzas que podrían modificar la permeabilidad del NPC. Regular la concentración nuclear de este TF en el núcleo podría ser otro punto de control de la actividad transcripcional, relevante para el mantenimiento de la pluripotencia. Es necesario realizar experimentos adicionales para poder elucidar el mecanismo por el cual los microtúbulos modulan la traslocación del TF. Sin embargo, hasta la fecha no conocemos reportes que muestren si existe alguna relación entre OCT4 y los motores moleculares asociados a microtúbulos.

Por otra parte, en este capítulo exploramos si las redes de actina y microtúbulos modulan la distribución nuclear del TF. Nuestros resultados muestran que la depolimerización de los microtúbulos provoca un leve aumento en el número de *foci* de OCT4, mientras que la de actina promueve una distribución más heterogénea del TF, con un aumento en el número de *foci*, su intensidad y área relativa. Estos resultados sugieren que la red de actina contribuiría a definir la distribución intranuclear de OCT4.

En este sentido, se ha propuesto que los condensados nucleares serían capaces de sensar el entorno mecánico local⁴⁵⁵. En particular, las fuerzas que se producen durante el crecimiento de oocitos de ratón producen cambios en la cinética del remodelado y la cinética molecular interna de distintos condensados nucleares, tales como los *speckles*⁴⁵⁶. Además, ensayos *in vitro* e *in vivo* muestran que las fuerzas transmitidas por el citoesqueleto, en particular por la red de actina, pueden deformar y disgregar condensados o promover su ensamblado⁴⁵⁷. A su vez, en células del sistema inmune (Jukart T), se ha probado que las fluctuaciones térmicas de la actina cortical correlacionan negativamente con la separación de fases líquido-líquido de los nucléolos⁴⁵⁸.

En conjunto, estas evidencias apoyan nuestros resultados que sugieren que las fuerzas transmitidas, en particular por la red de actina, modularían la formación de condensados de OCT4. Como discutimos en el Capítulo 6, los condensados pueden presentar heterogeneidades dentro de sí mismos^{134,400,401} y a través de la microscopía confocal no es posible resolver su organización interna. Las fuerzas mecánicas que modulan los condensados (i.e. composición, tamaño) podrían afectarlos total y ubicua o parcialmente, modificando distintas regiones internas de dichos *foci*. Por otro lado, en nuestro modelo no hemos evaluado aspectos de los condensados de OCT4 reportados en bibliografía (i.e. colocalización con Med1¹⁷⁶) ni su funcionalidad, y desconocemos cómo las fuerzas mecánicas podrían modularlos.

La observación de más *foci*, de mayor tamaño y con mayor concentración relativa de OCT4 luego de depolimerizar actina sugiere que esta red promueve una distribución más

homogénea del TF. En el Capítulo 7 (Sección 7.2) mostramos que las interacciones de los TFs en los *foci* son más prolongadas y no responden a señales de diferenciación, al menos en una ventana temporal de 48 horas de su inducción. De acuerdo a los resultados obtenidos en este capítulo, las fuerzas transmitidas por actina podrían prevenir que OCT4 se concentre en los condensados que, como ya mencionamos, son menos sensibles a señales de diferenciación en lo que corresponde a las interacciones OCT4-cromatina.

En el Capítulo 6 (Sección 6.4) mostramos que los *foci* de OCT4 colocalizan con regiones de cromatina compactada, lo que nos llevó a estudiar si la organización de la cromatina es también afectada en estos experimentos. Nuestros resultados muestran que la depolimerización de actina provoca una distribución más homogénea de H2B, reflejada en la disminución en el número de *foci* y su área relativa. Estas observaciones concuerdan con trabajos en otras líneas celulares (*Drosophila* S2R+ y NIH3T3), donde la depolimerización de actina o el *knockdown* de proteínas que median la interacción entre la red y el núcleo, provocan un aumento de la movilidad de H2B^{459,460}, lo que podría implicar un estado de menor compactación, reflejándose como una distribución más homogénea.

Los cambios que encontramos en la distribución de H2B al depolimerizar la red de actina son diferentes a los de la de OCT4. Estas diferencias indican que la modulación de la distribución y formación de los condensados de OCT4 mediada por actina no puede ser explicada por cambios en la organización de la cromatina visualizados a través de la distribución de H2B. Por otro lado, estos resultados ilustran que los estímulos mecánicos pueden modular diferencialmente la concentración relativa de los diferentes componentes de los condensados. En particular, las fuerzas transmitidas por actina modulan la formación de condensados, previniendo el reclutamiento de OCT4 y favoreciendo, de forma sutil, el reclutamiento de H2B.

Si bien nuestros resultados no proveen información acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la relación entre citoesqueleto y los condensados nucleares de TFs de pluripotencia, podemos construir un modelo simplificado basado en nuestras observaciones y en antecedentes previos. En particular, postulamos que las fuerzas mecánicas transmitidas hacia el núcleo, mediante su conexión directa con el citoesqueleto, pueden inducir cambios tanto en la concentración nuclear de TFs como en la compartimentalización interna de la organela, modulando la distribución y organización de la cromatina y de ciertos condensados nucleares. Por otro lado, dadas las relevancias funcionales de actina en la remodelación de la cromatina⁴⁶¹ y de los condensados de OCT4 en la organización de TADs¹⁹⁸ y la existencia de condensados transcripcionales que incluyen *super-enhancers* donde se encuentra OCT4¹⁷⁶, es probable que haya un *feedback* regulatorio entre la organización de la cromatina y la organización del TF, lo que a su vez modifique sus funciones. Como mencionamos previamente, los condensados son estructuras heterogéneas entre sí y dentro de sí mismas^{134,400,401}. Las fuerzas mecánicas podrían modular las propiedades biofísicas de los condensados según su composición particular (tipo de condensado y composición) y de manera diferente dentro de un mismo condensado, lo que a su vez modificaría sus funciones.

Capítulo 10: Discusión y conclusiones

Las células madre son un excelente modelo experimental para el estudio de la regulación génica, y en particular, los mecanismos involucrados en la pluripotencia y diferenciación. A su vez, en los últimos años, estas células despertaron un gran interés en el área de la medicina por su potencial para el tratamiento de diferentes enfermedades en el área de la medicina regenerativa. Por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares que gobiernan el balance entre pluripotencia y diferenciación es vital para el estudio del desarrollo embrionario de mamíferos y para el potencial uso de CMP en nuevas terapias⁴⁶².

En el Capítulo 1 (Sección 1.6) hemos descripto que es posible recapitular las propiedades del embrión pre-implantatorio mediante el cultivo de CME *in vitro*, utilizando distintos factores que simulan las señales que reciben las células en el contexto embrionario. También, se puede inducir la diferenciación de CME hacia destinos específicos o utilizar protocolos de diferenciación no dirigidos, los cuales son muy utilizados para estudiar la pluripotencia y los estadios tempranos del proceso de diferenciación.

Los TFs fundamentales para el mantenimiento de la pluripotencia de CME son OCT4, SOX2 y NANOG⁵⁴ que, en conjunto, inducen genes relacionados con la pluripotencia y reprimen aquellos que promueven la diferenciación (Capítulo 1, Sección 1.5). En particular, dada las ventanas temporales de su expresión, OCT4 y SOX2 son TFs de pluripotencia generales, mientras que NANOG es un TF de pluripotencia *naïve*⁵⁷. Brevemente, OCT4 y SOX2 se expresan en células en cultivo tanto en estado de pluripotencia *naïve* como en estado *primed*, equivalente a las células del embrión más tardío, mientras que los niveles de expresión de NANOG disminuyen rápidamente a la salida del estado de pluripotencia *naïve*⁵⁷.

En el Capítulo 2 hemos detallado diversos aspectos de la compartimentalización nuclear y discutido las implicancias funcionales propuestas para los condensados transcripcionales, en los cuales se concentran TFs, coactivadores y la maquinaria transcripcional^{174,176}. Si bien se ha propuesto que estos condensados podrían jugar un papel relevante en la modulación de la transcripción, los efectos siguen siendo muy debatidos en este campo^{93,176,188}.

En este contexto, planteamos como hipótesis que diversos aspectos de los TFs de pluripotencia, específicamente su distribución nuclear y sus interacciones con la cromatina, pueden modular la transcripción y, en última instancia, impactar en los programas transcripcionales relacionados con la salida del estado de pluripotencia *naïve* en CME.

Para analizar experimentalmente esta hipótesis, empleamos líneas estables de CME que expresan OCT4 o SOX fusionados a una proteína fluorescente (YPet) de manera inducible, lo que nos permite obtener niveles moderados, estables y similares entre células de los TFs fluorescentes (Capítulo 6, Sección 6.2).

El estudio de la distribución nuclear de los TFs de pluripotencia en las líneas generadas, mostró que estos TFs forman condensados nucleares en CME (Sección 6.3), en línea con trabajos previos^{176,198,199,383}. Debemos destacar que, si bien nuestras observaciones no proveen información funcional, se ha postulado que los condensados de OCT4 podrían contribuir a la modulación transcripcional al favorecer la formación de SE¹⁷⁶ y que, además, contribuyen a la reorganización de TADs durante la reprogramación¹⁹⁸ (Capítulo 2, Sección 2.5).

Dada la relación entre la cromatina y los condensados nucleares^{93,156,157}, analizamos si existe alguna correlación entre la distribución global de la cromatina, su grado de compactación y los *foci* de TFs. Observamos que estos *foci* se localizan en regiones de alta concentración local de la histona H2B las cuales, a su vez, colocalizan con HP1 α (Sección 6.4). Este resultado sugiere que los *foci* de los TFs se localizan en regiones de heterocromatina.

Generalmente, se asocia a la heterocromatina con regiones silenciadas del genoma³⁹⁷. En el Capítulo 6 (Sección 6.7) mencionamos que la cromatina de CME en su estado pluripotente se encuentra relativamente poco compactada aun a escala nanométrica³⁹⁹, y se caracteriza por estar asociada a marcas activas y, en algunas regiones del genoma, a marcas bivalentes³⁹⁸. Estos antecedentes sugieren que el ambiente en el que se encuentran los condensados de los TFs de pluripotencia en CME puede ser más laxo y menos represivo para la transcripción. Por otro lado, se ha propuesto que los condensados pueden no ser homogéneos estructuralmente^{134,400,401}. Podría ocurrir que la compactación de la cromatina sea heterogénea aún dentro de un mismo *foci*, coexistiendo zonas localmente accesibles y permisivas para la transcripción y zonas compactas y represivas. Esta hipótesis deberá ser estudiada en el futuro con metodologías que provean una mayor resolución espacial.

Posteriormente, analizamos si la compartimentalización de los TFs de pluripotencia OCT4 y SOX2 es sensible a señales de diferenciación en la ventana temporal de 0 a 48 horas de inducida la diferenciación (Sección 6.5), correspondiente a la salida del estado de pluripotencia *naïve*. Como ya mencionamos, los niveles de expresión de NANOG disminuyen en esta ventana temporal, pero no lo hacen los de OCT4 y SOX2⁵⁷.

En primer lugar, realizamos un análisis cuantitativo de la distribución de estos TFs y encontramos que ambos se reorganizan en la ventana temporal estudiada, aunque llamativamente, no lo hacen de la misma manera. En particular, la diferenciación induce la formación de un número mayor de *foci* de OCT4 con mayor concentración relativa. Por otro lado, SOX2 muestra cambios más sutiles: a tiempos relativamente cortos se redistribuye desde unos pocos *foci* a un mayor número de *foci* pero de menor concentración relativa que posteriormente reclutan más moléculas (Sección 6.5).

En conclusión, la distribución de los TFs y en particular la de OCT4, es sensible a señales de diferenciación. La formación de nuevos *foci* y los cambios en la cantidad de moléculas reclutadas podrían modular la concentración de los TFs en el nucleoplasma y su disponibilidad

para interactuar con sus sitios blanco en el DNA, constituyendo un nivel extra en la regulación transcripcional durante la salida del estado de pluripotencia *naïve*.

Dado que los *foci* los TFs colocan con regiones compactadas de cromatina, y que los condensados responden a estímulos que promueven la diferenciación, estudiamos cuantitativamente si la distribución de H2B también se modifica durante este proceso. Nuestros resultados sugieren que la remodelación de la cromatina se inicia rápidamente dentro de las primeras horas de la salida del estadio pluripotente *naïve* (Sección 6.5). Llamativamente, los cambios observados en la distribución de la histona difieren de los observados para los TFs, lo que sugiere que la organización de la cromatina no es el único factor que regula la distribución de los *foci* de OCT4 y SOX2. Debemos destacar que nuestros experimentos con H2B solo proveen información con baja resolución de la organización de la cromatina.

Dado que la formación de condensados aumentaría localmente la disponibilidad y concentración de ciertas proteínas y ácidos nucleicos⁹³ y que los *foci* podrían modular la disponibilidad de los TFs dentro del núcleo, analizamos si los cambios en la organización nuclear de los TFs observados durante la salida del estado pluripotente *naïve* son acompañados de cambios en sus interacciones en los *foci* y en el nucleoplasma.

En una primera instancia, estudiamos las interacciones de los TFs en estos compartimientos nucleares por FCS y observamos que los condensados presentan una mayor fracción de TFs asociada a la cromatina y que, globalmente, permanecen unidos por más tiempo respecto a aquellos localizados en el nucleoplasma (Sección 7.2).

Posteriormente, verificamos que la inducción de la diferenciación no modifica las interacciones de OCT4 y SOX2 en los condensados (Sección 7.3). Hemos mencionado que los *foci* de OCT4 contienen otras biomoléculas relacionadas con la maquinaria transcripcional¹⁷⁶ con las que se genera una red de interacciones débiles y transitorias^{132,138}. Dado que la dinámica de TFs en *foci* no se vio modificada en las primeras horas de diferenciación, hipotetizamos que esta red de interacciones no cambia sustancialmente. Estos resultados sugieren que la inducción de la diferenciación sólo modificaría el número de moléculas de OCT4 reclutadas en los *foci* pero no las interacciones internas; en consecuencia los *foci* modularían indirectamente la concentración de los TFs en el nucleoplasma. Debemos destacar que se necesitan más estudios para identificar los componentes de estas redes, analizar si existen cambios que no detectamos en nuestros experimentos y/o heterogeneidades en la composición aún en un mismo condensado.

Por otro lado, detectamos que la dinámica TF-cromatina en el nucleoplasma responde a señales de diferenciación y, al igual que lo observado en el estudio de la distribución nuclear de los TFs (Secciones 7.3 y 7.4), la respuesta de OCT4 y SOX2 fue distinta.

En el caso de OCT4, observamos una disminución significativa en los tiempos de interacción con la cromatina junto a una disminución en la fracción de TF interactuando con los sitios lentos y un aumento concomitante de la fracción difundiendo libremente. Estos cambios ocurren entre las 24 y 48 horas de inducida la diferenciación (Sección 7.3). Respecto a SOX2,

solo detectamos cambios sutiles -en uno de los clones estudiados- en el tiempo de interacciones rápidas, modificación que probablemente ocurra en las primeras 12 horas de inducida la diferenciación (Sección 7.4).

La respuesta diferencial en la interacción TF-cromatina para OCT4 y SOX2 podría estar relacionada con su reorganización espacial que, a su vez, se asocia a los cambios en las funciones que cumplen dichos TFs durante la salida del estado pluripotente *naïve*. En particular, OCT4 mantiene la accesibilidad de *enhancers* de genes relacionados con la pluripotencia *naïve*⁴⁰⁸ y, durante la transición de *naïve* a *primed*, cambia su patrón de unión a la cromatina disociándose de estos *enhancers* y asociándose a nuevos *loci* involucrados en el desarrollo del epiblasto postimplantatorio^{67,405}. Esta reorganización está relacionada con su interacción con diferentes proteínas en cada contexto celular. Por ejemplo, OCT4 induce la expresión de *Otx2* en esta transición y conforman heterodímeros que regulan la expresión de genes relacionados con la diferenciación^{405,406}.

En cuanto a SOX2, especulamos que los cambios sutiles detectados en la dinámica SOX2-cromatina y su organización, están relacionados con su actividad como TF pionero. En particular, SOX2 interactúa con regiones de la cromatina especialmente inaccesibles, induciendo una conformación más laxa; dicha unión es requerida para la posterior unión estable de OCT4, el cual estabiliza el complejo⁴⁰⁹. Por otra parte, los distintos TF pioneros presentan diferentes mecanismos para explorar la cromatina; particularmente, se describió que SOX2 muestra una dinámica rápida, interactúa transitoriamente con la cromatina y frecuentemente se encuentra difundiéndose, moviéndose rápidamente entre nucleosomas⁴¹⁰.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la inducción de la diferenciación inicia una reorganización de OCT4 (Figura 10.1) y SOX2 a distintos niveles, afectándolos de diferentes maneras según las particularidades de cada TF. Uno de estos niveles es la distribución dentro del núcleo y otro, las interacciones TF-cromatina, características que podrían estar relacionadas y modularse mutuamente. A su vez, estos cambios podrían afectar la expresión de genes específicos; en esta dirección, se ha reportado que ciertos genes blanco de OCT4 y SOX2 asociados a la pluripotencia disminuyen sus niveles de expresión en esta ventana temporal, mientras que aumentan los niveles de otros genes que promueven la diferenciación⁴⁰⁶.

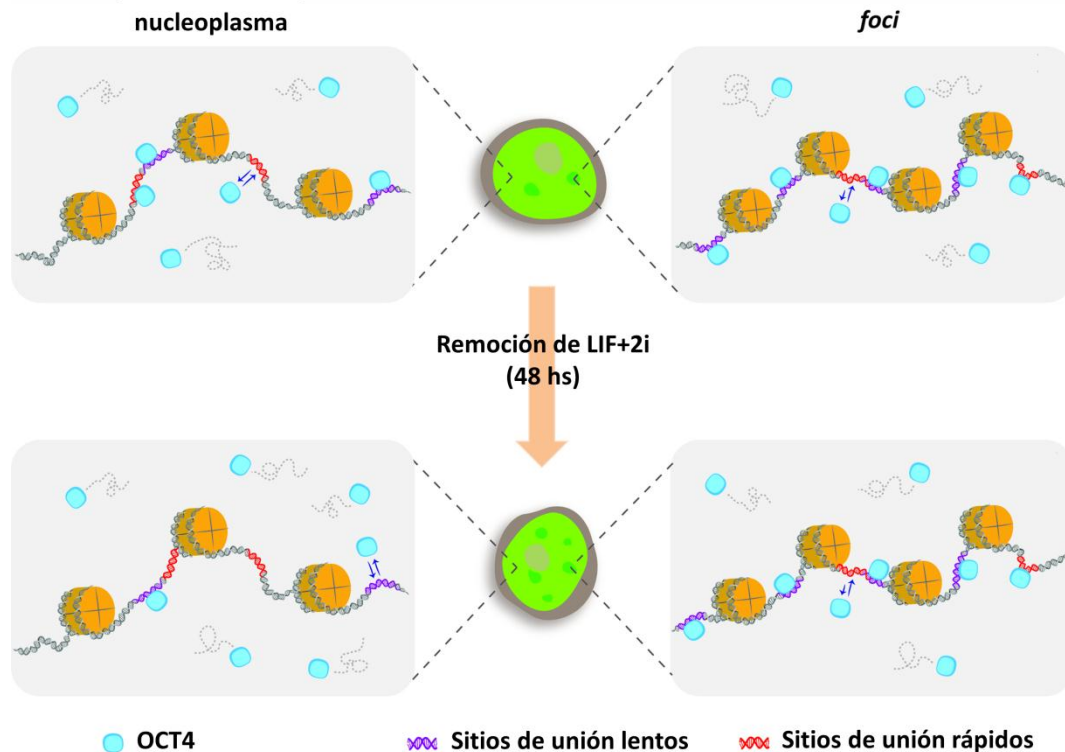


Figura 10.1 Modelo de interacción OCT4-comatina en CME saliendo del estado de pluripotencia *naïve*. Esquema de las interacciones de OCT4 (círculos celestes) con la cromatina en sitios rápidos (rojo) o lentos (violeta) en los distintos compartimentos estudiados en células indiferenciadas o luego de 48 h de inducir la diferenciación. Los círculos de color naranja representan a los nucleosomas. Adaptado de ³⁸⁰.

Un trabajo pionero sobre mecanotransducción en células madre ²²³ demostró que la rigidez del sustrato sobre el que crecen las células puede dirigir la diferenciación hacia linajes específicos. Estos hallazgos revolucionaron el campo de la biología del desarrollo e incentivaron la exploración de los mecanismos involucrados. Este estudio es particularmente relevante para el campo biomédico ya que, modificando las propiedades del sustrato y/o estimulando mecánicamente a las células, se podría guiar la diferenciación hacia linajes de interés.

En este contexto, analizamos si la organización intranuclear de los TFs de pluripotencia puede verse afectada por estímulos mecánicos. Lamentablemente, la bibliografía disponible hasta hace unos pocos años que describía aspectos del citoesqueleto en CME vivas era muy escasa, por lo que comenzamos realizando una caracterización de las redes de microtúbulos, actina y filamentos intermedios de vimentina en estas células, concentrándonos en su relación con el núcleo (Sección 8.2).

En particular, observamos que la red de microtúbulos no presenta la organización típica observada en células somáticas y detectamos además la presencia de centros nucleadores de microtúbulos. Por otra parte, observamos que la actina se extiende por todo el citoplasma de

manera difusa y se concentra en regiones de contacto célula-célula y célula-sustrato, como es de esperar dada su participación en dichas adhesiones ⁴¹⁶; también visualizamos filopodios que se extienden hacia células vecinas y hacia el sustrato. Finalmente, observamos que la red de vimentina se concentra en la región perinuclear formando anillos o “nudos”, estructura descrita en otros modelos celulares ²⁷⁶.

Dado que las redes del citoesqueleto se conectan físicamente al núcleo ⁴¹², estudiamos si la integridad de las mismas puede promover cambios morfológicos de la organela y/o en la distribución dinámica de OCT4 en el núcleo celular.

Observamos que las redes de actina y de vimentina modulan la morfología nuclear en forma opuesta (Sección 8.3); en particular, la red de actina transmitiría fuerzas mecánicas hacia el núcleo deformándolo mientras que la de vimentina lo protege del estrés mecánico, como se ha reportado en otros sistemas celulares ^{227,279,422}.

Además, analizamos si las redes del citoesqueleto pueden modular las interacciones OCT4-cromatina, tal como lo hacen señales moleculares de diferenciación (Sección 7.3). Observamos que la red de vimentina contribuye al mantenimiento de las dichas interacciones y, por ende, favorecería la pluripotencia. Por otra parte, las señales mecánicas transmitidas por la red de actina promoverían una disminución en la fracción de OCT4 interactuando con la cromatina, sugiriendo que esta red también estaría involucrada en la modulación del paisaje de interacciones de este TF.

A continuación, analizamos si la integridad del citoesqueleto puede modular la organización de *foci* de OCT4. Nuestros resultados muestran que la red de actina contribuye a una distribución más homogénea del TF dentro del núcleo, mientras que los microtúbulos no modulan mayormente la organización del TF en el nucleoplasma (Sección 9.3). Estos resultados son respaldados por reportes en otros sistemas celulares que señalan que los condensados serían capaces de sensar localmente su entorno mecánico y responder al mismo ⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷.

Por otra parte, estudiamos si las señales mecánicas transmitidas por el citoesqueleto también modulan la distribución de la cromatina, evaluada a través de la histona H2B. Observamos que la red de actina promueve una distribución más heterogénea de H2B sugiriendo que las señales mecánicas transmitidas por esta red aumentan localmente la compactación de la cromatina (Sección 9.3). En este sentido, otros reportes muestran que la disrupción de dicha red provoca un aumento en la movilidad de la histona ^{459,460}, lo que podría implicar un estado de menor compactación y reflejarse en una distribución más homogénea.

Tal como observamos durante la inducción de la diferenciación, depolimerizar la red de actina produce distintos cambios en los condensados de OCT4 y la distribución de H2B. Este resultado refuerza que, aunque los condensados de OCT4 y la organización de la cromatina estén relacionados, otros factores estarían involucrados en la formación y/o estabilización de los *foci* del TF.

En el Capítulo 3 mencionamos que las fuerzas mecánicas modulan el transporte núcleo-citoplasma de muchas biomoléculas, incluyendo TFs^{251–254,445,446}. En este contexto, exploramos si éste es también el caso para OCT4. Nuestros resultados sugieren que la red de microtúbulos promueve la traslocación de OCT4 al núcleo, mientras que la actina no influiría mayormente en este proceso (Sección 9.2).

En base a estas evidencias, proponemos que las fuerzas mecánicas transmitidas hacia el núcleo pueden inducir cambios rápidos en la concentración y distribución nuclear de TFs, lo que en última instancia impactaría en las interacciones TF-cromatina. En el caso de los TFs de pluripotencia, esta reorganización podría definir los programas transcripcionales relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia y el inicio de la diferenciación.

En conclusión, en este trabajo mostramos que, tanto estímulos químicos que pueden inducir la salida del estado pluripotente *naïve* como señales mecánicas transmitidas por el citoesqueleto, tienen efectos relativamente rápidos y relevantes en la distribución nuclear de los TFs de pluripotencia OCT4 y SOX2 y en el *paisaje* de sus interacciones con la cromatina.

En un futuro, planeamos profundizar el estudio de los condensados transcripcionales en CME analizando, por ejemplo, si en una misma célula coexisten condensados con distinta función. Además, buscaremos explorar la organización interna de los condensados de OCT4 y SOX2 y correlacionarla con el estado transcripcional de la cromatina. Finalmente, será relevante complementar estos estudios con análisis en modelos de mayor complejidad como organoides o embriones.

Por último, queremos destacar que, por fuera de los objetivos relacionados con esta tesis y en el marco de la situación de emergencia excepcional que constituyó la pandemia causada por el SARS-CoV-2, desarrollamos un kit para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, sin extracción de RNA, posteriormente autorizado por ANMAT y comercializado por la empresa argentina Inbio Highway. Los detalles de este desarrollo se describen en el Anexo I.

Paula Verner

Valeria Levi

Alejandra Guberman

Anexo I: Desarrollo de un método para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, sin extracción de RNA

1.1. Introducción.

El brote de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causado por el SARS-CoV-2, fue declarado pandemia por la Organización Mundial de la Salud el 11 de marzo de 2020. Ante la falta de vacunas y tratamientos específicos, la detección rápida, el aislamiento y el rastreo de contactos fueron estrategias fundamentales para reducir la propagación de la enfermedad ⁴⁶³.

En este contexto, durante el año 2020, trabajé como voluntaria en el INBIRS (Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, UBA-CONICET) realizando determinaciones de SARS-CoV-2 en muestras de pacientes del AMBA y varias provincias.

El método de RT-qPCR fue considerado el “estándar de oro” y en consecuencia, el más utilizado para las determinaciones de SARS-CoV-2 ⁴⁶⁴. Estos ensayos implican recolectar la muestra clínica, usualmente con hisopos nasofaríngeos, extraer el RNA de la muestra y analizar la presencia del RNA viral. Rápidamente, el paso de extracción de RNA se convirtió en el cuello de botella en las determinaciones de muestras de pacientes ⁴⁶⁵. Es un procedimiento laborioso, costoso, y en la mayoría de los hospitales e institutos de Argentina, se realizaba de manera manual con insumos importados, faltantes en el mercado internacional como consecuencia de la gran demanda.

Dada la situación de extrema urgencia de nuestro país y el nivel de conocimiento adquirido durante mis tareas como voluntaria, trabajamos en desarrollar un protocolo más rápido y de menor costo, alternativo al protocolo tradicional de extracción de RNA, a pesar de que éste no era un objetivo de mi tesis.

En este capítulo describimos el método para la detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, sin extracción de RNA desarrollado por nuestro grupo de trabajo y en colaboración con Valeria Genoud, Virginia Dansey, Bruno Bernardino, Ariel Waisman y Federico Remes Lenicov (INBIRS). Tal como describiremos más adelante, el uso del método fue autorizado por ANMAT y comercializado en diversas regiones del país por la empresa Inbio Highway, tiene una sensibilidad y especificidad del $99\% \pm 1\%$ y se puede usar con una variedad de kits de amplificación: Kit Discovery, Kit Genefinder, Singleplex 2019-nCoV CDC Diagnostic Panel, Euroimmun, Genesig, Argeen y ELA-Chemstrip.

1.2. Antecedentes bibliográficos.

Al inicio de nuestro trabajo, se había reportado un método, denominado “HID” (*heat inactivated direct* RT-PCR) para el procesamiento de muestras de hisopados nasofaríngeos que consistía en una incubación de las muestras durante 5 minutos a 95°C ⁴⁶⁶. Estas muestras inactivadas eran analizadas posteriormente por RT-qPCR para detectar los genes virales N1 y N2. Los autores sugirieron que, dado el tamaño pequeño de N1 y N2, se fragmentan menos con el calor que amplicones más grandes, permitiendo su detección con alta sensibilidad. En el mismo trabajo, también observaron que la sensibilidad del ensayo de RT-qPCR era muy dependiente del medio de transporte en el que se conservaban las muestras de hisopados para su traslado, entre otros factores.

Posteriormente, el CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU) autorizó un protocolo similar de análisis que combina el tratamiento térmico de muestras de hisopados durante 1 minuto a 95°C en combinación, con la detección de SARS-CoV-2 con el kit comercial Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix , el cual también detecta las secuencias virales N1 y N2 ⁴⁶⁷.

Lamentablemente, el método HID tenía poca versatilidad. En particular, se utilizaba con el kit de detección 2019-nCoV CDC Diagnostic Panel, el cual es un kit de tipo *singleplex* (es decir, se detecta un único gen por ensayo). En contraste, la mayoría de los laboratorios en Argentina y, a nivel mundial, utilizaban kits comerciales *multiplex* donde se detectan en simultáneo varios genes virales y un gen humano (control interno), por lo cual permiten ahorrar tiempo de preparación del ensayo e insumos. En este sentido, el kit de detección *singleplex* combinado con el método HID no era utilizado en nuestro país y, debido a la faltante de reactivos a nivel mundial, poder desarrollar y validar una metodología versátil, que sea compatible con una variedad de kits de detección comerciales era de vital importancia.

Por otra parte, en la bibliografía se han descripto diversos protocolos donde no se realiza extracción de RNA para procesar muestras y detectar, mediante RT-qPCR, otros virus tales como el herpes o aquellos causantes de infecciones respiratorias (MERS-CoV). Entre ellos, destacamos aquellos que incluyen tratamientos con la proteinasa K (PK), enzima que degrada las proteínas de la muestra, como RNAsas, y en consecuencia protege la integridad del RNA ^{468,469}. En este contexto, se había sugerido el uso de PK para determinaciones de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, aunque los resultados obtenidos a partir de un número pequeño de muestras, arrojaron una disminución de sensibilidad y un corrimiento de los CTs de aproximadamente 6 unidades en el gen viral E con respecto a muestras purificadas mediante el uso de MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) (*preprint*: ⁴⁷⁰).

Otro trabajo ⁴⁷¹, ahora publicado, pero que en su momento era un *preprint*, informó un protocolo que combinaba el tratamiento con PK (15 minutos a 55°C) seguido de un paso de inactivación térmica (5 minutos a 98°C). En este trabajo se analizó un número reducido de

muestras de hisopados positivos con alta carga viral, transportados en medio UTM (COPAN Diagnostics Inc.), un medio de transporte comercial para muestras virales, y se pudo detectar el gen viral E. Estos resultados eran contradictorios con otros trabajos donde se mostraba que el medio UTM produce una pérdida importante de sensibilidad con el método HID ⁴⁶⁶.

Estos antecedentes sugirieron testear la performance de un método que combine las dos estrategias descritas previamente, esto es, reemplazar la extracción de RNA por una incubación relativamente corta con Proteinasa K y una posterior inactivación por calor. El protocolo fue optimizado utilizando muestras nasofaríngeas transportadas en solución salina ya que, por su bajo costo, era el medio de transporte más utilizado en nuestro país.

1.3. La incubación con proteinasa K mejora la performance del protocolo respecto a aquellos que solo incluyen la inactivación por calor (“HID”).

Como punto de partida, usamos 9 muestras de hisopados nasofaríngeos (6 positivas y 3 negativas para SARS-CoV-2) para evaluar si la preincubación de las muestras con PK mejora la performance del método HID, que solo consta de un paso de inactivación por calor.

Para ello sometimos a muestras de hisopados en solución salina a tres tratamientos distintos:

- a. Tratamiento PK+HID: incubamos 90 µl de las muestras con 10 µl de 10 mg/ml PK (concentración final 1 mg/ml) durante 15 minutos a 55°C, con una posterior inactivación térmica de 5 minutos a 98°C.
- b. Tratamiento HID: incubamos 90 µl de las muestras con 10 µl de solución fisiológica durante 5 minutos a 98°C.
- c. Purificamos el RNA a partir de 300 µl de las muestras utilizando el método automatizado Chemagic 360-D (Perkin-Elmer).

Todas estas muestras fueron analizadas por RT-qPCR usando el kit singleplex “2019-nCoV CDC Diagnostic Panel”, que detecta los genes virales N1, N2 y el gen humano RP, como control interno. Elegimos este kit de detección como punto de partida ya que se obtuvieron mejores resultados respecto a otros que incluyen, por ejemplo, al gen viral E ⁴⁶⁶.

La Figura I.1a muestra que los protocolos PK+HID y HID permiten identificar correctamente las muestras positivas y negativas. A modo de ejemplo, la Figura I.1b exhibe una curva de amplificación obtenida con una muestra PK+HID; se observa que la misma sigue la forma sigmoidea esperada para este tipo de ensayos. Estos resultados muestran que la preincubación con PK resultó en valores de CT más bajos que aquellos obtenidos con HID, acercándose a los valores de CT de muestras de RNA purificado.

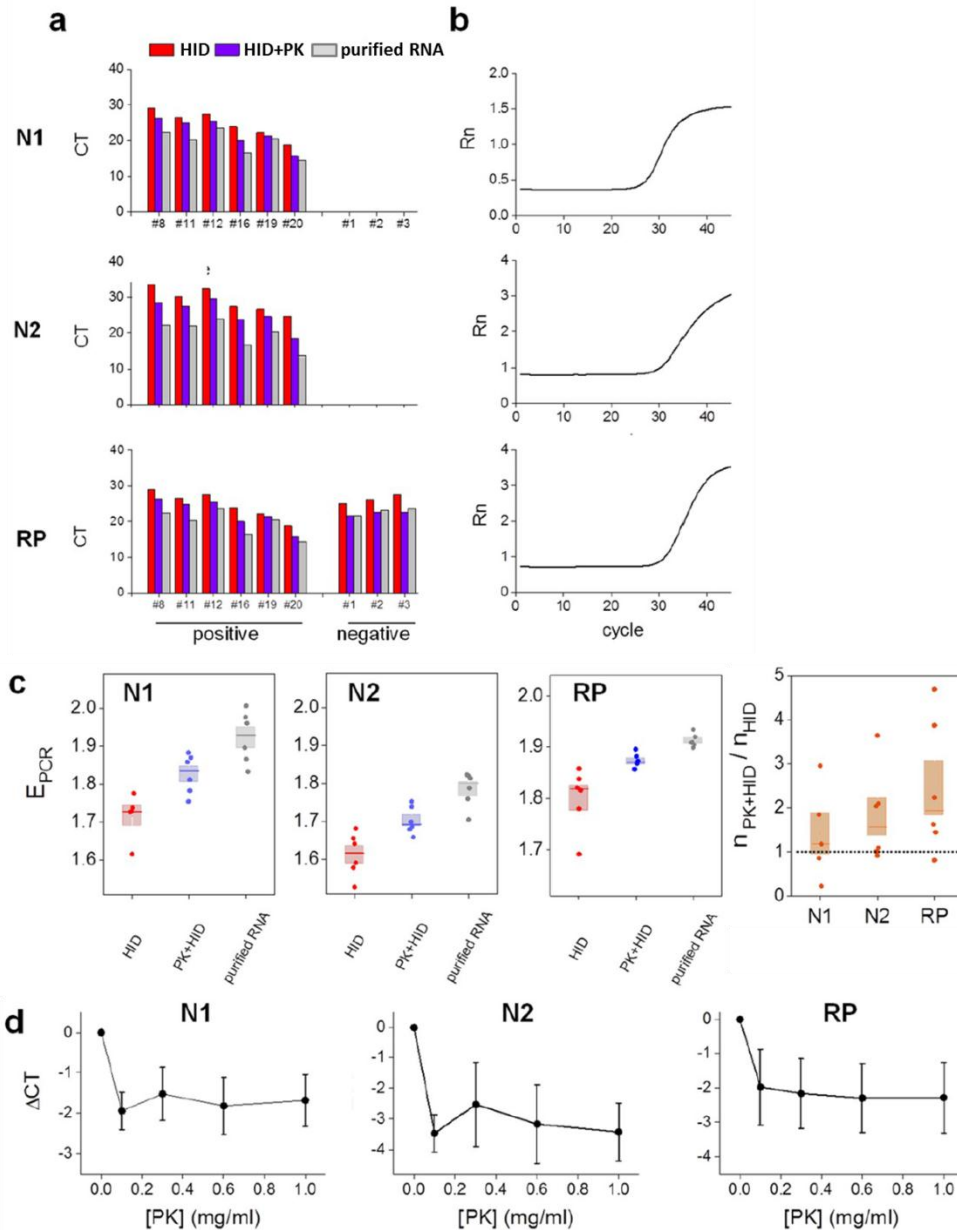


Figura 1.1: La preincubación con PK mejora la performance del método HID en determinaciones de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. 6 muestras positivas y 3 muestras negativas fueron procesadas con los métodos HID (rojo), PK+HID (violeta) o por purificación de su RNA (gris). Los genes virales N1 y N2 y el gen humano RP fueron amplificados por RT-qPCR (**a-b**). Valores de CT obtenidos por RT-qPCR para todas las muestras (**a**). Curvas de amplificación representativas para los 3 genes de una muestra positiva procesada con el método PK+HID (**b**). Eficiencia de amplificación (E_{PCR}) para los genes N1, N2 y RP con los 3 métodos y cantidad de copias de amplicón (n) con PK+HID en comparación con HID. El promedio es representado como una línea dentro de las barras, y el largo de las barras representa el error estándar (**c**). Las muestras positivas fueron sujetas al tratamiento PK+HID con distintas concentraciones de PK y los CTs de los 3 genes fueron calculados luego de realizada la RT-qPCR. El ΔCT representa la diferencia promedio obtenida entre PK+HID y HID (**d**). Adaptado de ⁴⁷².

Analizamos cuantitativamente las curvas de amplificación utilizando el software *LineReg*, y calculamos la eficiencia de la reacción de PCR (E_{PCR}) (Figura I.1c). La eficiencia obtenida para las muestras PK+HID fue superior a aquella correspondiente a las muestras HID, e inferior el RNA extraído (Figura I.1c). Estos resultados sugieren que el tratamiento con PK contribuye a degradar componentes desconocidos de la matriz de las muestras que interfieren con la reacción de PCR. También analizamos la cantidad de copias de amplicón con PK+HID, relativizadas a muestras HID, y observamos que la relación fue mayor a 1 para N2 y RP, sugiriendo que el tratamiento con PK efectivamente protege al RNA de la degradación por RNAsas (Figura I.c).

Finalmente, evaluamos si la performance del método PK+HID depende de la concentración de PK en el rango de 0.1 a 1 mg/ml; la Figura I.1d muestra que los valores de CT obtenidos en este rango no varían para ninguno de los tres genes. Este dato sugiere que el método es robusto en un rango amplio de concentración de PK, lo cual es una ventaja ya que pequeños errores de pipeteo en laboratorios de diagnóstico no afectarán significativamente los resultados. Los experimentos que se detallan a continuación, fueron realizados con 1 mg/ml de PK.

1.4. El método PK+HID permite una eficiente detección del gen N1.

Para estudiar en detalle la performance del protocolo PK+HID, realizamos determinaciones por RT-qPCR de un número mayor de muestras nasofaríngeas positivas y negativas, comparando los resultados obtenidos para las mismas muestras tratadas con PK+HID o por extracción de RNA. Para este análisis, analizamos únicamente los genes N1 y RP y detectamos correctamente las muestras positivas (27/27) y las negativas (6/6).

La Figura I.2 muestra que los valores de CT obtenidos para el gen N1, en muestras positivas tratadas con el protocolo PK+HID, correlacionan fuertemente con los CT obtenidos para las mismas muestras, sometidas al protocolo de extracción de RNA, apoyando la robustez del método.

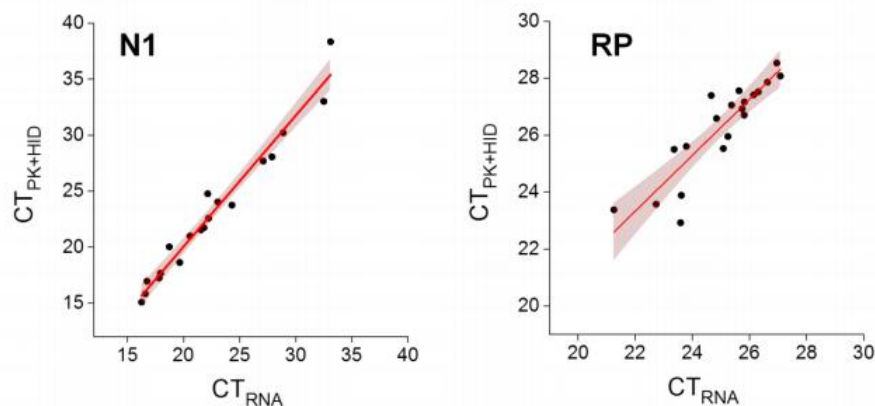


Figura 1.2: El tratamiento PK+HID exhibe una performance similar a la extracción de RNA, en determinaciones del gen N1. Se procesaron muestras nasofaríngeas positivas mediante el método PK+HID y por extracción de RNA. Los genes N1 (izquierda) y RP (derecha) fueron amplificados y detectados por RT-qPCR, se muestran los valores de CT obtenidos. Las líneas rojas corresponden al ajuste lineal a los datos experimentales, y en rosa los intervalos de confianza del 95%. Los parámetros del ajuste son: pendiente = 1.17 ± 0.05 y ordenada = -3.4 ± 1.2 para el amplicón N1, pendiente = 1.0 ± 0.1 y ordenada = 1.7 ± 3.0 para el amplicón RP. Adaptado de ⁴⁷².

1.5. El método PK+HID puede ser usado en combinación con distintos kits multiplex de RT-qPCR con alta sensibilidad y especificidad.

Tal como mencionamos previamente, los laboratorios de diagnóstico utilizan kits de detección para SARS-CoV-2 que amplifican otras regiones del virus y que en lugar de ser *singleplex* son *multiplex*, permitiendo reducir el uso de termocicladores y el tiempo de preparación de muestras, ya que en un mismo pocillo se amplifican y detectan varios genes en simultáneo. Por este motivo, evaluamos si el método PK+HID era compatible con otros kits disponibles en Argentina.

Comenzamos con DisCoVery (Safecare Biotech Hangzhou), un kit multiplex muy usado en el país que detecta los genes virales N y ORF1ab, y el gen humano RP. Como procedimos previamente, en todos los casos analizamos con dicho kit las mismas muestras ya sea tratadas con PK+HID o sometidas al procedimiento de extracción de RNA.

La Figura 1.3a muestra que el tratamiento PK+HID permite la detección tanto de los genes virales como del control interno. En el caso de los amplicones virales, los CT obtenidos por PK+HID correlacionan linealmente con aquellos obtenidos en las muestras purificadas de RNA. La Figura 1.3b exhibe las eficiencias de PCR obtenidas en muestras procesadas por PK+HID, relativas a aquellas obtenidas con muestras de RNA purificado; todos los valores promedio fueron levemente menores a 1, sugiriendo una pérdida baja en la eficiencia de la reacción de PCR en muestras PK+HID.

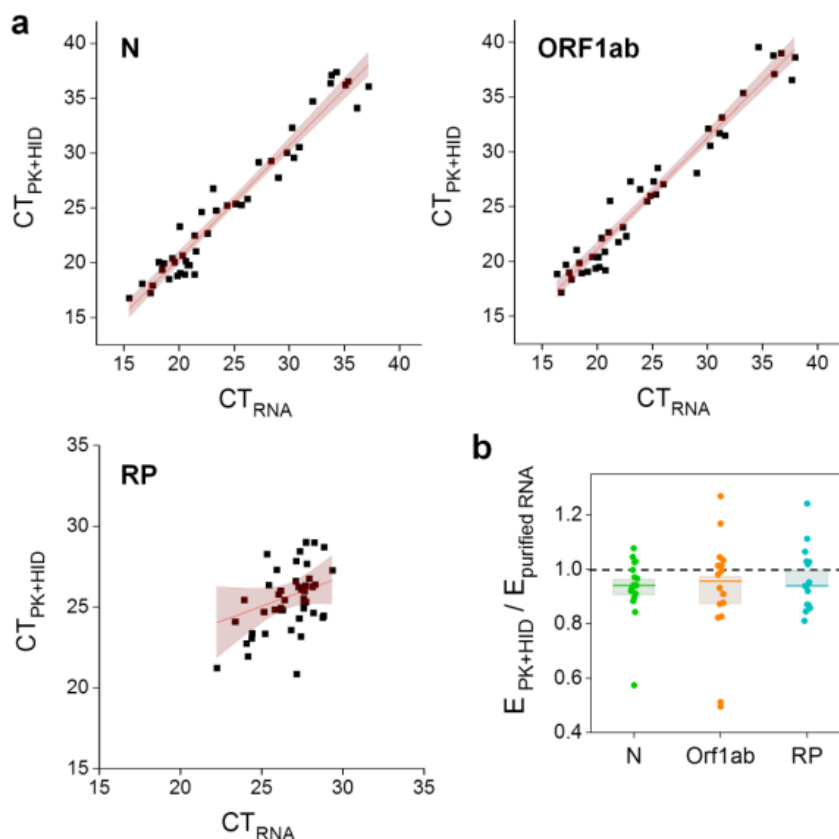


Figura 1.3: El método PK+HID tiene una performance similar a la extracción de RNA en determinaciones por RT-qPCR utilizando el kit multiplex DisCoVery. Muestras nasofaríngeas positivas fueron tratadas con ambos métodos y los genes N, ORF1ab y RP fueron amplificados por RT-qPCR. CT obtenidos de muestras tratadas con ambos métodos, para los tres genes que amplifica el kit. Las líneas rojas representan el ajuste lineal, y en rosa los intervalos de confianza del 95%. Los parámetros del ajuste son: pendiente = 1.02 ± 0.04 y ordenada = 0.1 ± 0.9 para el amplicón N, pendiente = 1.02 ± 0.04 y ordenada = 0.8 ± 0.9 para el amplicón ORF1ab, pendiente = 0.4 ± 0.2 y ordenada = 15 ± 6 para el amplicón RP (a). Eficiencias de amplificación obtenidas para PK+HID (E_{PK+HID}) relativa a la de RNA purificado ($E_{Purified\ RNA}$). El promedio es representado como una línea dentro de las barras, y el largo de las barras representa el error estándar (b). Adaptado de ⁴⁷².

Realizamos el mismo análisis con otro kit multiplex (GeneFinder) muy usado en Argentina, que amplifica los genes virales N, E y RdRp y el gen humano RP. Utilizamos 94 muestras nasofaríngeas elegidas al azar, de las cuales 38 eran positivas y 56 negativas. Apenas recibidas, se usó una alícuota de cada muestra para purificar el RNA y analizar por RT-qPCR; el remanente de cada muestra fue congelado. Posteriormente estas muestras fueron tratadas con PK+HID y analizadas por RT-qPCR. En particular, 3 de las 38 muestras positivas eran solo positivas para el amplicón N (consideradas positivas para SARS-CoV-2 según el criterio de diagnóstico ⁴⁷³) y negativas para los amplicones E y RdRp (3/38 y 4/38, respectivamente), por extracción de RNA. Mediante del procesamiento por PK+HID, 8 muestras más fueron N

positivas, pero negativas para E y RdRp. Otros autores también reportaron dificultades en la detección y corrimientos en los valores del CT para el amplicón E en muestras sin extracción de RNA ⁴⁶⁶.

Los análisis de CT obtenidos para las muestras positivas por ambos métodos muestran una mayor correlación para el amplicón N, en comparación con E y RdRp (Figura I.4a) entre los valores de CTs obtenidos para las muestras purificadas y las tratadas con PK+HID.

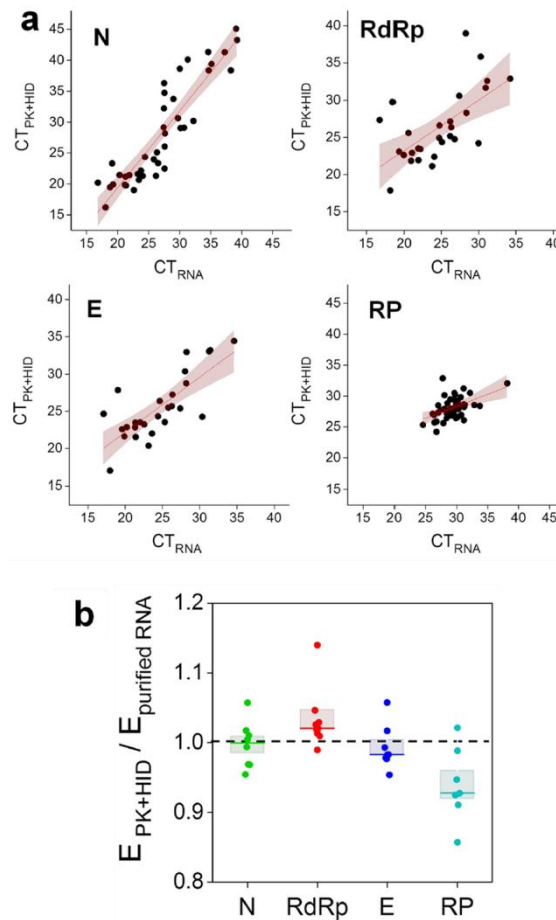


Figura I.4: El método PK+HID presenta una buena performance en combinación con el kit de RT-qPCR GeneFinder. Las muestras nasofaríngeas fueron procesadas con extracción de RNA o sujetas al tratamiento PK+HID. Los genes virales N, RdRp y E, y el gen humano RP fueron amplificados y detectados. CT obtenidos de las mismas muestras preparadas con los dos métodos. Las líneas rojas representan el ajuste lineal, y en rosa los intervalos de confianza del 95%. Los parámetros del ajuste son: pendiente = 1.2 ± 0.1 y ordenada = 5 ± 3 para el amplicón N, pendiente = 0.7 ± 0.2 y ordenada = 9 ± 4 para el amplicón RdRp, pendiente = 0.7 ± 0.1 y ordenada = 7 ± 3 para el amplicón E y pendiente = 0.4 ± 0.1 y ordenada = 16 ± 3 para el amplicón RP (a). Eficiencia de amplificación obtenida con muestras PK+HID (E_{PK+HID}) relativa a la eficiencia de las muestras de RNA purificado ($E_{Purified RNA}$). La mediana está representada como una línea dentro de las barras, y el largo de las barras representa el error estándar (b). Adaptado de ⁴⁷².

Observamos que la eficiencia de amplificación para los amplicones virales fue similar para las muestras tratadas por PK+HID y aquellas de RNA purificado, mientras que la E_{PCR} del control interno (RP) fue levemente inferior para muestras PK+HID (Figura I.4b).

Analizamos cuantitativamente la performance del tratamiento PK+HID combinado con GeneFinder, y calculamos la precisión, sensibilidad y especificidad de detección⁴⁷⁴ mostradas en la Tabla I.1. Debemos destacar que las muestras positivas no detectadas presentaban una baja carga viral relativa.

	PK+HID con GeneFinder
Precisión	0.95
Sensibilidad	0.92 ± 0.05
Especificidad	0.96 ± 0.04

Tabla I.1 Performance del tratamiento PK+HID con GeneFinder.

Estos resultados sugirieron que el método PK+HID es versátil y puede ser implementado con otros kits *multiplex* de RT-qPCR, como DisCoVery y GeneFinder.

I.6. Del laboratorio a la autorización de FlashPrep® para uso comercial

Nos contactamos con la empresa Argentina INBIO Highway, proveedor local de PK, y junto a ellos optimizamos un kit que fue presentado con el nombre FlashPrep®. Luego, INBIO Highway tramitó la autorización de FlashPrep® con la ANMAT, quién lo aprobó a fines de 2020. A comienzos de 2021 el kit comenzó a implementarse en diversos hospitales del país y centros de diagnóstico de la Provincia de Buenos Aires.

La Figura I.5 reproduce el folleto, confeccionado por INBIO Highway, donde se fotografía el manual de uso, botella con buffer y tubo con Proteinasa K.



Figura I.5: Volante publicitario del kit FlashPrep® comercializado por INBIO Highway. Adaptado de www.inbiohw.com.ar

I.7. Ensayos de validación

Para los ensayos de validación analizamos por RT-qPCR con el kit DisCoVery, 106 muestras positivas y 106 negativas, elegidas al azar, realizando la purificación del RNA y el tratamiento FlashPrep®, en forma simultánea. Cuantificamos y analizamos la relación entre los CTs obtenidos para cada gen, por cada método (Figura I.6a). La Tabla I.2 muestra los valores de precisión, sensibilidad y especificidad obtenidos.

	FlashPrep® con DisCoVery
Precisión	0.99
Sensibilidad	0.99 ± 0.01
Especificidad	0.99 ± 0.01

Tabla I.2 Performance de FlashPrep® en combinación con el kit de detección DisCoVery.

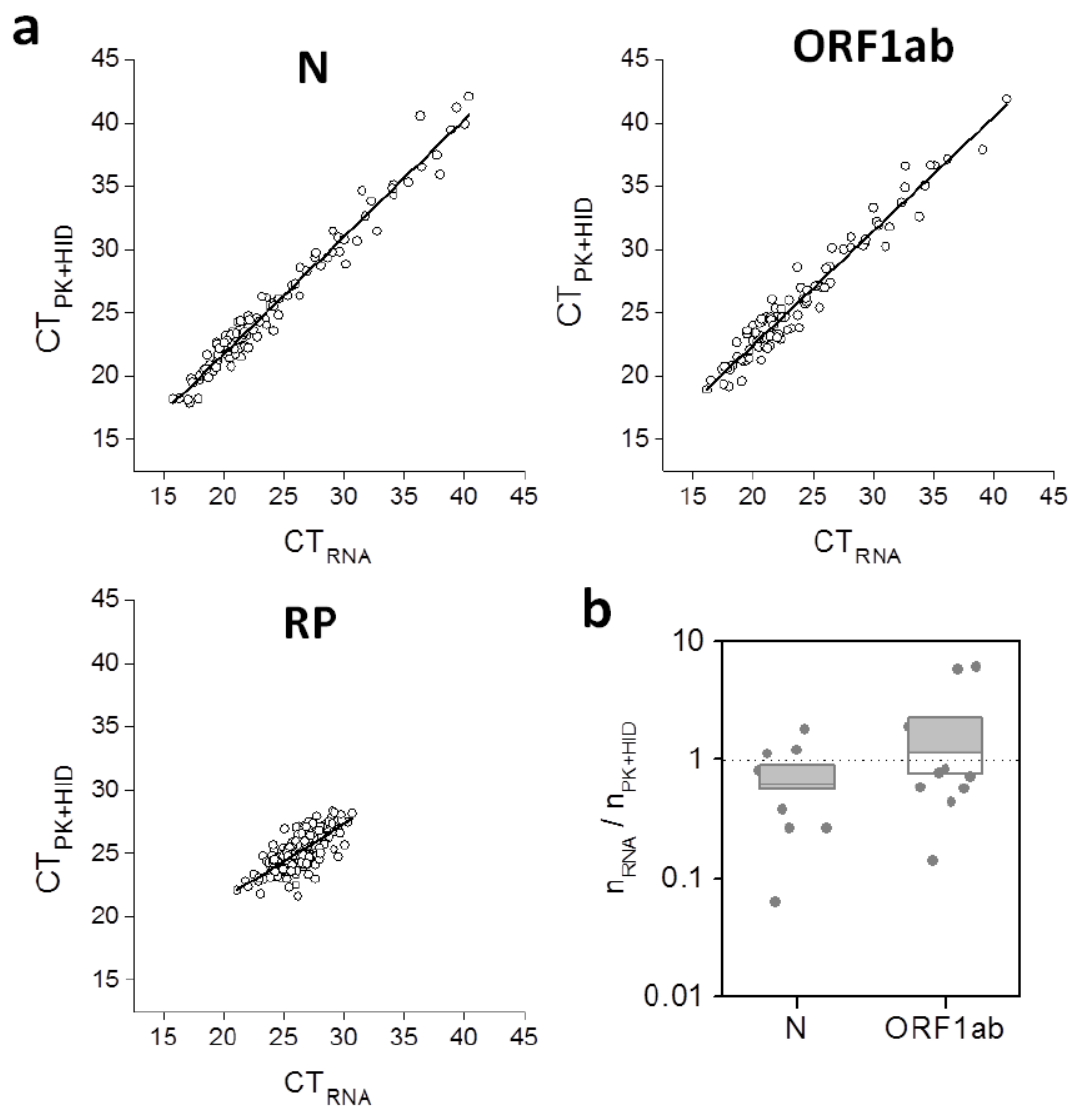


Figura I.6 Validación de FlashPrep®. 106 muestras nasofaríngeas elegidas al azar fueron procesadas simultáneamente por extracción de RNA o por FlashPrep® (PK+HID). Se amplificaron y detectaron los genes virales N y ORF1ab genes y el gen humano RP por RT-qPCR utilizando el kit DisCoVery. Valores de CT obtenidos para las mismas muestras por los dos métodos indicados, la línea representa la regresión de los datos **(a)**. Cociente relativo entre la cantidad de copias de amplicón viral usando PK+HID o purificación de RNA para aquellas muestras cuyo valor de CT era >30 **(b)**. Adaptado de ⁴⁷².

En este ensayo de validación, también estudiamos las curvas de amplificación de muestras positivas (10 y 12 muestras para los genes N y ORF1ab, respectivamente) con baja carga viral ($CT > 30$) y estimamos la cantidad relativa de copias de amplicón viral, tanto para el RNA purificado como para el tratamiento con PK+HID. La relación entre n_{PK+HID} y n_{RNA} fue 0.7 ± 0.2 para N y de 1.7 ± 0.6 para ORF1ab (Figura I.6b).

Por otra parte, se realizó una validación de forma independiente en el Hospital San Juan de Dios, a partir de 57 muestras, en la cual se obtuvo una sensibilidad, especificidad y precisión del 0.94 ± 0.06 , 1 y 0.98, respectivamente.

1.8. Del laboratorio al análisis clínico

Los ensayos descriptos previamente fueron realizados en el INBIRS, un centro de referencia con excelentes recursos humanos y tecnológicos. Dado que la mayoría de los laboratorios del país no cuenta con estas condiciones de trabajo, decidimos analizar la robustez del kit desarrollado en condiciones más representativas de aquellas en las cuales se realizan estos estudios en los laboratorios del país.

Dado que en numerosos laboratorios se producen demoras en los análisis por RT-qPCR de muestras clínicas, analizamos cuánto tiempo las muestras tratadas con FlashPrep® pueden preservarse a 4°C en heladera sin que se produzca una degradación significativa del RNA viral y la consecuente pérdida en la sensibilidad de la detección.

Con este objetivo, procesamos 10 muestras positivas con FlashPrep® y las preservamos en la heladera por 0, 20 y 40 hs; las muestras fueron analizadas posteriormente por RT-qPCR utilizando el kit DisCoVery. La Figura 11.7 muestra que los valores de CT para los genes N y ORF1ab se mantienen durante las primeras 20 hs, incrementando posteriormente. No detectamos variaciones en el CT para el gen RP en este período. Estos resultados sugieren que las muestras pueden permanecer refrigeradas a 4°C hasta 20 hs previo a su análisis por RT-qPCR.

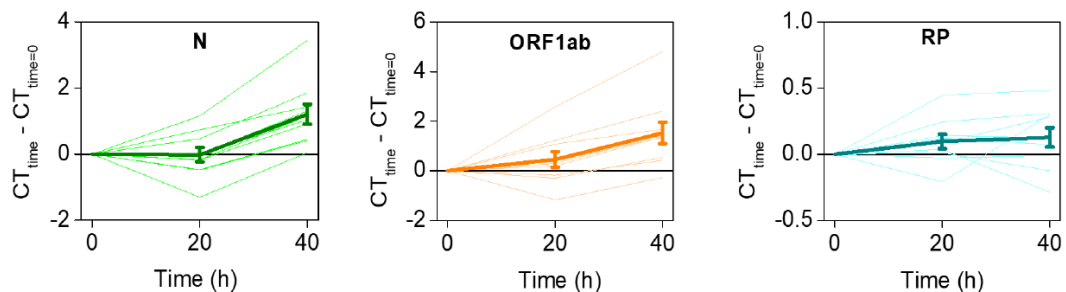


Figura 1.7 Las muestras procesadas con FlashPrep® pueden permanecer a 4°C hasta por 20 hs. Se procesaron 10 muestras nasofaríngeas positivas con FlashPrep® y se mantuvieron refrigeradas a 4°C por distintos tiempos (0, 20 y 40 hs). Los genes virales N y ORF1ab y el gen humano RP se amplificaron y detectaron por RT-qPCR. Se representa la diferencia entre el CT obtenido a los distintos tiempos de incubación respecto a aquel obtenido para las muestras sin incubar. Las líneas finas representan muestras individuales y las líneas gruesas la media con el desvío estándar. Adaptado de ⁴⁷².

Otra práctica muy común en los laboratorios clínicos es que los reactivos se preservan en un freezer común (-20°C) sin ser alicuotados, por lo cual es necesario descongelarlos en cada uso y sufren ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento que podrían producir una pérdida significativa en la actividad. Por esta razón, decidimos estudiar si el kit Flashprep®, una vez preparado, es estable a dichos ciclos.

Procesamos 10 muestras positivas con reactivo Flashprep® control o sometido a 10 ciclos de congelamiento/descongelamiento, simulando el procedimiento que se realizaría en un laboratorio de análisis clínico. Utilizamos el kit DisCoVery para la detección y determinamos la diferencia entre los valores de CT obtenidos para cada muestra con el reactivo control o sometido a 10 ciclos. La diferencia media obtenida fue de 0.17 ± 0.15 (N), -0.05 ± 0.20 (ORF1ab) y 0.01 ± 0.17 (RP) indicando que el reactivo Flashprep® es estable a 10 ciclos de congelamiento/descongelamiento que es lo que estimamos podrían sufrir los reactivos debido a su presentación y uso.

1.9. Ventajas de FlashPrep®

Hemos mencionado previamente la necesidad imperiosa, en la pandemia, de contar con métodos de alta sensibilidad para el procesamiento de las muestras de hisopados que sean rápidos, baratos y no requieran insumos importados.

En las secciones anteriores, mostramos que FlashPrep® es un kit producido por una empresa argentina que permite procesar muestras de hisopados, garantizando la detección del virus SARS-CoV-2 con alta sensibilidad y especificidad.

La Tabla I.3 muestra una comparación del tiempo requerido para procesar 94 muestras (éste es el número máximo de muestras que se pueden analizar simultáneamente en una placa *multiwell* de 96 pocillos por RT-qPCR) mediante procedimientos de extracción manual de RNA o procesamiento con FlashPrep®. La tabla muestra que la implementación de nuestro kit permite una reducción del ~92% en el tiempo necesario para procesar 94 muestras, y una disminución en los costos por ensayo de un ~80-90%.

	Extracción de RNA	FlashPrep®
Tiempo requerido para procesar 94 muestras	6 horas	~30 minutos
Costo por muestra	5-10 dólares	~1 dólar

Tabla I.3 Ventajas del uso de FlashPrep®.

La Figura I.8 muestra las distintas provincias y localidades de Argentina donde se utilizó el producto, mostrando la diseminación del uso del kit a lo largo de todo el país.

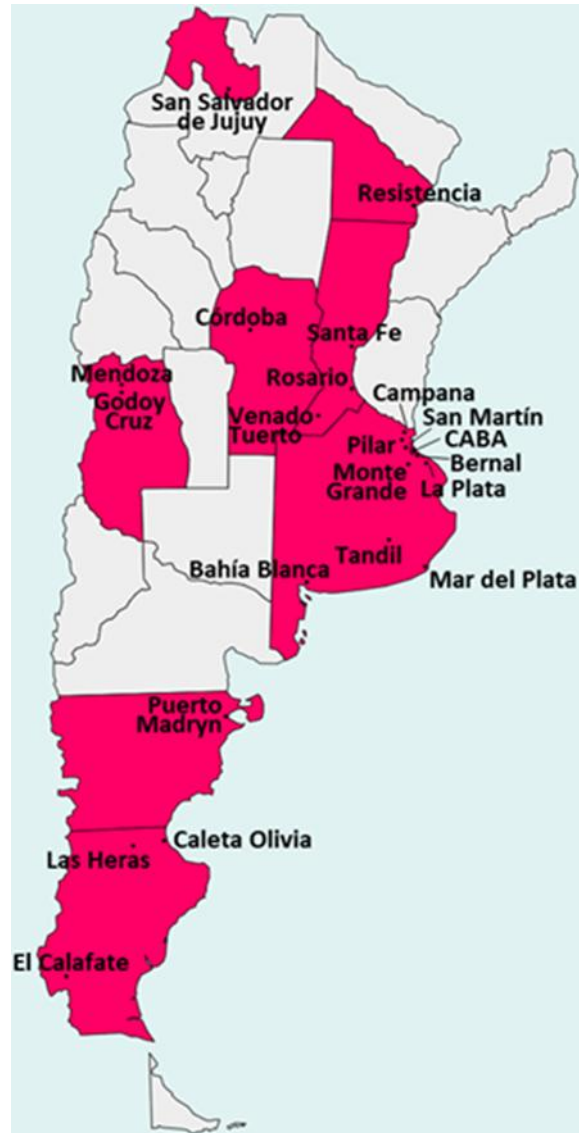


Figura I.8 Uso del kit FlashPrep® en Argentina. En rosa se indican las provincias donde se comercializó.

1.10. Conclusiones

En el contexto de la pandemia causada por el SARS-CoV-2 y con la colaboración del INBIRS (Ex Centro Nacional de Referencia para el Sida) desarrollamos un protocolo de procesamiento de hisopados nasofaríngeos donde puede omitirse la extracción de RNA.

Nuestros resultados indican que es posible reemplazar el paso de extracción de RNA para la determinación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

Adoptar este protocolo, autorizado por ANMAT, permitió una importante reducción en los costos de los ensayos clínicos y en el tiempo de procesamiento por muestra, convirtiéndose en una alternativa sencilla y económica, permitiendo ampliar la capacidad de diagnóstico en países con recursos económicos y humanos limitados, como el nuestro.

1.11. Materiales y métodos

1.11.1 Recolección de muestras

Los hisopados nasofaríngeos fueron recolectados y depositados en 2-5 ml de solución salina. Estas muestras clínicas fueron procesadas en el INBIRS. Para nuestros experimentos, utilizamos el volumen remanente de hisopados que fueron colectados para diagnóstico, previamente anonimizados. En estas circunstancias y, para estudios que involucren el desarrollo de herramientas para el diagnóstico de COVID-19, el Comité de Ética en Investigación de la Fundación Huésped, consideró innecesario obtener el consentimiento informado de los pacientes.

Para los análisis de rutina, la extracción de RNA se realizó tomando 300 µl de muestra, utilizando un equipo de extracción automatizado (Chemagic 360-D), según las instrucciones del fabricante.

1.11.2 Preparación de muestras por PK-HID

10 µl de una solución 10 mg/ml de Proteinasa K fueron colocados en tubos de PCR de 0.2 ml. Luego, se agregaron a esos tubos 90 µl de muestra de hisopado, previamente vortexado.

Para los experimentos donde se varió la concentración de Proteinasa K, se agregaron 10 µl de una solución de PK de la concentración adecuada. Las muestras se incubaron por 15 min a 55°C y luego por 5 min a 98°C en un termociclador con tapa térmica. Finalmente, las muestras se enfriaron y mantuvieron a 4°C hasta su determinación por RT-qPCR.

1.11.3 RT-qPCR

La Tabla I.4 compila las condiciones en las cuales se realizaron los distintos ensayos de RT-qPCR.

Kit	Singleplex o multiplex	Genes	Ciclos	Termociclador
GoTaq Prob 1-SeptRT-qPCR System (Promega) y 2019-nCoV CDC Diagnosis Panel	Singleplex	N1, N2 y RP	15 min a 45°C, 2 min a 95°C y 45 ciclos de 3 s a 95°C y 30 s a 55°C	StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
DisCoVery SARS-COV-2 RT-PCR (Safecare Biotech)	Multiplex	N, ORF1ab y RP	5 min a 50°C, 30 s a 95°C y 45 ciclos de 5 s a 95°C y 34 s a 60°C	CFX96 Real-Time System (BioRad)
GeneFinderTM COVID-19 Plus RealAmp (Gene Finder)	Multiplex	N, E, RdRp y RP	20 min a 50°C, 5 min a 95°C y 45 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 58°C	CFX96 Real-Time System (BioRad)

Tabla I.4 Kits utilizados para RT-qPCR.

I.11.4 Análisis de datos

Las curvas de amplificación obtenidas en los experimentos utilizando los kits DisCoVery y GeneFinder fueron analizadas con el software CFX Manager (BioRad) para obtener los valores de CT. Se utilizó además el software *LinRegPCR* para obtener los valores de la eficiencia y la cantidad inicial de copias del amplicón a partir de las curvas de amplificación.

Bibliografía

1. Bacakova, L. *et al.* Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol. Adv.* **36**, 1111–1126 (2018).
2. Pessina, A. & Gribaldo, L. The key role of adult stem cells: Therapeutic perspectives. *Current Medical Research and Opinion* **22**, 2287–2300 (2006).
3. Poliwoda, S. *et al.* Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop. Rev. (Pavia)*. **14**, (2022).
4. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy* **10**, (2019).
5. Kusumoto, D., Yuasa, S. & Fukuda, K. Induced Pluripotent Stem Cell-Based Drug Screening by Use of Artificial Intelligence. *Pharmaceuticals* **15**, (2022).
6. Kouroupi, G., Antoniou, N., Prodromidou, K., Taoufik, E. & Matsas, R. Patient-derived induced pluripotent stem cell-based models in parkinson’s disease for drug identification. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–26 (2020).
7. Ito, D. *et al.* Maiden voyage: induced pluripotent stem cell-based drug screening for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **146**, 13–19 (2023).
8. Cheng, J. Cell-Based Therapies in Clinical Pain Management. 273–286
9. Li, X. J., Li, C. Y., Bai, D. & Leng, Y. Insights into stem cell therapy for diabetic retinopathy: A bibliometric and visual analysis. *Neural Regen. Res.* **16**, 172–178 (2021).
10. Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* **27**, 523–531 (2020).
11. Kolios, G. & Moodley, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* **85**, 3–10 (2012).
12. Sugawara, T., Nishino, K., Umezawa, A. & Akutsu, H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* **3**, (2012).
13. Grubb, B. J. Developmental Biology, Eighth Edition. Scott F. Gilbert, editor. *Integr. Comp. Biol.* **46**, 652–653 (2006).
14. Dyce, J., George, M., Goodall, H. & Fleming, T. P. Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages. *Development* **100**, 685–698 (1987).
15. Saiz, N. & Plusa, B. Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction* **145**, (2013).
16. Vianello, S. & Lutolf, M. P. Understanding the Mechanobiology of Early Mammalian Development through Bioengineered Models. *Developmental Cell* **48**, 751–763 (2019).
17. Even-Ram, S., Artym, V. & Yamada, K. M. Matrix Control of Stem Cell Fate. *Cell* **126**, 645–647 (2006).
18. Mathew, B. *et al.* Mouse ICM Organoids Reveal Three-Dimensional Cell Fate Clustering. *Biophys. J.* **116**, 127–141 (2019).
19. Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A. & Nichols, J. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* **16**, 513–525 (2014).
20. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S. & Saitou, M. Reconstitution of the mouse

- germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* **146**, 519–532 (2011).
21. Nakamura, T. *et al.* A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. *Nature* **537**, 57–62 (2016).
 22. Takahashi, S., Kobayashi, S. & Hiratani, I. Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 1191–1203 (2018).
 23. Kinoshita, M. & Smith, A. Pluripotency Deconstructed. *Development Growth and Differentiation* **60**, 44–52 (2018).
 24. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
 25. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7634–7638 (1981).
 26. Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523 (2008).
 27. Winslow, T. Regenerative Medicine 2006 © 2006. *Cell Res.* (2006).
 28. Macarthur, B. D., Ma'ayan, A. & Lemischka, I. R. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 672–681 (2009).
 29. Hanna, J. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9222–9227 (2010).
 30. Ginis, I. *et al.* Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **269**, 360–380 (2004).
 31. Zhang, J. *et al.* Deeply conserved super-enhancers maintain stem cell pluripotency in placental mammals. (2022).
 32. Weatherbee, B. A. T., Cui, T. & Zernicka-Goetz, M. Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **474**, 91–99 (2021).
 33. Tang, X. Y. *et al.* Human organoids in basic research and clinical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **7**, (2022).
 34. Wang, X., Gao, M., Wang, Y. & Zhang, Y. The progress of pluripotent stem cell-derived pancreatic β -cells regeneration for diabetic therapy. *Frontiers in Endocrinology* **13**, (2022).
 35. Eguizabal, C. *et al.* Two decades of embryonic stem cells: a historical overview. *Hum. Reprod. Open* **2019**, (2019).
 36. Cha, Y., Park, T. Y., Leblanc, P. & Kim, K. S. Current Status and Future Perspectives on Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders* **16**, 22–41 (2023).
 37. Pittenger, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine* **4**, (2019).
 38. Kim, D., Lee, A. E., Xu, Q., Zhang, Q. & Le, A. D. Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Application in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - A Comprehensive Review. *Frontiers in Immunology* **12**, (2021).
 39. Domínguez, L. M. *et al.* Chromatographic Scalable Method to Isolate Engineered Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Liver Fibrosis in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
 40. Volarevic, V. *et al.* Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences* **15**, 36–45 (2018).
 41. Omole, A. E. & Fakoya, A. O. J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent

- stem cells: Historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* **2018**, (2018).
42. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
 43. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
 44. Moradi, S. *et al.* Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): Social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research and Therapy* **10**, (2019).
 45. Ye, L., Swingen, C. & Zhang, J. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Potential for Basic and Clinical Sciences. *Curr. Cardiol. Rev.* **9**, 63–72 (2013).
 46. Medvedev, S. P., Shevchenko, A. I. & Zakian, S. M. Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine. *Acta Naturae* **2**, 18–27 (2010).
 47. Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H. & Mummery, C. L. Induced pluripotent stem cells: The new patient? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 713–726 (2012).
 48. Gorecka, J. *et al.* The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing. *Stem Cell Research and Therapy* **10**, (2019).
 49. Yiangou, L., Ross, A. D. B., Goh, K. J. & Vallier, L. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Endoderm for Modeling Development and Clinical Applications. *Cell Stem Cell* **22**, 485–499 (2018).
 50. Huang, C. Y. *et al.* Human iPSC banking: Barriers and opportunities. *Journal of Biomedical Science* **26**, (2019).
 51. Rais, Y. *et al.* Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* **502**, 65–70 (2013).
 52. Zhao, Z. *et al.* Organoids. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2**, (2022).
 53. Watanabe, N., Santostefano, K. E., Yachnis, A. T. & Terada, N. A pathologist's perspective on induced pluripotent stem cells. *Lab. Investig.* **97**, 1126–1132 (2017).
 54. Loh, Y.-H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **38**, 431–440 (2006).
 55. Swain, N., Thakur, M., Pathak, J. & Swain, B. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **24**, 368 (2020).
 56. Chowdhary, S. & Hadjantonakis, A. K. Journey of the mouse primitive endoderm: from specification to maturation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **377**, (2022).
 57. Kalkan, T. *et al.* Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Dev.* **144**, 1221–1234 (2017).
 58. Li, L. *et al.* Synergistic transcriptional and post-transcriptional regulation of ESC characteristics by core pluripotency transcription factors in protein-protein interaction networks. *PLoS One* **9**, (2014).
 59. Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947–956 (2005).
 60. Chen, X. *et al.* Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* **133**, 1106–1117 (2008).
 61. Mandal, G. *et al.* Heterodimer formation by Oct4 and Smad3 differentially regulates epithelial-to-mesenchymal transition-associated factors in breast cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1864**, 2053–2066 (2018).
 62. van den Berg, D. L. C. *et al.* An Oct4-Centered Protein Interaction Network in Embryonic

- Stem Cells. *Cell Stem Cell* **6**, 369–381 (2010).
63. Pardo, M. *et al.* An Expanded Oct4 Interaction Network: Implications for Stem Cell Biology, Development, and Disease. *Cell Stem Cell* **6**, 382–395 (2010).
 64. Cox, J. L., Mallanna, S. K., Luo, X. & Rizzino, A. Sox2 uses multiple domains to associate with proteins present in Sox2-protein complexes. *PLoS One* **5**, (2010).
 65. Radzishewska, A. *et al.* A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat. Cell Biol.* **15**, 579–590 (2013).
 66. Karwacki-Neisius, V. *et al.* Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell* **12**, 531–545 (2013).
 67. Buecker, C. *et al.* Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* **14**, 838–853 (2014).
 68. Xiong, L. *et al.* Oct4 differentially regulates chromatin opening and enhancer transcription in pluripotent stem cells. *Elife* **11**, (2022).
 69. Soufi, A. *et al.* Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* **161**, 555–568 (2015).
 70. Vanzan, L. *et al.* High throughput screening identifies SOX2 as a super pioneer factor that inhibits DNA methylation maintenance at its binding sites. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
 71. Friman, E. T. *et al.* Dynamic regulation of chromatin accessibility by pluripotency transcription factors across the cell cycle. *Elife* **8**, (2019).
 72. Balsalobre, A. & Drouin, J. Pioneer factors as master regulators of the epigenome and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 449–464 (2022).
 73. Wang, L. *et al.* INO80 facilitates pluripotency gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming, and blastocyst development. *Cell Stem Cell* **14**, 575–591 (2014).
 74. Chambers, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655 (2003).
 75. Strebing, D. *et al.* Endogenous fluctuations of OCT 4 and SOX 2 bias pluripotent cell fate decisions. *Mol. Syst. Biol.* **15**, (2019).
 76. Rizzino, A. & Wuebben, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 780–791 (2016).
 77. Herberg, M. *et al.* Dissecting mechanisms of mouse embryonic stem cells heterogeneity through a model-based analysis of transcription factor dynamics. *J. R. Soc. Interface* **13**, (2016).
 78. Udomlumleart, T., Hu, S. & Garg, S. Lineages of embryonic stem cells show non-Markovian state transitions. *iScience* **24**, (2021).
 79. Wolff, S. C. *et al.* Inheritance of OCT 4 predetermines fate choice in human embryonic stem cells. *Mol. Syst. Biol.* **14**, 1–9 (2018).
 80. Martello, G. & Smith, A. The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **30**, 647–675 (2014).
 81. Li, Y. *et al.* Maintenance of human embryonic stem cells on gelatin. *Chinese Sci. Bull.* **54**, 4214–4220 (2009).
 82. Murray, P. & Edgar, D. The regulation of embryonic stem cell differentiation by Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). *Differentiation* **68**, 227–234 (2001).
 83. Singh, A. M., Bechard, M., Smith, K. & Dalton, S. Reconciling the different roles of Gsk3 β in «naïve» and «primed» pluripotent stem cells. *Cell Cycle* **11**, 2991–2996 (2012).

84. Chen, H. *et al.* Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5936–E5943 (2015).
85. Hirai, H., Karian, P. & Kikyo, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem. J.* **438**, 11–23 (2011).
86. Huang, K., Maruyama, T. & Fan, G. The naive state of human pluripotent stem cells: A synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell* **15**, 410–415 (2014).
87. Hastreiter, S. *et al.* Inductive and Selective Effects of GSK3 and MEK Inhibition on Nanog Heterogeneity in Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* **11**, 58–69 (2018).
88. Wray, J. *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.* **13**, 838–845 (2011).
89. Ghimire, S. *et al.* Comparative analysis of naive, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
90. Ko, C. I., Wang, Q., Fan, Y., Xia, Y. & Puga, A. Pluripotency factors and Polycomb Group proteins repress aryl hydrocarbon receptor expression in murine embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **12**, 296–308 (2014).
91. Aban, C. E. *et al.* Downregulation of E-cadherin in pluripotent stem cells triggers partial EMT. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
92. Zidovska, A. The rich inner life of the cell nucleus: dynamic organization, active flows, and emergent rheology. *Biophysical Reviews* **12**, 1093–1106 (2020).
93. Feric, M. & Misteli, T. Function moves biomolecular condensates in phase space. 1–14 (2022). doi:10.1002/bies.202200001
94. Dahl, K. N., Ribeiro, A. J. S. & Lammerding, J. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circulation Research* **102**, 1307–1318 (2008).
95. De Magistris, P. & Antonin, W. The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. *Current Biology* **28**, R487–R497 (2018).
96. Nunes, V. S. & Moretti, N. S. Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biology International* **41**, 2–7 (2017).
97. Niu, X. *et al.* Biomolecular condensates: Formation mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. *MedComm* **4**, (2023).
98. Sleeman, J. E. & Trinkle-Mulcahy, L. Nuclear bodies: New insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Curr. Opin. Cell Biol.* **28**, 76–83 (2014).
99. Moraru, M. & Schalch, T. Chromatin fiber structural motifs as regulatory hubs of genome function? *Essays in Biochemistry* **63**, 123–132 (2019).
100. Uhler, C. & Shivashankar, G. V. Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 717–727 (2017).
101. Yadav, T., Quivy, J. P. & Almouzni, G. Chromatin plasticity: A versatile landscape that underlies cell fate and identity. *Science* **361**, 1332–1336 (2018).
102. Chen, P., Li, W. & Li, G. Structures and Functions of Chromatin Fibers. *Annual Review of Biophysics* **50**, 95–116 (2021).
103. Ozer, G., Luque, A. & Schlick, T. The chromatin fiber: Multiscale problems and approaches. *Current Opinion in Structural Biology* **31**, 124–139 (2015).
104. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**, 381–395 (2011).
105. Kadauke, S. & Blobel, G. A. Chromatin loops in gene regulation. *Biochimica et Biophysica*

- Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1789**, 17–25 (2009).
106. Mora, A., Sandve, G. K., Gabrielsen, O. S. & Eskeland, R. In the loop: promoter-enhancer interactions and bioinformatics. *Briefings in bioinformatics* **17**, 980–995 (2016).
 107. Misteli, T. The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. *Cell* **183**, 28–45 (2020).
 108. McArthur, E. & Capra, J. A. Topologically associating domain boundaries that are stable across diverse cell types are evolutionarily constrained and enriched for heritability. *Am. J. Hum. Genet.* **108**, 269–283 (2021).
 109. Zhong, H. *et al.* 3D genome perspective on cell fate determination, organ regeneration, and diseases. *Cell Prolif.* 1–13 (2023). doi:10.1111/cpr.13482
 110. Briand, N. & Collas, P. Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology* **21**, (2020).
 111. van Steensel, B. & Belmont, A. S. Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* **169**, 780–791 (2017).
 112. Cremer, T. & Cremer, C. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 292–301 (2001).
 113. Fritz, A. J., Sehgal, N., Pliss, A., Xu, J. & Berezney, R. Chromosome territories and the global regulation of the genome. *Genes Chromosomes and Cancer* **58**, 407–426 (2019).
 114. Mansisidor, A. R. & Risca, V. I. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights. *Nucleus* **13**, 236–276 (2022).
 115. Klemm, S. L., Shipony, Z. & Greenleaf, W. J. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics* **20**, 207–220 (2019).
 116. Albin, S., Zakharova, V. & Ait-Si-Ali, S. *Histone Modifications. Epigenetics and Regeneration* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814879-2.00003-0
 117. Tyagi, M., Imam, N., Verma, K. & Patel, A. K. Chromatin remodelers: We are the drivers!! *Nucleus* **7**, 388–404 (2016).
 118. Li, M., Liu, G. H. & Belmonte, J. C. I. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 524–535 (2012).
 119. Millan, J., Lesarri, A., Fernández, J. A. & Martínez, R. Exploring Epigenetic Marks by Analysis of Noncovalent Interactions. *ChemBioChem* **22**, 408–415 (2021).
 120. Bruneau, B. G. Epigenetic Regulation of the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **107**, 324–326 (2010).
 121. King, H. W. & Klose, R. J. The pioneer factor OCT4 requires the chromatin remodeller BRG1 to support gene regulatory element function in mouse embryonic stem cells. *Elife* **6**, (2017).
 122. Zhu, F. *et al.* The interaction landscape between transcription factors and the nucleosome. *Nature* **562**, 76–81 (2018).
 123. Varga-Weisz, P. D. Insights into how chromatin remodeling factors find their target in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19611–19612 (2010).
 124. Li, S., Zheng, E. B., Zhao, L. & Liu, S. Nonreciprocal and Conditional Cooperativity Directs the Pioneer Activity of Pluripotency Transcription Factors. *Cell Rep.* **28**, 2689–2703.e4 (2019).
 125. Michael, A. K. *et al.* Mechanisms of OCT4-SOX2 motif readout on nucleosomes. *Science (80-.)*. **368**, 1460–1465 (2020).
 126. MacCarthy, C. M. *et al.* OCT4 interprets and enhances nucleosome flexibility. *Nucleic Acids Res.* **50**, 10311–10327 (2022).
 127. Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M. & Cosma, M. P. Chromatin

- fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* **160**, 1145–1158 (2015).
128. Dehghani, H. Regulation of Chromatin Organization in Cell Stemness: The Emerging Role of Long Non-coding RNAs. *Stem Cell Reviews and Reports* **17**, 2042–2053 (2021).
 129. Mitrea, D. M., Mittasch, M., Gomes, B. F., Klein, I. A. & Murcko, M. A. Modulating biomolecular condensates: a novel approach to drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 841–862 (2022).
 130. Strom, A. R. & Brangwynne, C. P. The liquid nucleome – phase transitions in the nucleus at a glance. *J. Cell Sci.* **132**, (2019).
 131. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 285–298 (2017).
 132. Sabari, B. R., Dall’Agnese, A. & Young, R. A. Biomolecular Condensates in the Nucleus. *Trends in Biochemical Sciences* **45**, 961–977 (2020).
 133. Brangwynne, C. P. *et al.* Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science (80-.)*. **324**, 1729–1732 (2009).
 134. Feric, M. *et al.* Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* **165**, 1686–1697 (2016).
 135. Tong, X. *et al.* Liquid–liquid phase separation in tumor biology. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **7**, (2022).
 136. Mir, M., Bickmore, W., Furlong, E. E. M. & Narlikar, G. Chromatin topology, condensates and gene regulation: Shifting paradigms or just a phase? *Dev.* **146**, (2019).
 137. Shin, Y. & Brangwynne, C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* **357**, (2017).
 138. Lyon, A. S., Peeples, W. B. & Rosen, M. K. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 215–235 (2021).
 139. Tatomer, D. C. *et al.* Concentrating pre-mRNA processing factors in the histone locus body facilitates efficient histone mRNA biogenesis. *J. Cell Biol.* **213**, 557–570 (2016).
 140. Zhang, Y., Narlikar, G. J. & Kutateladze, T. G. Enzymatic Reactions inside Biological Condensates. *Journal of Molecular Biology* **433**, (2021).
 141. Kent, S. *et al.* Phase-Separated Transcriptional Condensates Accelerate Target-Search Process Revealed by Live-Cell Single-Molecule Imaging. *Cell Rep.* **33**, (2020).
 142. Li, H. *et al.* Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1784–1796 (2000).
 143. Takahara, T. & Maeda, T. Transient Sequestration of TORC1 into Stress Granules during Heat Stress. *Mol. Cell* **47**, 242–252 (2012).
 144. Klosin, A. *et al.* Phase separation provides a mechanism to reduce noise in cells. *Science (80-.)*. **367**, 464–468 (2020).
 145. Oses, C., Stortz, M., Veneri, P., Guberman, A. & Levi, V. Pluripotency transcription factors at the focus: The phase separation paradigm in stem cells. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 2871–2878 (2021).
 146. Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 18–29 (2015).
 147. Li, P. *et al.* Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* **483**, 336–340 (2012).
 148. Chong, S. *et al.* Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science (80-.)*. **361**, (2018).

149. Fung, H. Y. J., Birol, M. & Rhoades, E. IDPs in macromolecular complexes: the roles of multivalent interactions in diverse assemblies. *Current Opinion in Structural Biology* **49**, 36–43 (2018).
150. Mittag, T. & Parker, R. Multiple Modes of Protein–Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly. *Journal of Molecular Biology* **430**, 4636–4649 (2018).
151. Erdel, F. & Rippe, K. Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation. *Biophys. J.* **114**, 2262–2270 (2018).
152. Shakya, A., Park, S., Rana, N. & King, J. T. Liquid-Liquid Phase Separation of Histone Proteins in Cells: Role in Chromatin Organization. *Biophys. J.* **118**, 753–764 (2020).
153. Turner, A. L. *et al.* Highly disordered histone H1–DNA model complexes and their condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 11964–11969 (2018).
154. Hammonds, E. F. *et al.* Histone H3 and H4 tails play an important role in nucleosome phase separation. *Biophys. Chem.* **283**, (2022).
155. Li, X., An, Z., Zhang, W. & Li, F. Phase Separation: Direct and Indirect Driving Force for High-Order Chromatin Organization. *Genes* **14**, (2023).
156. Gibson, B. A. *et al.* Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell* **179**, 470–484.e21 (2019).
157. Wang, L. *et al.* Histone Modifications Regulate Chromatin Compartmentalization by Contributing to a Phase Separation Mechanism. *Mol. Cell* **76**, 646–659.e6 (2019).
158. Peng, A. & Weber, S. C. Evidence for and against liquid-liquid phase separation in the nucleus. *Non-coding RNA* **5**, (2019).
159. McSwiggen, D. T. *et al.* Evidence for DNA-mediated nuclear compartmentalization distinct from phase separation. *Elife* **8**, (2019).
160. McSwiggen, D. T., Mir, M., Darzacq, X. & Tjian, R. Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes & development* **33**, 1619–1634 (2019).
161. Rippe, K. Liquid–Liquid Phase Separation in Chromatin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **14**, (2022).
162. Dolgin, E. What lava lamps and vinaigrette can teach us about cell biology. *Nature* **555**, 300–302 (2018).
163. Narlikar, G. J. *et al.* Is transcriptional regulation just going through a phase? *Mol. Cell* **81**, 1579–1585 (2021).
164. Leslie, M. SEPARATION: Phase separation, an idea about how cells organize their contents and functions into dropletlike compartments, has divided biologists. *Science (80-.)*. **371**, 336–338 (2021).
165. Alberti, S., Gladfelter, A. & Mittag, T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* **176**, 419–434 (2019).
166. Grande, M. a, van der Kraan, I., de Jong, L. & van Driel, R. Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 1)**, 1781–91 (1997).
167. Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A. & Cook, P. R. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription «factories» in human nuclei. *J. Cell Sci.* **109**, 1427–1436 (1996).
168. Osborne, C. S. *et al.* Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat. Genet.* **36**, 1065–1071 (2004).
169. Zaidi, S. K. *et al.* The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments. *EMBO Reports* **6**, 128–133 (2005).
170. Liu, Z. *et al.* 3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells. *Elife* **3**, e04236

- (2014).
171. Stortz, M., Presman, D. M., Pecci, A. & Levi, V. Phasing the intranuclear organization of steroid hormone receptors. *Biochem. J.* **478**, 443–461 (2021).
 172. Stortz, M., Pecci, A., Presman, D. M. & Levi, V. Unraveling the molecular interactions involved in phase separation of glucocorticoid receptor. *BMC Biol.* **18**, (2020).
 173. Demmerle, J., Hao, S. & Cai, D. Transcriptional condensates and phase separation: condensing information across scales and mechanisms. *Nucleus* **14**, 1–15 (2023).
 174. Cho, W. K. *et al.* Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* (80-.). **361**, 412–415 (2018).
 175. Sabari, B. R. *et al.* Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* (80-.). **361**, (2018).
 176. Boija, A. *et al.* Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **175**, 1842–1855.e16 (2018).
 177. Basu, S. *et al.* Unblending of Transcriptional Condensates in Human Repeat Expansion Disease. *Cell* **181**, 1062–1079.e30 (2020).
 178. Wei, M. T. *et al.* Nucleated transcriptional condensates amplify gene expression. *Nat. Cell Biol.* **22**, 1187–1196 (2020).
 179. Cai, D. *et al.* Phase separation of YAP reorganizes genome topology for long-term YAP target gene expression. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1578–1589 (2019).
 180. Shrinivas, K. *et al.* Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates. *Mol. Cell* **75**, 549–561.e7 (2019).
 181. Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K. & Sharp, P. A. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **169**, 13–23 (2017).
 182. Plys, A. J. & Kingston, R. E. Dynamic condensates activate transcription. *Science* **361**, 329–330 (2018).
 183. Tatavosian, R. *et al.* Nuclear condensates of the Polycomb protein chromobox 2 (CBX2) assemble through phase separation. *J. Biol. Chem.* **294**, 1451–1463 (2019).
 184. Brown, K., Andrianakos, H., Ingersoll, S. & Ren, X. Single-molecule imaging of epigenetic complexes in living cells: Insights from studies on Polycomb group proteins. *Nucleic Acids Res.* **49**, 6621–6637 (2021).
 185. Strom, A. R. *et al.* Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* **547**, 241–245 (2017).
 186. Winkler, P. M. *et al.* Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* **547**, 1–8 (2017).
 187. Weaver, C. J., Patel, A. L., Shvartsman, S. Y., Levine, M. S. & Treen, N. ERK signaling dissolves ERF repression condensates in living embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, (2022).
 188. Trojanowski, J. *et al.* Transcription activation is enhanced by multivalent interactions independent of phase separation. *Mol. Cell* **82**, 1878–1893.e10 (2022).
 189. Stortz, M. *et al.* SOX2 Modulates the Nuclear Organization and Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor. *J. Mol. Biol.* **434**, (2022).
 190. Owen, I. & Shewmaker, F. The role of post-translational modifications in the phase transitions of intrinsically disordered proteins. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, (2019).
 191. Boehning, M. *et al.* RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 833–840 (2018).
 192. Guo, Y. E. *et al.* Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* **572**, 543–548 (2019).

193. Cramer, P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* **573**, 45–54 (2019).
194. Hsin, J. P. & Manley, J. L. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes and Development* **26**, 2119–2137 (2012).
195. Henninger, J. E. *et al.* RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell* **184**, 207–225.e24 (2021).
196. Brehm, A., Ohbo, K. & Schöler, H. The carboxy-terminal transactivation domain of Oct-4 acquires cell specificity through the POU domain. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 154–162 (1997).
197. Choi, K. J. *et al.* NANOG prion-like assembly mediates DNA bridging to facilitate chromatin reorganization and activation of pluripotency. *Nat. Cell Biol.* **24**, 737–747 (2022).
198. Wang, J. *et al.* Phase separation of OCT4 controls TAD reorganization to promote cell fate transitions. *Cell Stem Cell* **28**, 1868–1883.e11 (2021).
199. Sharma, R. *et al.* Liquid condensation of reprogramming factor KLF4 with DNA provides a mechanism for chromatin organization. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
200. Peng, Y. & Zhang, Y. Enhancer and super-enhancer: Positive regulators in gene transcription. *Animal Models and Experimental Medicine* **1**, 169–179 (2018).
201. Whyte, W. A. *et al.* Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**, 307–319 (2013).
202. Denes, H. *et al.* Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* (2013).
203. Agrawal, P. & Rao, S. Super-Enhancers and CTCF in Early Embryonic Cell Fate Decisions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).
204. Agrawal, P. *et al.* Genome editing demonstrates that the -5 kb Nanog enhancer regulates Nanog expression by modulating RNAPII initiation and/or recruitment. *J. Biol. Chem.* **296**, (2021).
205. Li, Y. *et al.* CRISPR reveals a distal super-enhancer required for Sox2 expression in mouse embryonic stem cells. *PLoS One* **9**, (2014).
206. Moon, B. S. *et al.* Long range inter-chromosomal interaction of Oct4 distal enhancer loci regulates ESCs pluripotency. *Cell Death Discov.* **9**, (2023).
207. Choi, J. *et al.* Evidence for additive and synergistic action of Mammalian enhancers during cell fate determination. *Elife* **10**, (2021).
208. David, C. J. & Massagué, J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 419–435 (2018).
209. Hnisz, D. *et al.* Convergence of Developmental and Oncogenic Signaling Pathways at Transcriptional Super-Enhancers. *Mol. Cell* **58**, 362–370 (2015).
210. Chung, H. *et al.* Yap1 is dispensable for self-renewal but required for proper differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells . *EMBO Rep.* **17**, 519–529 (2016).
211. Li, P. *et al.* Functional role of Mst1/Mst2 in embryonic stem cell differentiation. *PLoS One* **8**, (2013).
212. Sun, X. *et al.* Hippo-YAP signaling controls lineage differentiation of mouse embryonic stem cells through modulating the formation of super-enhancers. *Nucleic Acids Res.* **48**, 7182–7196 (2020).
213. Sabari, B. R. Biomolecular Condensates and Gene Activation in Development and Disease. *Dev. Cell* **55**, 84–96 (2020).
214. Pegoraro, A. F., Janmey, P. & Weitz, D. A. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
215. Hohmann, T. & Dehghani, F. The cytoskeleton—a complex interacting meshwork. *Cells* **8**, (2019).
216. Mizuno, D., Tardin, C., Schmidt, C. F. & MacKintosh, F. C. Nonequilibrium mechanics of

- active cytoskeletal networks. *Science* (80-.). **315**, 370–373 (2007).
217. Shelden, E. & Wadsworth, P. Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: Microtubule dynamics are cell-type specific. *J. Cell Biol.* **120**, 935–945 (1993).
 218. Yoon, M., Moir, R. D., Prahlad, V. & Goldman, R. D. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J. Cell Biol.* **143**, 147–157 (1998).
 219. Dupont, S. & Wickström, S. A. Mechanical regulation of chromatin and transcription. *Nature Reviews Genetics* **23**, 624–643 (2022).
 220. Du, J. *et al.* Compression Generated by a 3D Supracellular Actomyosin Cortex Promotes Embryonic Stem Cell Colony Growth and Expression of Nanog and Oct4. *Cell Syst.* **9**, 214–220.e5 (2019).
 221. Bergert, M. *et al.* Cell Surface Mechanics Gate Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* **28**, 209–216.e4 (2021).
 222. Kim, I. G. *et al.* Mechanotransduction of human pluripotent stem cells cultivated on tunable cell-derived extracellular matrix. *Biomaterials* **150**, 100–111 (2018).
 223. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
 224. Vining, K. H. & Mooney, D. J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 728–742 (2017).
 225. CHAFFEY, N. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Ann. Bot.* **91**, 401–401 (2003).
 226. Svitkina, T. The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
 227. Patteson, A. E. *et al.* Vimentin protects cells against nuclear rupture and DNA damage during migration. *J. Cell Biol.* **218**, 4079–4092 (2019).
 228. Gan, Z. *et al.* Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Syst.* **3**, 252–263.e8 (2016).
 229. Boraas, L. C., Guidry, J. B., Pineda, E. T. & Ahsan, T. Cytoskeletal expression and remodeling in pluripotent stem cells. *PLoS One* **11**, (2016).
 230. Li, Y. *et al.* The effects of chemical fixation on the cellular nanostructure. *Exp. Cell Res.* **358**, 253–259 (2017).
 231. Danchenko, M., Csaderova, L., Fournier, P. E. & Sekeyova, Z. Optimized fixation of actin filaments for improved indirect immunofluorescence staining of rickettsiae. *BMC Res. Notes* **12**, (2019).
 232. Yang, S. *et al.* Self-construction of actin networks through phase separation-induced abLIM1 condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, (2022).
 233. Tojkander, S., Gateva, G. & Lappalainen, P. Actin stress fibers - Assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* **125**, 1855–1864 (2012).
 234. Tan, S. J. *et al.* Regulation and dynamics of force transmission at individual cell-matrix adhesion bonds. *Sci. Adv.* **6**, (2020).
 235. Hissa, B. *et al.* Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes. *PLoS One* **8**, (2013).
 236. Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Kaibuchi, K. & Fujiwara, K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **280**, (2001).
 237. Clarke, D. N. & Martin, A. C. Actin-based force generation and cell adhesion in tissue morphogenesis. *Current Biology* **31**, R667–R680 (2021).

238. Xie, J. & Minc, N. Cytoskeleton Force Exertion in Bulk Cytoplasm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2020).
239. Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S. & Forte, G. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Frontiers in Physiology* **9**, (2018).
240. Davidson, P. M. & Cadot, B. Actin on and around the Nucleus. *Trends in Cell Biology* **31**, 211–223 (2021).
241. Xia, S. *et al.* Nanoscale Architecture of the Cortical Actin Cytoskeleton in Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* **28**, 1251–1267.e7 (2019).
242. David, B. G. *et al.* Linking substrate and nucleus via actin cytoskeleton in pluripotency maintenance of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **41**, (2019).
243. Ambriz, X., De Lanerolle, P. & Ambrosio, J. R. The mechanobiology of the actin cytoskeleton in stem cells during differentiation and interaction with biomaterials. *Stem Cells International* **2018**, (2018).
244. Barooji, Y. F. *et al.* Changes in cell morphology and actin organization in embryonic stem cells cultured under different conditions. *Cells* **10**, (2021).
245. Rosowski, K. A., Mertz, A. F., Norcross, S., Dufresne, E. R. & Horsley, V. Edges of human embryonic stem cell colonies display distinct mechanical properties and differentiation potential. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
246. De Belly, H. *et al.* Membrane Tension Gates ERK-Mediated Regulation of Pluripotent Cell Fate. *Cell Stem Cell* **28**, 273–284.e6 (2021).
247. Boraas, L. C., Pineda, E. T. & Ahsan, T. Actin and myosin II modulate differentiation of pluripotent stem cells. *PLoS One* **13**, (2018).
248. Xie, X., Mahmood, S. R., Gjorgjieva, T. & Percipalle, P. Emerging roles of cytoskeletal proteins in regulating gene expression and genome organization during differentiation. *Nucleus* **11**, 53–65 (2020).
249. Kelsch, D. J. & Tootle, T. L. Nuclear Actin: From Discovery to Function. *Anat. Rec.* **301**, 1999–2013 (2018).
250. Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203 (1998).
251. Logan, C. M. & Menko, A. S. Microtubules: Evolving roles and critical cellular interactions. *Experimental Biology and Medicine* **244**, 1240–1254 (2019).
252. Mallik, R. & Gross, S. P. Molecular motors: Strategies to get along. *Current Biology* **14**, (2004).
253. Mikenberg, I., Widera, D., Kaus, A., Kaltschmidt, B. & Kaltschmidt, C. Transcription factor NF- κ B is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons. *PLoS One* **2**, (2007).
254. Pockwinse, S. M. *et al.* Microtubule-dependent nuclear-cytoplasmic shuttling of Runx2. *J. Cell. Physiol.* **206**, 354–362 (2006).
255. Okada, N. & Sato, M. Spatiotemporal regulation of nuclear transport machinery and microtubule organization. *Cells* **4**, 406–426 (2015).
256. Vleugel, M., Kok, M. & Dogterom, M. Understanding force-generating microtubule systems through in vitro reconstitution. *Cell Adhesion and Migration* **10**, 475–494 (2016).
257. Kent, I. A. & Lele, T. P. Microtubule-based force generation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **9**, (2017).
258. Tillery, M. M. L., Blake-Hedges, C., Zheng, Y., Buchwalter, R. A. & Megraw, T. L. Centrosomal and non-centrosomal microtubule-organizing centers (MTOCs) in *Drosophila melanogaster*. *Cells* **7**, (2018).
259. Sanchez, A. D. & Feldman, J. L. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to

- non-centrosomal sites. *Current Opinion in Cell Biology* **44**, 93–101 (2017).
260. Fu, J. & Zhang, C. Super-resolution microscopy: successful applications in centrosome study and beyond. *Biophys. Reports* **5**, 235–243 (2019).
 261. Chaigne, A. *et al.* Abscission Couples Cell Division to Embryonic Stem Cell Fate. *Dev. Cell* **55**, 195–208.e5 (2020).
 262. Hawdon, A., Aberkane, A. & Zenker, J. Microtubule-dependent subcellular organisation of pluripotent cells. *Development (Cambridge)* **148**, (2021).
 263. Chaigne, A. & Brunet, T. Incomplete abscission and cytoplasmic bridges in the evolution of eukaryotic multicellularity. *Current biology : CB* **32**, R385–R397 (2022).
 264. Haglund, K., Nezis, I. P. & Stenmark, H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Communicative and Integrative Biology* **4**, 1–9 (2011).
 265. Mierzwa, B. & Gerlich, D. W. Cytokinetic Abscission: Molecular Mechanisms and Temporal Control. *Developmental Cell* **31**, 525–538 (2014).
 266. Biedzinski, S. *et al.* Microtubules control nuclear shape and gene expression during early stages of hematopoietic differentiation. *EMBO J.* **39**, (2020).
 267. Li, J. *et al.* Microtubule Stabilization Enhances the Chondrogenesis of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
 268. Tassinari, R. *et al.* Mechanobiology: A landscape for reinterpreting stem cell heterogeneity and regenerative potential in diseased tissues. *iScience* **26**, (2023).
 269. Nishimura, Y., Kasahara, K. & Inagaki, M. Intermediate filaments and IF-associated proteins: From cell architecture to cell proliferation. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* **95**, 479–493 (2019).
 270. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H. & Goldman, R. D. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *J. Biol. Chem.* **290**, 17145–17153 (2015).
 271. Sjöqvist, M., Antfolk, D., Suarez-Rodriguez, F. & Sahlgren, C. From structural resilience to cell specification — Intermediate filaments as regulators of cell fate. *FASEB Journal* **35**, (2021).
 272. Dutour-Provenzano, G. & Etienne-Manneville, S. Intermediate filaments. *Curr. Biol.* **31**, R522–R529 (2021).
 273. van Bodegraven, E. J. & Etienne-Manneville, S. Intermediate filaments from tissue integrity to single molecule mechanics. *Cells* **10**, (2021).
 274. Schwarz, N. & Leube, R. E. Intermediate filaments as organizers of cellular space: How they affect mitochondrial structure and function. *Cells* **5**, (2016).
 275. Ndiaye, A. B., Koenderink, G. H. & Shemesh, M. Intermediate Filaments in Cellular Mechanoresponsiveness: Mediating Cytoskeletal Crosstalk From Membrane to Nucleus and Back. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
 276. Terriac, E., Schütz, S. & Lautenschläger, F. Vimentin intermediate filament rings deform the nucleus during the first steps of adhesion. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
 277. Leduc, C. & Etienne-Manneville, S. Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization. *J. Cell Biol.* **216**, 1689–1703 (2017).
 278. Pattabiraman, S. *et al.* Vimentin protects differentiating stem cells from stress. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
 279. Patteson, A. E., Vahabikashi, A., Goldman, R. D. & Janmey, P. A. Mechanical and Non-Mechanical Functions of Filamentous and Non-Filamentous Vimentin. *BioEssays* **42**, (2020).
 280. Romero, J. J. *et al.* Nucleus-cytoskeleton communication impacts on OCT4-chromatin

- interactions in embryonic stem cells. *BMC Biol.* **20**, 1–17 (2022).
281. Hashemi Karoii, D. & Azizi, H. A review of protein-protein interaction and signaling pathway of Vimentin in cell regulation, morphology and cell differentiation in normal cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **42**, 512–520 (2022).
 282. Boraas, L. C. & Ahsan, T. Lack of vimentin impairs endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 283. Petzold, J. & Gentleman, E. Intrinsic Mechanical Cues and Their Impact on Stem Cells and Embryogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).
 284. Burke, B. & Roux, K. J. Nuclei Take a Position: Managing Nuclear Location. *Dev. Cell* **17**, 587–597 (2009).
 285. Lombardi, M. L. *et al.* The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **286**, 26743–26753 (2011).
 286. Jahed, Z., Soheilypour, M., Peyro, M. & Mofrad, M. R. K. The LINC and NPC relationship - it's complicated! *J. Cell Sci.* **129**, 3219–3229 (2016).
 287. Donnalaja, F., Jacchetti, E., Soncini, M. & Raimondi, M. T. Mechanosensing at the Nuclear Envelope by Nuclear Pore Complex Stretch Activation and Its Effect in Physiology and Pathology. *Front. Physiol.* **10**, (2019).
 288. Schmidt, H. B. & Görlich, D. Transport Selectivity of Nuclear Pores, Phase Separation, and Membraneless Organelles. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 46–61 (2016).
 289. Schuller, A. P. *et al.* The cellular environment shapes the nuclear pore complex architecture. *Nature* **598**, 667–671 (2021).
 290. Matsuda, A. & Mofrad, M. R. K. On the nuclear pore complex and its emerging role in cellular mechanotransduction. *APL Bioengineering* **6**, (2022).
 291. Andreu, I., Granero-Moya, I., Garcia-Manyes, S. & Roca-Cusachs, P. Understanding the role of mechanics in nucleocytoplasmic transport. *APL Bioeng.* **6**, (2022).
 292. Guo, Y. & Yixian, Z. Lamins position the nuclear pores and centrosomes by modulating dynein. *Mol. Biol. Cell* **26**, 3379–3389 (2015).
 293. Zimmerli, C. E. *et al.* Nuclear pores dilate and constrict in cellulo. *Science (80-.).* **374**, (2021).
 294. Elosegui-Artola, A. *et al.* Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* **171**, 1397–1410.e14 (2017).
 295. Hoffman, L. M. *et al.* Mechanical stress triggers nuclear remodeling and the formation of transmembrane actin nuclear lines with associated nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell* **31**, 1774–1787 (2020).
 296. Versaevel, M. *et al.* Super-resolution microscopy reveals LINC complex recruitment at nuclear indentation sites. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
 297. Smith, M. A. *et al.* Nuclear pore complexes concentrate on Actin/LINC/Lamin nuclear lines in response to mechanical stress in a SUN1 dependent manner. *Heliyon* **8**, e12147 (2022).
 298. Turgay, Y. *et al.* The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* **543**, 261–264 (2017).
 299. Vahabikashi, A., Adam, S. A., Medalia, O. & Goldman, R. D. Nuclear lamins: Structure and function in mechanobiology. *APL Bioengineering* **6**, (2022).
 300. Broers, J. L. V. *et al.* Decreased mechanical stiffness in LMNA^{-/-} cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: Implications for the development of laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2567–2580 (2004).
 301. Lee, J. S. H. *et al.* Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics,

- polarization, and migration. *Biophys. J.* **93**, 2542–2552 (2007).
302. Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T. & Goldman, R. D. Nuclear lamins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, (2010).
 303. Dechat, T., Gesson, K. & Foisner, R. Lamina-independent lamins in the nuclear interior serve important functions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **75**, 533–543 (2010).
 304. Dechat, T. *et al.* Nuclear lamins: Major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes and Development* **22**, 832–853 (2008).
 305. Shimia, T. *et al.* Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Mol. Biol. Cell* **26**, 4075–4086 (2015).
 306. de Leeuw, R., Gruenbaum, Y. & Medalia, O. Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends in Cell Biology* **28**, 34–45 (2018).
 307. Nmezi, B. *et al.* Concentric organization of A- and B-type lamins predicts their distinct roles in the spatial organization and stability of the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 4307–4315 (2019).
 308. Shimi, T. *et al.* The A- and B-type nuclear lamin networks: Microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* **22**, 3409–3421 (2008).
 309. Dittmer, T. & Misteli, T. The lamin protein family. *Genome Biol.* **12**, (2011).
 310. Malashicheva, A. & Perepelina, K. Diversity of Nuclear Lamin A/C Action as a Key to Tissue-Specific Regulation of Cellular Identity in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).
 311. Swift, J. *et al.* Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science (80-.)*. **341**, 1240104–1240104 (2013).
 312. Srivastava, L. K., Ju, Z., Ghagre, A. & Ehrlicher, A. J. Spatial distribution of lamin A/C determines nuclear stiffness and stress-mediated deformation. *J. Cell Sci.* **134**, (2021).
 313. Bonne, G. *et al.* Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery- Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **21**, 285–288 (1999).
 314. De Sandre-Giovannoli, A. *et al.* Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science (80-.)*. **300**, 2055 (2003).
 315. Zwerger, M. *et al.* Myopathic lamin mutations impair nuclear stability in cells and tissue and disrupt nucleo-cytoskeletal coupling. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2335–2349 (2013).
 316. Wong, X. & Stewart, C. L. The Laminopathies and the Insights They Provide into the Structural and Functional Organization of the Nucleus. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **21**, 263–288 (2020).
 317. Kalukula, Y., Stephens, A. D., Lammerding, J. & Gabriele, S. Mechanics and functional consequences of nuclear deformations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 583–602 (2022).
 318. Lammerding, J. *et al.* Lamins a and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J. Biol. Chem.* **281**, 25768–25780 (2006).
 319. Guelen, L. *et al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**, 948–951 (2008).
 320. Finlan, L. E. *et al.* Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
 321. Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E. & Singh, H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* **452**, 243–247 (2008).
 322. Peric-Hupkes, D. *et al.* Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Mol. Cell* **38**, 603–613 (2010).
 323. Lochs, S. J. A., Kefalopoulou, S. & Kind, J. Lamina associated domains and gene regulation in development and cancer. *Cells* **8**, (2019).

324. Constantinescu, D., Gray, H. L., Sammak, P. J., Schatten, G. P. & Csoka, A. B. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* **24**, 177–185 (2006).
325. Wong, X. *et al.* Lamin C is required to establish genome organization after mitosis. *Genome Biol.* **22**, (2021).
326. Kim, Y., Zheng, X. & Zheng, Y. Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells lacking all lamins. *Cell Research* **23**, 1420–1423 (2013).
327. Eckersley-Maslin, M. A., Bergmann, J. H., Lazar, Z. & Spector, D. L. Lamin A/C is expressed in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Nucl. (United States)* **4**, 53–60 (2013).
328. Wang, Y. *et al.* Lamin A/C-dependent chromatin architecture safeguards naïve pluripotency to prevent aberrant cardiovascular cell fate and function. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
329. Sehgal, P., Chaturvedi, P., Kumaran, R. I., Kumar, S. & Parnaik, V. K. Lamin A/C Haploinsufficiency Modulates the Differentiation Potential of Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS One* **8**, (2013).
330. Kim, Y. *et al.* Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science (80-.).* **334**, 1706–1710 (2011).
331. Lim, R., Banerjee, A., Biswas, R., Chari, A. N. & Raghavan, S. Mechanotransduction through adhesion molecules: Emerging roles in regulating the stem cell niche. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
332. Hamouda, M. S., Labouesse, C. & Chalut, K. J. Nuclear mechanotransduction in stem cells. *Current opinion in cell biology* **64**, 97–104 (2020).
333. Poh, Y. C. *et al.* Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nat. Commun.* **3**, (2012).
334. Hu, S., Chen, J., Butler, J. P. & Wang, N. Prestress mediates force propagation into the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 423–428 (2005).
335. Tajik, A. *et al.* Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat. Mater.* **15**, 1287–1296 (2016).
336. Heo, S. J., Cosgrove, B. D., Daiv, E. N. & Mauck, R. L. Mechano-adaptation of the stem cell nucleus. *Nucleus* **9**, 9–19 (2018).
337. Hu, S. *et al.* Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **287**, (2004).
338. Sun, J., Chen, J., Mohagheghian, E. & Wang, N. Force-induced gene up-regulation does not follow the weak power law but depends on H3K9 demethylation. *Sci. Adv.* **6**, 1–14 (2020).
339. Song, Y. *et al.* Transient nuclear deformation primes epigenetic state and promotes cell reprogramming. *Nat. Mater.* **21**, 1191–1199 (2022).
340. Niu, N., Xu, S., Xu, Y., Little, P. J. & Jin, Z. G. Targeting Mechanosensitive Transcription Factors in Atherosclerosis. *Trends in Pharmacological Sciences* **40**, 253–266 (2019).
341. Ghaleb, A. M. & Yang, V. W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene* **611**, 27–37 (2017).
342. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**, (2017).
343. Heng, B. C. *et al.* Role of YAP/TAZ in Cell Lineage Fate Determination and Related Signaling Pathways. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2020).
344. Ishihara, S. *et al.* Substrate stiffness regulates temporary NF-κB activation via actomyosin contractions. *Exp. Cell Res.* **319**, 2916–2927 (2013).
345. Chang, Y. C., Wu, J. W., Wang, C. W. & Jang, A. C. C. Hippo Signaling-Mediated

- Mechanotransduction in Cell Movement and Cancer Metastasis. *Frontiers in Molecular Biosciences* **6**, (2020).
346. Skory, R. M. *et al.* The nuclear lamina couples mechanical forces to cell fate in the preimplantation embryo via actin organization. *Nat. Commun.* **14**, 3101 (2023).
 347. Lim, H. Y. G. & Plachta, N. Cytoskeletal control of early mammalian development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 548–562 (2021).
 348. Zenker, J. *et al.* A microtubule-organizing center directing intracellular transport in the early mouse embryo. *Science (80-.)*. **357**, 925–928 (2017).
 349. Fierro-González, J. C., White, M. D., Silva, J. C. & Plachta, N. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1424–1433 (2013).
 350. Zenker, J. *et al.* Expanding Actin Rings Zipper the Mouse Embryo for Blastocyst Formation. *Cell* **173**, 776–791.e17 (2018).
 351. Kita-Matsuo, H. *et al.* Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. *PLoS One* **4**, (2009).
 352. Chang, L. *et al.* The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *J. Cell Sci.* **122**, 2914–2923 (2009).
 353. Faire, K. *et al.* E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* **112**, 4243–4255 (1999).
 354. Stepanova, T. *et al.* Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J. Neurosci.* **23**, 2655–2664 (2003).
 355. Westphal, M. *et al.* Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr. Biol.* **7**, 176–183 (1997).
 356. Kural, C. *et al.* Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5378–5382 (2007).
 357. Greenberg ME. *Current protocols in molecular biology*, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1*. New York: John Wiley and Sons. pp 4. (1994).
 358. Blajeski, A. L., Phan, V. A., Kottke, T. J. & Kaufmann, S. H. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J. Clin. Invest.* **110**, 91–99 (2002).
 359. Levi, V., Gelfand, V. I., Serpinskaya, A. S. & Gratton, E. Melanosomes transported by myosin-V in xenopus melanophores perform slow 35 nm steps. *Biophys. J.* **90**, (2006).
 360. Spector, I., Shorlet, N. R., Blasberger, D. & Kashman, Y. Latrunculins - novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton* **13**, 127–144 (1989).
 361. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675 (2012).
 362. Schwille, P. & Haustein, E. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. *Doi:10.1002/Lpor.200910041* **94**, 1–33 (2009).
 363. Digman, M. A. & Gratton, E. Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62**, 645–668 (2011).
 364. Machán, R. & Wohland, T. Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Lett.* **588**, 3571–3584 (2014).
 365. Koynov, K. & Butt, H. J. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **17**, 377–387 (2012).

366. Mueller, F., Stasevich, T. J., Mazza, D. & McNally, J. G. Quantifying transcription factor kinetics: at work or at play? *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 492–514 (2013).
367. White, M. D. *et al.* Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. *Cell* **165**, 75–87 (2016).
368. Michelman-Ribeiro, A. *et al.* Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **97**, 337–346 (2009).
369. Cosentino, M. S. *et al.* Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation. *J. Mol. Biol.* **431**, 1148–1159 (2019).
370. Bacia, K., Haustein, E. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy: Principles and applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, 709–725 (2014).
371. Elson, E. L. *Brief introduction to fluorescence correlation spectroscopy. Methods in Enzymology* **518**, (Elsevier Inc., 2013).
372. Rudin, L. I., Osher, S. & Fatemi, E. Nonlinear total variation based noise removal algorithms. *Phys. D Nonlinear Phenom.* **60**, 259–268 (1992).
373. Wadell, H. Volume, Shape, and Roundness of Quartz Particles. *J. Geol.* **43**, 250–280 (1935).
374. Tinevez, J. Y. *et al.* TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**, 80–90 (2017).
375. De Chaumont, F. *et al.* Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods* **9**, 690–696 (2012).
376. Marascuilo, L. A. & McSweeney, M. E. Nonparametric Post Hoc Comparisons for Trend. *Psychol. Bull.* **67**, 401–412 (1967).
377. Li, Y. Q. Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cellular Reprogramming* **12**, 3–13 (2010).
378. Zhao, Z. W., White, M. D., Bissiere, S., Levi, V. & Plachta, N. Quantitative imaging of mammalian transcriptional dynamics: From single cells to whole embryos. *BMC Biology* **14**, (2016).
379. Smith, E. M. & Mueller, J. D. The statistics of protein expression ratios for cellular fluorescence studies. *Eur. Biophys. J.* **41**, 341–352 (2012).
380. Vernerri, P. *et al.* Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
381. Chen, J. *et al.* Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. *Cell* **156**, 1274–1285 (2014).
382. Morgani, S. M. & Brickman, J. M. Lif supports primitive endoderm expansion during pre-implantation development. *Dev.* **142**, 3488–3499 (2015).
383. Nguyen, T. *et al.* Chromatin sequesters pioneer transcription factor Sox2 from exerting force on DNA. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
384. Wagh, K., Garcia, D. A. & Upadhyaya, A. Phase separation in transcription factor dynamics and chromatin organization. *Current Opinion in Structural Biology* **71**, 148–155 (2021).
385. Meshorer, E. & Misteli, T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 540–546 (2006).
386. May, D. *et al.* Live imaging reveals chromatin compaction transitions and dynamic transcriptional bursting during stem cell differentiation in vivo. *Elife* **12**, (2023).
387. Grewal, S. I. S. & Jia, S. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* **8**, 35–46 (2007).

388. Müller, T. *et al.* A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum. Reprod.* **24**, 1359–1372 (2009).
389. Klein, A. M. *et al.* Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell* **161**, 1187–1201 (2015).
390. Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R. & Hager, G. L. Direct visualization of the human estrogen receptor reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol. Biol. Cell* **10**, 471–486 (1999).
391. Presman, D. M. *et al.* Insights on glucocorticoid receptor activity modulation through the binding of rigid steroids. *PLoS One* **5**, (2010).
392. Kumar, D., Cinghu, S., Oldfield, A. J., Yang, P. & Jothi, R. Decoding the function of bivalent chromatin in development and cancer. *Genome Res.* **31**, 2170–2184 (2021).
393. Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 7–18 (2011).
394. Lesch, B. J. & Page, D. C. Poised chromatin in the mammalian germ line. *Dev.* **141**, 3619–3626 (2014).
395. Kobayakawa, S., Miike, K., Nakao, M. & Abe, K. Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells* **12**, 447–460 (2007).
396. Mann, R. & Notani, D. Transcription factor condensates and signaling driven transcription. *Nucleus* **14**, (2023).
397. McCarthy, R. L. *et al.* Diverse heterochromatin-associated proteins repress distinct classes of genes and repetitive elements. *Nat. Cell Biol.* **23**, 905–914 (2021).
398. Tosolini, M. *et al.* Contrasting epigenetic states of heterochromatin in the different types of mouse pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
399. Dupont, C. *et al.* Evidence for low nanocompaction of heterochromatin in living embryonic stem cells. 1–22 (2023). doi:10.15252/embj.2021110286
400. Garaizar, A. *et al.* Aging can transform single-component protein condensates into multiphase architectures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, (2022).
401. Spruijt, E. *Multiphase complex droplets. Droplets of Life* (Elsevier Inc., 2023). doi:10.1016/b978-0-12-823967-4.00015-4
402. Rizzino, A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells* **31**, 1033–1039 (2013).
403. Masui, S. *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 625–635 (2007).
404. Tapia, N. *et al.* Dissecting the role of distinct OCT4-SOX2 heterodimer configurations in pluripotency. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
405. Yang, S. H. *et al.* Otx2 and Oct4 Drive Early Enhancer Activation during Embryonic Stem Cell Transition from Naive Pluripotency. *Cell Rep.* **7**, 1968–1981 (2014).
406. Sharov, A. A. *et al.* Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* **9**, (2008).
407. Gökbüget, D. & Bléloach, R. Epigenetic control of transcriptional regulation in pluripotency and early differentiation. *Development (Cambridge)* **146**, (2019).
408. Roberts, G. A. *et al.* Dissecting OCT4 defines the role of nucleosome binding in pluripotency. *Nat. Cell Biol.* **23**, 834–845 (2021).
409. Malaga Gadea, F. C. & Nikolova, E. N. Structural Plasticity of Pioneer Factor Sox2 and DNA Bendability Modulate Nucleosome Engagement and Sox2-Oct4 Synergism. *J. Mol. Biol.*

- 435**, (2023).
410. Lerner J et al. Distinct chromatin scanning modes lead to targeting of compacted chromatin by pioneer factors FOXA1 and SOX2. **43**, 245–250 (2023).
 411. Miroshnikova, Y. A., Nava, M. M. & Wickström, S. A. Emerging roles of mechanical forces in chromatin regulation. *Journal of Cell Science* **130**, 2243–2250 (2017).
 412. Starr, D. A. & Fridolfsson, H. N. Interactions Between Nuclei and the Cytoskeleton Are Mediated by SUN-KASH Nuclear-Envelope Bridges. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 421–444 (2010).
 413. Talwar, S., Kumar, A., Rao, M., Menon, G. I. & Shivashankar, G. V. Correlated spatio-temporal fluctuations in chromatin compaction states characterize stem cells. *Biophys. J.* **104**, 553–564 (2013).
 414. Zwetsloot, A. J., Tut, G. & Straube, A. Measuring microtubule dynamics. *Essays in Biochemistry* **62**, 725–735 (2018).
 415. Mustyatsa, V. V. et al. Fine structure and dynamics of EB3 binding zones on microtubules in fibroblast cells. *Mol. Biol. Cell* **30**, 2105–2114 (2019).
 416. Bachir, A. I., Horwitz, A. R., Nelson, W. J. & Bianchini, J. M. Actin-based adhesion modules mediate cell interactions with the extracellular matrix and neighboring cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
 417. Li, L., Bennett, S. A. L. & Wang, L. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh. Migr.* **6**, 59–73 (2012).
 418. Närvä, E. et al. A Strong Contractile Actin Fence and Large Adhesions Direct Human Pluripotent Colony Morphology and Adhesion. *Stem Cell Reports* **9**, 67–76 (2017).
 419. Chowdhury, F. et al. Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PLoS One* **5**, (2010).
 420. Paluch, E., Piel, M., Prost, J., Bornens, M. & Sykes, C. Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys. J.* **89**, 724–733 (2005).
 421. Kim, D. H. et al. Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus. *J. Cell Sci.* **128**, 3375–3385 (2015).
 422. Li, Y. et al. Moving Cell Boundaries Drive Nuclear Shaping during Cell Spreading. *Biophys. J.* **109**, 670–686 (2015).
 423. Felgner, H., Frank, R. & Schliwa, M. Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. *J. Cell Sci.* **109**, 509–516 (1996).
 424. Kikumoto, M., Kurachi, M., Tosa, V. & Tashiro, H. Flexural rigidity of individual microtubules measured by a buckling force with optical traps. *Biophys. J.* **90**, 1687–1696 (2006).
 425. Dhamodharan, R., Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L. & Wadsworth, P. Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1215–1229 (1995).
 426. Maurer, M. & Lammerding, J. The Driving Force: Nuclear Mechanotransduction in Cellular Function, Fate, and Disease. *Annual Review of Biomedical Engineering* **21**, 443–468 (2019).
 427. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
 428. Keeling, M. C., Flores, L. R., Dodhy, A. H., Murray, E. R. & Gavara, N. Actomyosin and vimentin cytoskeletal networks regulate nuclear shape, mechanics and chromatin organization. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 429. Pongkitwitoon, S., Uzer, G., Rubin, J. & Judex, S. Cytoskeletal Configuration Modulates

- Mechanically Induced Changes in Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis, Morphology, and Stiffness. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
430. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495 (2004).
 431. Yang, Y. *et al.* Cross-talk between microtubules and the linker of nucleoskeleton complex plays a critical role in the adipogenesis of human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, (2018).
 432. Iyer, K. V., Pulford, S., Mogilner, A. & Shivashankar, G. V. Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys. J.* **103**, 1416–1428 (2012).
 433. Buszczak, M., Inaba, M. & Yamashita, Y. M. Signaling by Cellular Protrusions: Keeping the Conversation Private. *Trends in Cell Biology* **26**, 526–534 (2016).
 434. Vishavkarma, R. *et al.* Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading. *PLoS One* **9**, (2014).
 435. Versaevel, M., Grevesse, T. & Gabriele, S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat. Commun.* **3**, (2012).
 436. Huber, F., Boire, A., López, M. P. & Koenderink, G. H. Cytoskeletal crosstalk: When three different personalities team up. *Current Opinion in Cell Biology* **32**, 39–47 (2015).
 437. Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J. & Wang, Y. K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* **6**, 15966–15983 (2015).
 438. Fan, T. *et al.* Spatial organization and crosstalk of vimentin and actin stress fibers regulate the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *FASEB J.* **35**, (2021).
 439. Howard, J. Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. *Physics Today* **55**, 63 (2002).
 440. Dmello, C. *et al.* Vimentin regulates differentiation switch via modulation of keratin 14 levels and their expression together correlates with poor prognosis in oral cancer patients. *PLoS One* **12**, (2017).
 441. Capetanaki, Y., Smith, S. & Heath, J. P. Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J. Cell Biol.* **109**, 1653–1664 (1989).
 442. Li, B., Zheng, Y. W., Sano, Y. & Taniguchi, H. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PLoS One* **6**, (2011).
 443. Lian, N., Wang, W., Li, L., Elefteriou, F. & Yang, X. Vimentin inhibits ATF4-mediated Osteocalcin transcription and osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 30518–30525 (2009).
 444. Sommers, C. L., Byers, S. W., Thompson, E. W., Torri, J. A. & Gelmann, E. P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **31**, 325–335 (1994).
 445. Shrum, C. K., Defrancisco, D. & Meffert, M. K. Stimulated nuclear translocation of NF- κ B and shuttling differentially depend on dynein and the dynactin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2647–2652 (2009).
 446. You, E. *et al.* Dynein-mediated nuclear translocation of yes-associated protein through microtubule acetylation controls fibroblast activation. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 4143–4161 (2020).
 447. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
 448. Pan, G., Qin, B., Liu, N., Schöler, H. R. & Pei, D. Identification of a nuclear localization

- signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. *J. Biol. Chem.* **279**, 37013–37020 (2004).
449. Oka, M., Moriyama, T., Asally, M., Kawakami, K. & Yoneda, Y. Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 15085–15097 (2013).
 450. Van Schaijik, B., Davis, P. F., Wickremesekera, A. C., Tan, S. T. & Itinteang, T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: A review. *Journal of Clinical Pathology* **71**, 88–91 (2018).
 451. De Belly, H., Paluch, E. K. & Chalut, K. J. Interplay between mechanics and signalling in regulating cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 465–480 (2022).
 452. Fukuda, A. *et al.* Spatiotemporal dynamics of OCT4 protein localization during preimplantation development in mice. *Reproduction* **152**, 417–430 (2016).
 453. Topal, T. *et al.* Rapid translocation of pluripotency-related transcription factors by external uniaxial forces. *Integr. Biol.* **11**, 41–52 (2019).
 454. Zou, R. *et al.* YAP nuclear-cytoplasmic translocation is regulated by mechanical signaling, protein modification, and metabolism. *Cell Biology International* **44**, 1416–1425 (2020).
 455. Shin, Y. *et al.* Liquid Nuclear Condensates Mechanically Sense and Restructure the Genome. *Cell* **175**, 1481–1491.e13 (2018).
 456. Al Jord, A. *et al.* Cytoplasmic forces functionally reorganize nuclear condensates in oocytes. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
 457. Wiegand, T. & Hyman, A. A. Drops and fibers - How biomolecular condensates and cytoskeletal filaments influence each other. *Emerging Topics in Life Sciences* **4**, 247–261 (2020).
 458. Wohl, I., Yakovian, O., Razvag, Y., Reches, M. & Sherman, E. Fast and synchronized fluctuations of cortical actin negatively correlate with nucleoli liquid–liquid phase separation in T cells. *Eur. Biophys. J.* **49**, 409–423 (2020).
 459. Toh, K. C., Ramdas, N. M. & Shivashankar, G. V. Actin cytoskeleton differentially alters the dynamics of lamin A, HP1 α and H2B core histone proteins to remodel chromatin condensation state in living cells. *Integr. Biol.* **7**, 1309–1317 (2015).
 460. Ramdas, N. M. & Shivashankar, G. V. Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin organization. *J. Mol. Biol.* **427**, 695–706 (2015).
 461. Kirby, T. J. & Lammerding, J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nature Cell Biology* **20**, 373–381 (2018).
 462. Zhou, J., Hu, J., Wang, Y. & Gao, S. Induction and application of human naive pluripotency. *Cell Rep.* **42**, 112379 (2023).
 463. Kucharski, A. J. *et al.* Effectiveness of isolation, testing, contact tracing, and physical distancing on reducing transmission of SARS-CoV-2 in different settings: a mathematical modelling study. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 1151–1160 (2020).
 464. Guglielmi, G. The explosion of new coronavirus tests that could help to end the pandemic. *Nature* **583**, 506–509 (2020).
 465. Esbin, M. N. *et al.* Overcoming the bottleneck to widespread testing: A rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA* **26**, 771–783 (2020).
 466. Smyrliaki, I. *et al.* Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
 467. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. *Cdc-006-00005* **3**, 0 (2020).
 468. Sung, H. *et al.* Comparative evaluation of three homogenization methods for isolating middle east respiratory syndrome coronavirus nucleic acids from sputum samples for

- real-time reverse transcription PCR. *Ann. Lab. Med.* **36**, 457–462 (2016).
469. Espy, M. J., Patel, R., Paya, C. V. & Smith, T. F. Comparison of three methods for extraction of viral nucleic acids from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 41–44 (1995).
470. Mallmann, L. *et al.* Pre-treatment of the clinical sample with Proteinase K allows detection of SARS CoV-2 in the absence of RNA extraction. *bioRxiv* **2**, 5–10 (2020).
471. Marzinotto, S. *et al.* A streamlined approach to rapidly detect SARS-CoV-2 infection, avoiding RNA purification. *medRxiv* 2020.04.06.20054114 (2020).
472. Genoud, V. *et al.* Extraction-free protocol combining proteinase K and heat inactivation for detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *PLoS One* **16**, 1–16 (2021).
473. Vogels, C. B. F. *et al.* Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer–probe sets. *Nat. Microbiol.* **5**, 1299–1305 (2020).
474. Akobeng, A. K. Understanding diagnostic tests 1: Sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* **96**, 338–341 (2007).