



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Efectos de AKT1 y dependencia de su SUMOilación en procesos relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias

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

Lic. Marcos Gabriel Francia

Directora: Dra. Alejandra Sonia Guberman

Consejero de Estudios: Dr. Martin Monte

Lugar de trabajo: Laboratorio de regulación de la expresión génica en células madre, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQIBICEN, CONICET-UBA.

Buenos Aires, Argentina

Noviembre 2023

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	7
Publicaciones y financiamiento	9
Agradecimientos	10
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 Las células madre	13
1.1.1 Clasificación de las células madre	14
1.1.2 Células madre embrionarias de ratón	18
1.2 Mecanismos moleculares en CMP	19
1.2.1 Señalización dependiente de LIF	19
1.2.1.1 La vía JAK/STAT3	20
1.2.1.2 La vía de SHP2/MAPK	21
1.2.1.3 La vía de PI3K/AKT	22
1.2.2 Señalización dependiente de BMP4	23
1.2.3 Factores de transcripción relevantes en CMP	24
1.2.3.1 El <i>core</i> de pluripotencia	24
1.2.3.2 La red extendida de FTs	26
1.2.4 Otros parámetros relevantes en CMP	27
1.2.4.1 Modificaciones epigenéticas	27
1.2.4.2 Organización dinámica de FTs e interacción con la cromatina	29
1.3 Cultivo de CMP	30
1.3.1 Mantenimiento de la pluripotencia <i>in vitro</i>	30
1.3.2 Condiciones que promueven la diferenciación	32
1.4 La quinasa de serinas/treoninas AKT	33
1.4.1 Modificaciones post-traduccionales de AKT	37
1.5 La SUMOilación	39

1.5.1	SUMOilación de AKT	41
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3	RESULTADOS	45
3.1	Capítulo 1 Regulación de la expresión del factor de pluripotencia Nanog por AKT1 y dependencia de su SUMOilación	46
3.1.0	Modelo experimental	47
3.1.1	Parte I Efecto de AKT1 sobre la expresión de Nanog	52
3.1.1.1	AKT1 induce la actividad del promotor Nanog de manera dependiente de la SUMOilación en células madre embrionarias de ratón	52
3.1.1.1.1	La mutante oncogénica AKT1 E17K induce el promotor de Nanog, mientras que su contraparte deficiente de SUMOilación, AKT1 E17K/2KR, no tiene efecto	56
3.1.1.2	Efecto de AKT1 sobre el ARNm de Nanog	60
3.1.1.2.1	Análisis de los niveles del ARNm de Nanog	60
3.1.1.2.2	Análisis del efecto de AKT1 sobre el 3'UTR del ARNm de Nanog	62
3.1.1.3	AKT1, de manera dependiente de su SUMOilación, produce un aumento de los niveles de la proteína NANOG	65
3.1.1.4	El efecto de AKT1 sobre Nanog es dependiente del contexto celular	68
3.1.1.4.1	AKT1 induce el promotor de Nanog también a la salida de la pluripotencia naïve	74
3.1.2	Parte II Análisis de candidatos a mediar la inducción de Nanog por AKT1	79
3.1.2.1	Las vías de GSK3 β y MEK	80
3.1.2.2	Los factores de transcripción OCT4, SOX2, NANOG y KLF4	82
3.1.2.3	El factor de transcripción TBX3	85
3.1.2.4	La proteína supresora de tumores p53	90
3.1.2.5	Nuevos candidatos revelados por análisis bioinformático	91
3.2	Capítulo 2 Las diferentes variantes de AKT1 tienen distinta distribución subcelular y afectan diferencialmente parámetros que modulan la expresión génica	95
3.2.1	Generación de vectores de expresión codificantes de variantes mCherry-AKT1	96
3.2.2	Análisis de la distribución de las diferentes variantes de AKT1	99
3.2.2.1	La SUMOilabilidad afecta la compartimentación subcelular de AKT1 mientras que la mutación E17K promueve su localización nuclear	101

3.2.2.2	La mutación E17K promueve una redistribución de AKT1 tanto en el núcleo como en el citoplasma y este efecto es dependiente de su SUMOilabilidad _____	103
3.2.3	AKT1 modifica parámetros que impactan en la expresión génica _____	105
3.2.3.1	Efectos sobre la organización general cromatina: la mutante AKT1 E17K modifica la distribución de HP1- α _____	105
3.2.3.2	Efectos sobre la distribución subnuclear de los FTs de pluripotencia _____	109
3.2.3.2.1	Distribución subnuclear de OCT4 _____	112
3.2.3.2.2	Distribución subnuclear de SOX2 _____	115
3.2.3.3	Efecto sobre las interacciones dinámicas de los FTs de pluripotencia con la cromatina 117	
3.2.3.3.1	Dinámica de interacción de OCT4 _____	118
3.2.3.3.2	Dinámica de interacción de SOX2 _____	120
3.2.3.3.3	Dinámica de interacción de NANOG _____	122
4	DISCUSIÓN _____	125
5	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS _____	141
6	MATERIALES Y MÉTODOS _____	144
6.1	Generalidades de cultivo celular _____	145
6.1.1	Cultivo de células madre pluripotentes (CMP) _____	145
6.1.2	Cultivo de células no pluripotentes _____	146
6.1.3	Congelamiento y descongelamiento de células _____	147
6.1.4	Detección de contaminación de cultivos celular por <i>Mycoplasma sp.</i> _____	148
6.2	Metodología Experimental _____	148
6.2.1	Ensayo de actividad de Luciferasa _____	148
6.2.2	Silenciamiento del gen de Tbx3 en CME _____	149
6.2.2.1	Estrategia I. Disminución de la expresión de Tbx3 mediante silenciamiento post-transcripcional mediado por shARN: Generación de vectores _____	149
6.2.2.2	Estrategia II. CRISPR-Cas9: Generación de línea de CME Tbx3-KO _____	150
6.2.3	Análisis de la expresión génica _____	151
6.2.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final _____	151

6.2.3.2	Análisis de niveles de ARNm mediante RT-qPCR	151
I.	Extracción de ARN total	151
II.	Retro-transcripción (RT)	151
III.	PCR en tiempo real (qPCR)	152
6.2.4	Inmunofluorescencia	152
6.2.5	Western blot	153
6.2.6	Plásmidos	154
6.2.7	Transformación de bacterias ultracompetentes	155
6.2.8	Preparación de ADN plasmídico en pequeña y mediana escala	155
6.2.9	Preparación, desarrollo y análisis de experimentos involucrando microscopia confocal	155
6.2.9.1	Generación de proteínas de fusión mCherry-AKT1	155
6.2.9.2	Preparación de las células para microscopía confocal	156
6.2.9.3	Obtención de imágenes por microscopía confocal	156
6.2.9.4	Análisis de imágenes	157
6.2.9.4.1	Distribución subcelular	157
6.2.9.5	Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)	157
6.2.9.5.1	Obtención de datos experimentales	157
6.2.9.5.2	Análisis y ajuste de datos	158
6.3	Análisis Estadístico	159
7	ABREVIATURAS	160
8	BIBLIOGRAFÍA	163

Resumen

Efectos de AKT1 y dependencia de su SUMOilación en procesos relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (CME) se obtienen del macizo celular interno de blastocistos de mamíferos, y en condiciones adecuadas de cultivo tienen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente y de diferenciarse a todos los tipos celulares de un organismo adulto. Estas características las posicionan no sólo como un excelente sistema experimental para la investigación en biología del desarrollo, sino también en el modelado de enfermedades, evaluación de fármacos y como una gran promesa en el área de la medicina regenerativa.

Las propiedades fundamentales de las CME son mantenidas principalmente por los factores de transcripción (FTs) NANOG, OCT4 y SOX2, que juntos constituyen el *core* de pluripotencia que induce la expresión de genes cruciales del estado pluripotente e inhibe aquellos que promueven la diferenciación celular. Si bien hoy en día se conoce un gran número de factores y vías involucradas, dada la complejidad de esta red regulatoria, aún siguen en estudio los mecanismos moleculares que regulan el estado pluripotente en CME. Entender en profundidad estos procesos es fundamental para la futura aplicación segura de estas células en pacientes.

La quinasa de serina y treonina AKT, también conocida como PKB, media la acción de una gran variedad de estímulos, regulando así diversos procesos celulares. En particular en CME, AKT juega un papel fundamental en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de estas células, promoviendo su supervivencia e induciendo la expresión de Nanog. La activación de AKT se produce como consecuencia de su fosforilación en sitios específicos; sin embargo, tanto su actividad quinasa como su especificidad de sustratos son regulados finamente por otras múltiples modificaciones post-traduccionales (MPTs), incluyendo la SUMOilación. Esta MPT juega un papel importante en la regulación de la función, localización, estabilidad e interacciones de un gran número de proteínas.

Los primeros reportes sobre la SUMOilación de AKT cumplen su primera década, y desde entonces solo un puñado de trabajos profundizaron sobre los efectos de esta MPT en la función de esta quinasa. En particular, se ha encontrado que la SUMOilación de AKT tiene efectos sobre diversos procesos celulares como la supervivencia, la proliferación, el *splicing*, e incluso el potencial oncogénico de ciertas líneas celulares, pero su efecto en CME no había sido estudiado.

Por lo tanto, dada la importancia de AKT en el contexto pluripotente y la relevancia de la SUMOilación en su función, postulamos que la SUMOilación de AKT podría tener un papel relevante en el mantenimiento del estado pluripotente en CME.

Para poner a prueba esta hipótesis, estudiamos en primer lugar los efectos de la SUMOilación de AKT1 sobre la expresión del FT de pluripotencia Nanog. Para esto estudiamos el efecto de mutantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas, incluyendo la mutante AKT1 E17K encontrada en varios tipos de cáncer, e interferimos con el proceso de SUMOilación mediante transfección de una mutante dominante negativa de la enzima UBC9, conjugadora del grupo SUMO y clave para el proceso de SUMOilación. Encontramos que AKT induce la expresión de Nanog de manera dependiente de su SUMOilación.

Para estudiar el mecanismo molecular subyacente utilizamos diferentes abordajes para explorar la participación de diversos blancos de AKT, FTs y vías triviales que vinculan a AKT con la expresión de Nanog en CME. Nuestro análisis sugirió que ninguno de los factores estudiados es un mediador exclusivo o indispensable en la inducción de Nanog por AKT. Sin embargo, la exploración del efecto de AKT1 en diferentes contextos celulares, en conjunto con un análisis bioinformático, nos condujeron a nuevos candidatos.

Por otro lado, dado que la SUMOilación afecta la compartimentalización de diversas proteínas, hipotetizamos que esta MPT podría también impactar en la distribución subcelular de AKT1, modulando por este mecanismo su función y especificidad. Para estudiar esta hipótesis, generamos proteínas de fusión a la proteína fluorescente mCherry de las variantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas, lo que nos permitió llevar a cabo distintos estudios utilizando microscopía confocal de células vivas. Encontramos que la SUMOilación modula la compartimentalización y distribución subcelular de AKT1, especialmente promoviendo su traslocación al núcleo. Este hallazgo nos llevó a estudiar el efecto sobre diferentes parámetros nucleares relacionados con la regulación de la expresión génica.

Encontramos que las diferentes variantes de AKT1 afectan de manera diferente la distribución de la proteína asociada a heterocromatina 1 α , indicando que esta MPT sobre AKT puede impactar en el estado de compactación de la cromatina.

Dado que los cambios en el estado de la cromatina pueden afectar la interacción de los FTs con sus sitios blanco dentro del genoma, nos propusimos estudiar la organización subnuclear y la dinámica de interacción con la cromatina de los principales FTs de pluripotencia y su relación con la SUMOilación de AKT1. Para esto utilizamos además la técnica de espectroscopía de correlación de fluorescencia en CME vivas. Nuevamente encontramos que las diferentes variantes afectan tanto la distribución de OCT4 y SOX2, como la interacción con la cromatina de OCT4, SOX2 y NANOG, posiblemente impactando en su función.

En conclusión, en este trabajo demostramos que la SUMOilación de AKT1 impacta en procesos relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia en CME de ratón.

Palabras clave (en orden alfabético): AKT1; AKT1 E17K; Células madre embrionarias; Dinámica de interacción; Espectroscopía de correlación de fluorescencia; Factores de transcripción de pluripotencia; HP1 α ; Microscopía confocal de células vivas; Nanog; SUMOilación; UBC9 (C93S).

Abstract

Effects of AKT1 and their SUMOylation dependence on relevant processes for pluripotency maintenance in embryonic stem cells

Embryonic stem cells (ESCs) are derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, and, under appropriate culture conditions, they can self-renew indefinitely and differentiate into all cell types of an adult organism. These characteristics position them not only as an excellent system for research in developmental biology, but also in disease modeling, drug testing, and as a great promise in the field of regenerative medicine.

The fundamental properties of ESCs are primarily maintained by the transcription factors (TFs) NANOG, OCT4, and SOX2, which together constitute the core of pluripotency that induces the expression of key genes for the pluripotent state and repress those that promote cell differentiation. Given the enormous complexity of this regulatory network, although many factors and pathways are known, the molecular mechanisms that regulate the pluripotent state in ESCs are still under study. A deep understanding of these processes is essential for the future safe application of these cells in patients.

The serine/threonine kinase AKT/PKB, mediates the action of a wide variety of stimuli, thereby regulating a great number of cellular processes. AKT plays a key role in the maintenance of the fundamental properties of ESCs, promoting their survival and inducing the expression of Nanog. The activation of AKT occurs as a result of its phosphorylation in specific sites; however, both its kinase activity and its substrate specificity are finely regulated by other multiple post-translational modifications (PTMs), including SUMOylation. This PTM plays an important role in the regulation of the function, localization, stability, and interactions of many proteins.

Since the first reports on AKT SUMOylation a decade ago, only a few studies have explored the effects of this PTM on the function of this kinase. It has been found that it has effects on various cellular processes such as survival, proliferation, splicing, and even on the oncogenic potential of certain cell lines, but the effect of AKT SUMOylation in ESCs has not been studied yet.

Therefore, given the importance of AKT in the pluripotent context and the relevance of the SUMOylation in its function, we postulate that SUMOylation of AKT could have a relevant role in the maintenance of the pluripotent state in ESCs.

To test this hypothesis, we first studied the effects of AKT1 SUMOylation on the expression of the pluripotency TF Nanog. To do this, we studied the effect of AKT1 mutants with different SUMOylatability, including the AKT1 E17K mutant found in several types of cancer, and also interfered with the SUMOylation process by transfecting a dominant-negative mutant of the UBC9 enzyme. This enzyme normally conjugates the SUMO group to its targets and is key for the SUMOylation process. We found that AKT induces Nanog expression in a SUMOylation-dependent manner.

To study the underlying molecular mechanism, we used different approaches to explore the involvement of several AKT targets, TFs, and trivial pathways that link AKT to Nanog expression in ESCs. Our analysis suggested that none of the factors studied is an exclusive or indispensable mediator

in the induction of Nanog by AKT. However, the exploration of the effect of AKT1 in different cellular contexts, together with a bioinformatics analysis, led us to new candidates.

On the other hand, since SUMOylation affects the compartmentalization of various proteins, we hypothesized that this PTM could also impact on the subcellular distribution of AKT1, modulating its function and specificity also through this mechanism. To study this hypothesis, we generated fusion proteins to the fluorescent protein mCherry, of the AKT1 variants with different SUMOylatability. This approach allowed us to carry out different studies using confocal microscopy of living cells. We found that SUMOylation modulates the compartmentalization and subcellular distribution of AKT1, especially promoting its translocation to the nucleus. This finding led us to study the effect on different nuclear parameters related to gene expression regulation.

We found that the different AKT1 variants affect the distribution of the heterochromatin protein 1 α in a different way, indicating that this PTM on AKT can impact on chromatin compaction.

Since changes in the chromatin landscape affects the interaction of TFs with their target sites within the genome, we decided to study the subnuclear organization and the dynamical interaction to the chromatin of the main pluripotency TFs and their relationship with AKT1 SUMOylation. For this purpose, we also used fluorescence correlation spectroscopy in living ESCs and found that the different AKT1 variants affect both the distribution of OCT4 and SOX2, as well as the interaction to the chromatin of OCT4, SOX2, and NANOG, possibly having an impact on their function.

In conclusion, in this work we demonstrate that AKT1 SUMOylation impacts on different processes relevant for the pluripotency maintenance in mouse ESCs.

Keywords (alphabetical order): AKT1; AKT1 E17K; Embryonic stem cells; Fluorescence correlation spectroscopy; HP1 α ; Live cell confocal microscopy; Nanog; Pluripotency transcription factors; Subcellular distribution; SUMOylation; UBC9 (C93S).

Publicaciones y financiamiento

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

- **“SUMO conjugation susceptibility of Akt/protein kinase B affects the expression of the pluripotency transcription factor Nanog in embryonic stem cells.”**
Marcos Gabriel Francia, Martin Stortz, Camila Vazquez Echegaray, Camila Oses, Paula Vernerri, María Victoria Petrone, Ayelen Toro, Ariel Waisman, Santiago Miriuka, María Soledad Cosentino, Valeria Levi, Alejandra Guberman.
PLoS ONE 16(7): e0254447 (2021).

- **“SUMOylation and the oncogenic E17K mutation affect AKT1 subcellular distribution and impact on NANOG-binding dynamics to chromatin in embryonic stem cells”**
Marcos Gabriel Francia, Camila Oses, Sabrina Lorena Roberti, Mora Reneé Garcia, Lucas Helio Cozza, Maria Candelaria Diaz, Valeria Levi, Alejandra Sonia Guberman.
Journal of Structural Biology, 215(2), 107961 (2023).

- **“AKT1 induces NANOG promoter in a SUMOylation-dependent manner in different pluripotent contexts”**
Marcos Gabriel Francia, Paula Vernerri, Camila Oses, Camila Vazquez Echegaray, Mora Reneé Garcia, Ayelen Toro, Valeria Levi, Alejandra Sonia Guberman.
BMC Research Notes 16, 309 (2023).

La realización de este trabajo de tesis fue posible gracias al siguiente financiamiento:

CONICET

- Beca doctoral Temas estratégicos: 2018-2024

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica: FONCyT

- PICT-2016: 0828
- PICT-2018: 01516

Universidad de Buenos Aires: Programación Científica UBACyT

- 2014-2017: 20020130100157BA
- 2016: 20020160100025BA
- 2020-2022: 20020190100154BA

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Alejandra Guberman (Ale), por haber confiado en aquel estudiantito del ciclo básico de licenciatura que un día le envió un escueto email diciéndole que le interesaban las células madre, y que desde entonces le abrió las puertas de su laboratorio (“El Labo”), desde hace ya 10 años. No puedo estar más agradecido de todo lo que El Labo me ha enseñado en esta década, primero como un estudiante de una pasantía, luego como tesista de licenciatura y hoy como becario doctoral. Muchas gracias Ale, en primer lugar, por haber sido la excelente persona que sos, y obviamente por la excelente directora que fuiste a lo largo de estos años. Y no menos importante, gracias por hacer que la dinámica de trabajo de El Labo esté siempre marcada por el compañerismo y la amistad entre todos sus integrantes. El Labo siempre es un lugar donde todos nos sentimos muy a gusto.

Muchas gracias a tooooooda la banda de El Labo, tanto de QB71 como de QB6. Gracias a los actuales Camilita, Pau, Aye, Kande, Sabri, Martin, Mora, Fede, Mel y Victor, como a los pasados, Cami Grande, Vicky, Sole, Clau y Ari. Hemos pasado muchísimas cosas juntos y me llevo mil anécdotas con ustedes. Además, quisiera agradecer especialmente a Valeria Levi, por todo el acompañamiento de todos estos años.

Por otro lado, no puedo dejar de agradecer especialmente a Camilita y Pau, porque gracias a ellas, y entre los tres, volvimos a poner en funcionamiento a El Labo luego de la pandemia. Fueron tiempos completamente adversos, pero entre risas y llantos, y con un gran apoyo mutuo, una coordinación muy fina y un gran compañerismo, logramos salir adelante. Toda esa experiencia quedará para siempre en nuestra historia. Gracias a ustedes, y también a Aye y Kande, por haber sido las compañeras y amigas que fueron durante estos últimos años, claramente no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Muchas gracias a todo el Departamento de Química Biológica y IQUBICEN. Es un excelente lugar para hacer ciencia, con un gran sentido de la colaboración y solidaridad entre sus miembros. Gracias por el buen ambiente de trabajo de todos estos años. Muchas gracias tanto a la dirección, como a los bedeles, los secretarios, y los no docentes. Sin todos ellos, el departamento no funcionaría de la misma manera. Muchas gracias a todos los vecinos de nuestro pasillo, por estar siempre ante las necesidades más urgentes, en especial cuando se nos termina un reactivo que necesitamos en ese momento y generosamente salen a nuestra ayuda. Gracias al grupo del Dr. Canepa, el grupo del Dr. Monte (Mica, Meli, Franco, Fati), el grupo de la Dra. Perez Leiros y Dra. Ramhorst (Lau, Liz, Fati, Guille, Dani, Dai, Vane y resto del equipo), y el grupo de las Dra. Erlejman y Mazzaira. En especial, gracias al grupo de la Dra. Kotler (Roxy y Sole), por su buena predisposición y amistad de los últimos años. Gracias también

a todos los grupos usuarios del cuarto de cultivo QB57, por la solidaridad y buena predisposición que siempre abunda, en especial en esos momentos de colapso que alguien desinteresadamente te presta o te cambia su turno en el flujo laminar.

Muchas gracias a los grupos que nos proporcionaron vectores, reactivos, herramientas y/o colaboraron activamente en algún aspecto para el desarrollo de esta tesis: Dra. Srebrow, Dra. Vazquez, Dr. Monte, Dr. Artz, Dr. Davie, Dr. Bragado, Dra. Fuertes, Dr. Waisman, Dr. Blaustein. En especial, muchas gracias al grupo de Dr. Miriuka del FLENI, por siempre estar dispuestos a colaborar con nosotros.

Por último, con respecto a los agradecimientos académicos, quisiera darle infinitas gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y en especial a la Universidad de Buenos Aires. Literalmente, no podría estar en este lugar si no hubiera sido por la educación pública, libre, gratuita y de calidad de esta magnífica casa de estudios. Gracias por haber sido mi segunda casa los últimos 12 años. Gracias al CONICET por haber apoyado mi proyecto desde hace 6 años atrás, permitiéndome llevar a cabo todo lo plasmado en esta tesis. Gracias a la ANPCyT y la UBA por el soporte económico del laboratorio. Y obviamente, gracias a todos los argentinos, incluso a aquellos que, nunca o todavía, han podido pisar una universidad, por financiar a todas estas instituciones públicas.

Por último, los agradecimientos más importantes son para mi familia. Gracias a mi mamá Lucia, y a mi papá del corazón Pedro. Gracias por su infinito amor, paciencia y apoyo en todas mis locuras. Gracias a toooda mi familia más cercana, que me transmiten su apoyo y entusiasmo por cada logro, en cada llamado, en cada mensajito o cada domingo de reunión familiar. Gracias también a mis mejores amigos de siempre, que forman parte de mi familia, y desde hace casi más de 20 años compartimos nuestra vida: Marian, Karu y Fede. Gracias Lau, por estar siempre y por haber transitado juntos todas nuestras crisis existenciales y del doctorado. Gracias Vicky, por esas infinitas charlas. Y gracias Sebas, por acompañarme en los últimos 7 años.

¡Muchísimas gracias a todos por el apoyo de estos años!

1 INTRODUCCIÓN

En 1868, de la mano del biólogo alemán Ernst Haeckel [1], apareció por primera vez el término célula madre en la literatura científica. Haeckel, seguidor de la teoría de la evolución de Darwin, publicó una serie de árboles filogenéticos para representar la evolución de los organismos mediante la descendencia de ancestros comunes y llamó a estos árboles Stammbäume (en alemán, árboles genealógicos). En este contexto, Haeckel utilizó el término Stammzelle (en alemán, célula madre) para describir el organismo unicelular ancestral que dio origen a todos los organismos pluricelulares [1], [2]. Posteriormente, en una versión revisada de su libro *Anthropogenie* en 1877, Haeckel planteó el pasaje de este término desde la filogenia a la embriología y propuso que el óvulo fecundado también se llamara célula madre. Es decir, propuso dos significados para el concepto de célula madre: como el ancestro unicelular de todos los organismos pluricelulares y como el óvulo fecundado que da lugar a todas las células del organismo. Si bien la idea original detrás de este término no es exactamente como la concebimos hoy en día, los invitamos a que nos acompañen en las siguientes páginas de esta sección, no solo a entender el concepto actual detrás de este término, sino a profundizar sobre el estado del arte detrás de este fascinante modelo de investigación, al que Haeckel, sin querer, hace un siglo y medio le otorgaría su nombre.

1.1 Las células madre

Hoy en día, se define a las *células madre* (CM), como células que poseen simultáneamente dos propiedades fundamentales: la de *auto-renovación* y la de *diferenciación*. La *auto-renovación* es la capacidad de propagarse ilimitadamente mediante sucesivas divisiones celulares. En general, en cultivo estas divisiones son simétricas, dando lugar a dos células hijas iguales entre sí e iguales a la célula progenitora, manteniendo sus características e integridad genómica intactas. Sin embargo, en el contexto *in vivo*, en el cual las CM se encuentran tanto en el embrión, como en diferentes tejidos de un organismo adulto, estas células pueden tener divisiones asimétricas, donde una de las células hijas conserva sus capacidades de CM, manteniendo una población constante de estas células, mientras que en la otra célula hija no. Por otro lado, si bien las CM pueden ser tanto células no diferenciadas, como parcialmente diferenciadas, mantienen la capacidad de *diferenciación*, es decir, pueden comprometerse en un linaje o tipo celular más especializado, mediante un cambio en su programa de expresión génica que determina un cambio fenotípico, permitiéndole cumplir una función determinada [3].

Si bien las CM son fundamentales para el crecimiento embrionario, su relevancia no solo se limita a etapas tempranas en el desarrollo, sino que la presencia de CM en el organismo adulto cumple un rol fundamental en los procesos de, por ejemplo, renovación de tejidos por su normal deterioro, o reparación frente a un daño [4].

Como ya se puede percibir en estas primeras frases, las CM son extraordinariamente plásticas, lo que las establece como una gran promesa en el área de la medicina regenerativa por ser una fuente ilimitada de células potencialmente diferenciables a múltiples tipos celulares, de acuerdo con la necesidad del investigador, médico o paciente. Además, las CM constituyen un excelente modelo en las áreas de investigación de biología del desarrollo, modelado de enfermedades y evaluación de fármacos. Por lo tanto, si bien desde el surgimiento de esta área de investigación, esta se encuentra en continua y rápida expansión, el estudio de la biología de las CM sigue constituyendo un excelente modelo para el estudio de mecanismos esenciales, y una necesidad para la aplicación segura y eficiente de las CM en diferentes áreas [5].

1.1.1 Clasificación de las células madre

Se conocen diversos tipos de CM que pueden ser encontradas naturalmente en diferentes etapas del desarrollo de un organismo, como describiremos a continuación, y además, diferentes tipos de CM que pueden ser producidas y mantenidas en el laboratorio a partir de diversas fuentes, incluyendo células terminalmente diferenciadas [5]. Dada la diversidad de CM, se las pueden clasificar según su *potencial de diferenciación* o su *origen*.

Según su *potencial de diferenciación*, es decir, según la cantidad de linajes o tipos celulares específicos que pueden derivar de un tipo de CM, se pueden clasificar en 5 grupos. Específicamente, se definen como CM *totipotentes*, *pluripotentes*, *multipotentes*, *oligopotentes* y *unipotentes* [6] (Figura I. 1). Cabe destacar que esta clasificación puede ser ambigua según la bibliografía, y muchas veces, por ejemplo, a un mismo tipo celular, se lo puede encontrar descrito como pluripotente, multipotente y/o oligopotente. Esto se debe a que, en algunos casos los límites de esta clasificación son difusos, pero además, van surgiendo nuevos protocolos dirigidos de diferenciación y/o transdiferenciación y condiciones de cultivo que permiten la reprogramación génica expandiendo el potencial de cada tipo de CM en su contexto natural. A lo largo de este trabajo, usaremos la clasificación estándar que se encuentra a continuación.

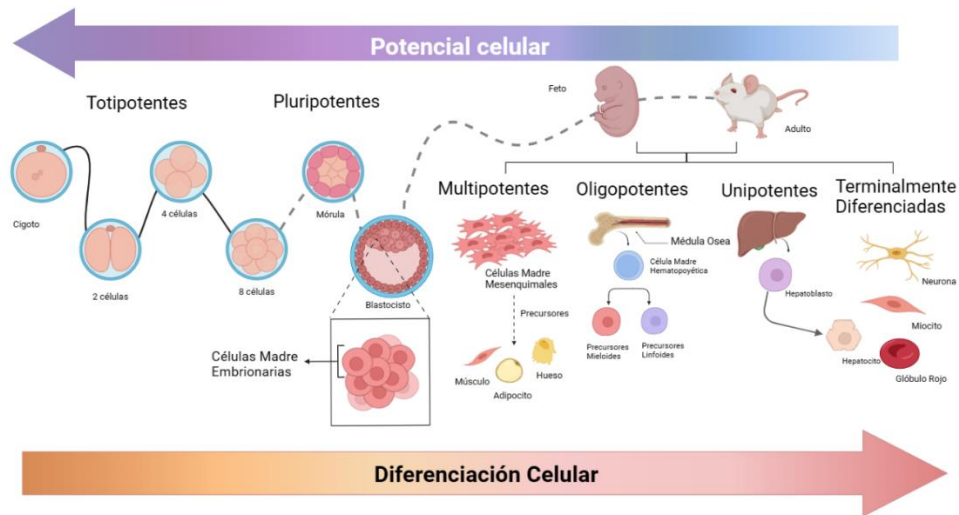


Figura I. 1. Estadios del desarrollo y tipos de células madre, clasificados según su potencial, y compromiso celular (diferenciación).

Las *células madre totipotentes* (también encontradas bajo el termino *omnipotentes*) son aquellas capaces de dar origen a todos los tipos celulares de un organismo adulto, incluidos los anexos extraembrionarios [7]. El cigoto, formado por la unión del ocito y el espermatozoide en la fecundación, es ejemplo trivial de totipotencia. Por otra parte, también son totipotentes las células que surgen a partir de las primeras divisiones celulares del cigoto, los primeros blastómeros. Estas células, al igual que el cigoto, pueden potencialmente dar origen a un individuo, incluyendo por supuesto, todos los tipos celulares y anexos extraembrionarios, como ocurre en el caso de los gemelos.

A medida que transcurre el desarrollo, las células del embrión continúan diferenciándose y se van comprometiendo hacia un linaje particular, perdiendo progresivamente su capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares del embrión. Luego de sucesivas divisiones de los blastómeros, el embrión se encuentra en una forma esférica maciza llamada mórula. La mórula es un estadio breve, debido a que en su interior rápidamente comienza el proceso de cavitación en el que se forma una cavidad interna, el blastocelo. Este proceso da origen a una estructura denominada blastocisto, que contiene dos poblaciones de células diferentes, las células del trofoblasto que formarán parte de los tejidos extraembrionarios, y las células del macizo celular interno (MCI), que darán lugar al individuo. Las células del MCI, denominadas células madre embrionarias (CME, ESCs en inglés), son pluripotentes [8].

En general, las *células madre pluripotentes* (CMP) se definen como aquellas capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo, incluida la línea germinal. Si bien de estas capas derivan todos los tejidos y órganos del organismo, las CMP no son capaces de dar origen a los tejidos extraembrionarios [8]. Las CMP se encuentran en un grado mayor de compromiso celular en comparación con las totipotentes y tienen menor potencial que estas.

Debemos mencionar que muy recientemente, han surgido trabajos que sugieren que estas características no son exclusivas de estas células mencionadas, sino que, manipulando las condiciones de cultivo, puede lograrse aumentar el potencial de ciertas células. Específicamente, muy recientemente se logró la generación de modelos de embriones auto-ensamblantes a partir de células madre embrionarias, los cuales emulan las primeras etapas del desarrollo embrionario, sirviendo como un excelente modelo para el estudio de estos procesos y desafiando los límites del potencial de las CM establecidos hasta el momento [9]–[11].

Desde el establecimiento de las primeras CME, en 1981 y durante muchos años, el estudio de las CMP se acotó a las CME. Estas células fueron las únicas CMP accesibles por la comunidad, debido a que su obtención, si bien demanda condiciones técnicas específicas, es relativamente sencilla (esquematizado en Figura I. 2), y una vez obtenidas, pueden ser mantenidas en cultivo de manera estable e indefinidamente en condiciones apropiadas [12].

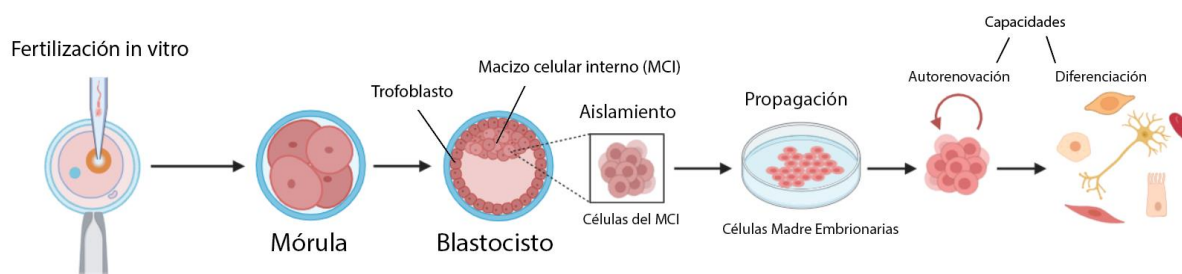


Figura I. 2. Obtención de CME embrionarias.

Si bien hay diferentes tipos de células madre derivadas de diferentes estadios embrionarios, el término CME se utiliza, en general, y en este trabajo, para las CMP derivadas del MCI. Por otra parte, hoy en día, se conoce que el estado pluripotente no es uno solo, sino que existe un gradiente de diferentes estados asociados a características específicas, que mencionaremos más adelante.

En la actualidad existen también CMP que no se obtienen a partir de embriones, sino que se pueden generar mediante la manipulación de la expresión génica de células terminalmente diferenciadas. En 2006, el Dr. Shinya Yamanaka reportó por primera vez la reprogramación exitosa de fibroblastos, células terminalmente diferenciadas, de ratón, hacia un estadio pluripotente similar al de las CME [13]. Esto fue logrado a partir de la expresión forzada de cuatro factores de transcripción (FTs), importantes en el estado pluripotente y las células generadas fueron denominadas *células madre pluripotentes inducidas* (CMPI o iPSCs en inglés). Un año después, se obtuvieron resultados similares a partir de fibroblastos humanos [14], abriendo la puerta a un sinfín de líneas de investigación en todo el mundo y generando así nuevas perspectivas para la aplicación de células madre pluripotentes tanto en la generación de modelos de enfermedades como para su futura aplicación en terapias regenerativas [5], [15], [16] (Figura I. 3). Estos logros, junto con los experimentos

pioneros de John Gurdon de la década de 1960 [17] que condujeron a la clonación de animales por transferencia nuclear, terminaron de dejar atrás el antiguo dogma de la biología del desarrollo que indicaba que una célula diferenciada no era capaz de volver a un estadio de desarrollo anterior.

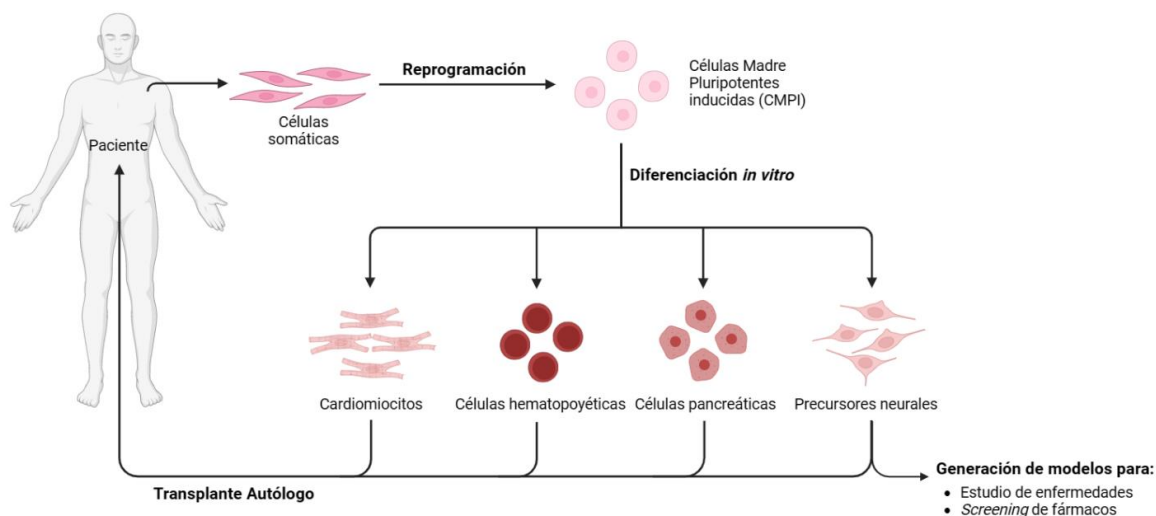


Figura I. 3. Uso de CMPI en terapias regenerativas. Ejemplo de trasplante autólogo.

Por último, las *células madre multipotentes, oligopotentes y unipotentes* son células más comprometidas en la diferenciación que las CMP y solo son capaces de dar origen a un rango limitado de tipos celulares. Se encuentran presentes en el organismo adulto [18] y son las responsables de la renovación de los tejidos que se van deteriorando normalmente a lo largo del tiempo, y de la reparación de ciertos daños que los tejidos puedan sufrir. Un ejemplo muy conocido de células madre multipotentes son las CM mesenquimales (CMM o MSCs, en inglés) [16], que se encuentran en una variedad de tejidos, como la médula ósea, los tejidos adiposo, óseo y sanguíneo, entre otros [19]. Por otro lado, las CM hematopoyéticas son un ejemplo clásico de CM oligopotentes, que pueden diferenciarse hacia linajes mieloides y linfoides [20]. Sin embargo, esta clasificación de CM ha caído en desuso en los últimos años y en la mayoría de los casos se las considera CM multipotentes. Con respecto a las CM *unipotentes*, éstas se encuentran en la base de la escala de su potencial de diferenciación y son precursoras de un único tipo celular terminalmente diferenciado; por ejemplo, las CM musculares, que dan lugar a células musculares maduras [21].

Por último, en contraste con cualquier tipo de CM, según esta clasificación podríamos reunir en un gran grupo a las células más abundantes en un organismo desarrollado: las células terminalmente diferenciadas. Estas células mantienen su identidad toda su vida y en condiciones fisiológicas no patológicas, no revierten el proceso de diferenciación que dio lugar a su fenotipo especializado. Durante la diferenciación, las células se van especializando cada vez más en una función determinada y van perdiendo su capacidad proliferativa. Si bien no es común, naturalmente pueden ocurrir reversiones hacia estadios celulares menos diferenciados, adquiriendo un mayor potencial de

diferenciación y proliferación, pero estos procesos llevan a patologías como el cáncer [22]. Como ya lo mencionamos, hoy en día en el laboratorio también se puede volver a atrás en la diferenciación, pero de forma controlada, y dar origen a líneas de CMPI.

1.1.2 Células madre embrionarias de ratón

Las células madre embrionarias de ratón, de aquí en más referidas como CME, son células pluripotentes, que constituyeron el modelo de estudio principal en el que llevamos a cabo la mayoría de los abordajes experimentales de este trabajo de tesis doctoral.

Han pasado más de cuatro décadas desde el primer reporte de obtención exitosa de una línea celular establecida *in vitro* de CME en 1981 [23]. Como ya mencionamos, las mismas fueron derivadas del MCI de blastocistos de ratón y casi dos décadas después, a partir de blastocistos humanos [24]. La capacidad intrínseca de diferenciación de las CME implicó un desafío importante para el mantenimiento de estas células en cultivo en estado pluripotente o indiferenciado, debido a que naturalmente las mismas tienden a diferenciarse. Inicialmente, estas células eran mantenidas tanto sobre una capa (*feeder layer*) de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por su sigla en inglés) tratados con mitomicina o irradiados para evitar su proliferación [25], como también en medio de cultivo condicionado de líneas de teratocarcinoma (tumor embrionario) [26], lo que permitía que sus características de auto-renovación y pluripotencia permanezcan intactas.

En estas condiciones, las CME no solo podían ser propagadas indefinidamente, manteniendo su capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares, sino que además, se encontró que podían contribuir a diferentes linajes celulares de ratones quimera, si eran inyectadas nuevamente en blastocistos de ratón [27]. Estos trabajos pioneros, juntos con técnicas emergentes de ingeniería genética y biología molecular, durante muchos años facilitaron el desarrollo de nuevos abordajes, por ejemplo, para la generación de ratones *knockout* para genes determinados, permitiendo así el estudio de la función de un gran número de genes.

Rápidamente se comenzaron a investigar los componentes que la *feeder layer* de células MEF proporcionaba al medio de cultivo y que impedía que las CME escaparan del estado pluripotente. Se encontró que estas células secretaban una citoquina denominada *factor inhibidor de la leucemia* (LIF, por su sigla en inglés), cuya presencia en el medio era condición suficiente para inhibir la diferenciación espontánea de las CME [28]–[30]. Luego del descubrimiento de la presencia de LIF en los medios de cultivo que mantenían inalteradas las capacidades intrínsecas de CME, se descubrió que la *proteína morfogenética de hueso 4* (BMP4) también jugaba un papel importante en el mantenimiento de la

pluripotencia [31]. Este factor se encuentra presente en el suero fetal bovino (SFB) utilizado en los medios de cultivo, aunque inicialmente se desconocía su presencia.

Estos descubrimientos determinaron una mejora clave en, lo que hasta ese momento era el complejo sistema de cultivo de las CME. En particular, luego de que se determinara que el agregado de LIF y de BMP4 al medio de cultivo era suficiente para mantener a las CME en estado indiferenciado, incluso utilizando medios de cultivo libres de suero (medios definidos), el cultivo de CME sobre *feeder layer* cayó en desuso para el cultivo de rutina y solo se sigue usando para condiciones especiales, por ejemplo, establecimiento de ciertas líneas celulares. Por otro lado, se abrió la puerta al estudio de los mecanismos moleculares que regulan el estado pluripotente de CME, tanto *in vivo* como *in vitro*, la cual continua en vigencia hasta el día de hoy.

1.2 Mecanismos moleculares en CMP

Hoy en día se conoce que los factores presentes en el medio de cultivo original, LIF y BMP4, actúan induciendo la activación de una serie de vías fundamentales para el mantenimiento de la pluripotencia en CME. En particular, LIF activa las vías de JAK/STAT3, PI3K/AKT y MAPK [32], mientras que BMP4 activa la vía de SMAD1 [31]. Si bien en este trabajo nos enfocaremos en el efector de la vía de PI3K/AKT, creemos necesario mencionar brevemente los aspectos fundamentales de cada una de estas vías, que integran el contexto de señalización activa en CME.

1.2.1 Señalización dependiente de LIF

El factor inhibidor de la leucemia o LIF pertenece a la familia de citoquinas IL-6. Posee un receptor heterodimérico, transductor de señales de la familia de IL-6, que se expresa en CME y está constituido por el receptor de superficie de baja afinidad de LIF (LIFR) y la glicoproteína 130 (GP130). La unión del LIF con su receptor, activa diferentes vías de señalización que repercuten en la regulación de la expresión génica de CME [33], tanto afectando directamente la transcripción, induciendo genes de pluripotencia, como modificando el estado de la cromatina [34]. Específicamente, se activan tres vías de señalización importantes en CME: la vía JAK/STAT3, la vía de SHP2/MAPK, y de especial interés para este trabajo, la vía de PI3K/AKT. A continuación, abordaremos los aspectos más importantes de cada una de estas vías.

1.2.1.1 La vía JAK/STAT3

La vía JAK/STAT3 es una de las vías de transducción de señales más estudiadas en múltiples sistemas celulares. Particularmente en CME, posee un rol fundamental en el mantenimiento de sus propiedades fundamentales [35].

La unión de LIF con su receptor LIFR produce el reclutamiento de GP130 [32]. Las regiones citoplasmáticas de estos receptores están constantemente unidas a las quinasas Janus o Jano (JAKs), una familia de quinasas de tirosina, compuesta por JAK1, JAK2, JAK3 Y TYK2 [36]. En ausencia de ligandos, estas JAKs están inactivas, mientras que, tras la unión de éstos a los receptores de superficie, las JAKs se activan por autofosforilación de su dominio inhibitorio. Las JAKs activadas fosforilan los residuos de tirosina de GP130 y LIFR, lo que permite la unión de la otra proteína blanco de JAKs, a la región citoplasmática de los receptores; el factor de transcripción transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). STAT3 es fosforilada por JAKs, se disocia del receptor y forma un homodímero. De esta manera, STAT3 entra en el núcleo donde actúa como FT induciendo la expresión de genes clave del mantenimiento de la pluripotencia y reprimiendo genes asociados a la diferenciación (Figura I. 4) [35].

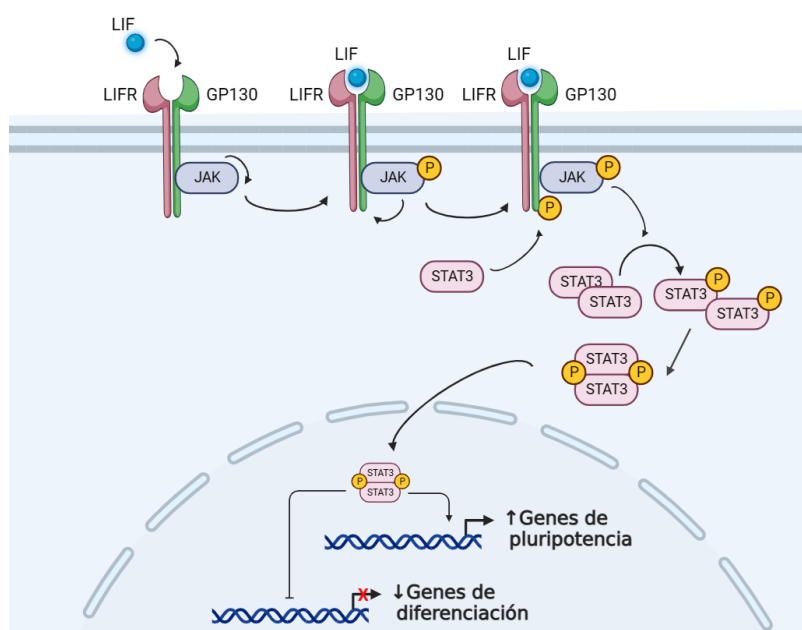


Figura I. 4. Activación de la vía de STAT3 por LIF en CMP. Adaptado de Hirai et al [34].

A partir de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), se determinaron más de 2500 sitios de unión de STAT3, de los cuales más de 700 son compartidos con los FTs de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG [37], de los que hablaremos en detalle más adelante. Como mencionamos, entre los genes blanco de STAT3, se encuentran tanto genes que se inducen, como genes que reprimen, muchos de los cuales son marcadores de diferenciación a un linaje específico. Esto indica que STAT3 tiene también un papel clave en la prevención de la diferenciación [31]. Entre estos sitios también se

encuentran las regiones promotoras de FTs de pluripotencia, indicando que STAT3 está altamente integrado en la red que regula el estado pluripotente.

Por un lado, la vía JAK-STAT3 posee una regulación de *feedback* (bucle de retroalimentación) positivo, donde el mismo STAT3 promueve la expresión de GP130, LIFR y STAT3, activando aún más la cascada de señalización en presencia de LIF [38]. Por otro lado, la regulación de esta vía también implica la presencia de un *feedback* negativo: STAT3, activado por JAKs, induce la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3), que se une y bloquea el dominio quinasa de JAKs por la región inhibitoria de la quinasa [39]. Por otro lado, por fuera de estos mecanismos de feedback, STAT3 también es regulado por otros mecanismos. Por ejemplo, la proteína inhibidora de STAT3 activado (PIAS3) se une de manera directa a STAT3 e interfiere con su actividad de unión al ADN [40].

1.2.1.2 La vía de SHP2/MAPK

La vía SHP2/MAPK ha sido una de las vías dependientes de LIF en CMP menos estudiadas comparadas con las otras dos que mencionamos.

LIF activa la vía de MAPK a través SHP2 y mediada por de GRB/SOS [41]. SHP2 es una tirosina fosfatasa que se une al GP130 tras la fosforilación del receptor por las JAKs, y que también es fosforilada por esta última. El complejo GRB2/SOS interactúa con SHP2 fosforilado y activa la vía de MAPK, involucrando la cascada de fosforilación de RAS/RAF/MEK/ERK (esquemático en la Figura I. 5) [42]. En la actualidad se conocen otras proteínas, como las KSR (no incluidas en la figura), que intervienen en esta vía y actúan como *scaffold* de estas quinasas, que favorecen la interacción de las mismas, y que añaden una capa más de complejidad y regulación [43]. Esta vía, a diferencia de las otras, promueve la diferenciación debido a que reprime la expresión de FTs de pluripotencia importantes, como Nanog y Tbx3 [44], [45]. Específicamente sobre Nanog, la quinasa ERK1 fosforila a este FT, lo que reduce su estabilidad, promoviendo su ubiquitinación, como también reprimiendo su actividad de transactivación, induciendo así virtualmente la diferenciación de CME por estos dos mecanismos de manera simultánea [46]. Retomaremos éste y otros mecanismos de regulación de Nanog en la sección 1.2.3. Se especula que el mantenimiento de la vía de ERK encendida en estado latente es uno de los mecanismos que promueve la salida del estado indiferenciado rápidamente en ausencia de LIF, proporcionando una vía de escape del estado pluripotente eficiente, en el caso de recibir los estímulos adecuados [47]. Además, diversos experimentos demuestran que la perturbación de esta vía, por ejemplo, mediante interferencia de alguno de sus componentes, también bloquea las capacidades intrínsecas de diferenciación, evidenciando su importancia para el mantenimiento de las características fundamentales de CME [45], [48], [49].

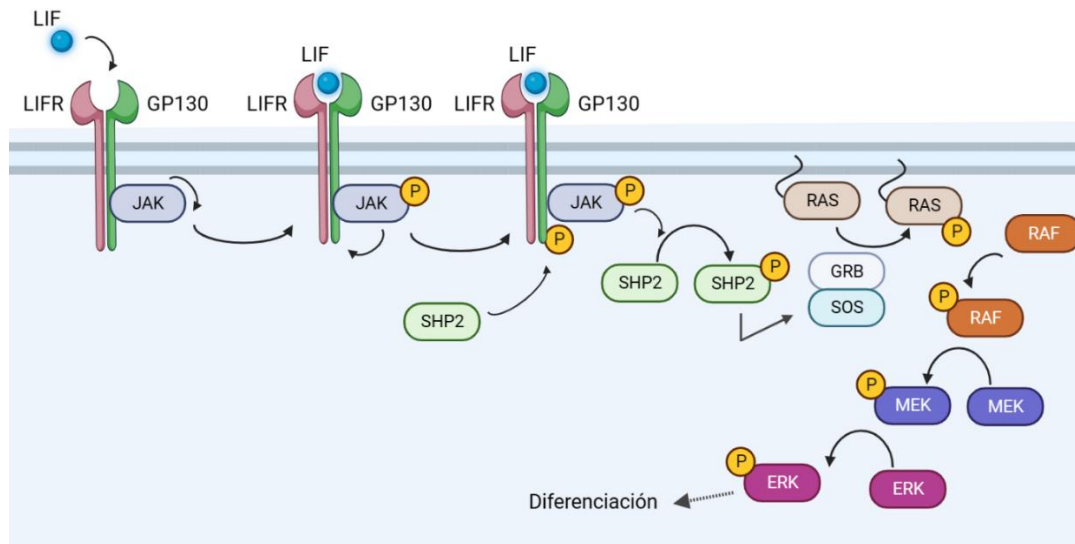


Figura I. 5. Activación de la vía de SHP2/MAPK en CME. Adaptado de Hirai et al [34].

1.2.1.3 La vía de PI3K/AKT

Por último, tal como ocurre en el inicio de los casos anteriores y esquematizado en la Figura I. 6, a partir de la interacción de LIF con el LIFR y GP130, se produce la activación de las JAKs, desencadenando la fosforilación y activación de p85, la subunidad reguladora de la Fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). Esta quinasa, cataliza la conversión del Fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) a Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática. PIP3 actúa como un andamio y forma una interacción con los dominios PH de diversas proteínas, entre ellas, la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1). Ante este evento, PDK1 se activa y fosforila a la quinasa de serinas y treoninas AKT (también conocida como PKB) en la T308, que también es transitoriamente reclutada por el PIP3 a la membrana [50]. Esta fosforilación clave, en conjunto con otra mediada por la quinasa mTORC2 en la S473, son fundamentales para la activación de AKT como efector de esta vía de señalización. Más adelante profundizaremos sobre sus características, funciones y regulación fina de la actividad de esta quinasa clave para un gran número de procesos celulares, entre ellos, el mantenimiento de las propiedades fundamentales de CMP.

Uno de los eventos importantes río abajo de esta vía es la inhibición de la quinasa GSK3 β por dos mecanismos diferentes, los cuales impactan de manera positiva en la expresión de los FTs relacionados al estado pluripotente de CME: NANOG, TBX3 y C-MYC [51]. Por un lado, AKT inactiva directamente a GSK3 β mediante fosforilación en su S9 [52], mientras que, por otro lado, AKT también promueve su interacción con la proteína FRAT/GBP, lo que facilita su exportación del núcleo [53], evitando la interacción con sus proteínas blanco como C-MYC. Esta inhibición de GSK3 β , inhibe su actividad quinasa y en consecuencia la fosforilación de C-MYC, lo cual impide su degradación. Si bien

la regulación río abajo de esta quinasa es compleja y hay reportes contradictorios, existe cierto consenso en que GSK3 β fosforila y activa a TCF3, que es un represor transcripcional de varios genes de pluripotencia, incluido Nanog [54], además, de fosforilar a β -catenina, un FT inductor de la expresión de Nanog, lo que promueve su ubiquitinación y posterior degradación [55]. Por esto motivo, en un contexto de GSK3 β inactiva, esta quinasa no produce la activación de TCF3 ni la degradación de β -catenina, contribuyendo positivamente a la expresión de Nanog y otros genes de pluripotencia [56], [57].

Por otro lado, esta vía también induce la acetilación de la proteína STAT3 mediante la acetiltransferasa p300/CBP o CREB. Una vez acetilada, STAT3 forma dímeros más estables y transcribe genes de manera más activa sin la necesidad de la fosforilación en su T705 [58]. Esto muestra un rol dual de LIF en la activación de STAT3, debido a que la produce tanto mediante su fosforilación como por su acetilación.

En CME, la vía PI3K/AKT a su vez puede ser activada por otros factores, como el FGF4, la insulina, IGF1, retinol, entre otros [47]. Si bien, estos factores pueden activar esta vía, no está demostrado que sean relevantes para el mantenimiento de las propiedades fundamentales en CME [59].

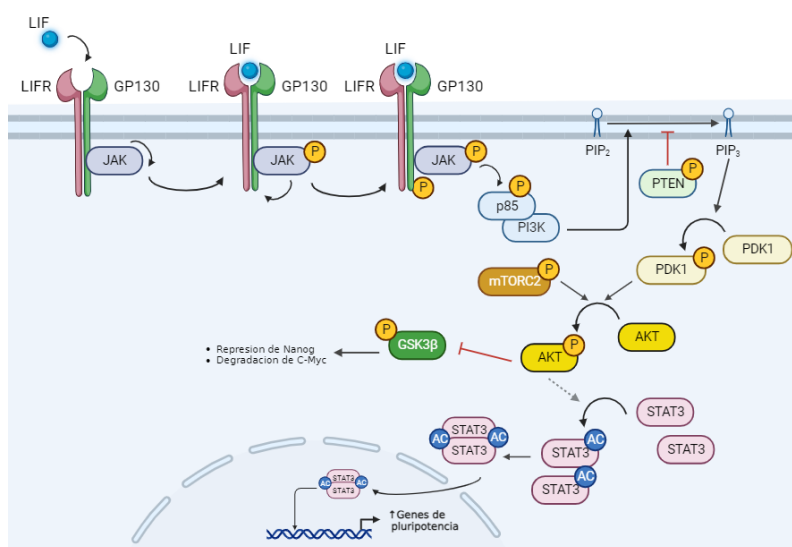


Figura I. 6. Activación de la vía de PI3K/AKT mediante LIF en CME de ratón. Adaptado de Hirai et al [34].

1.2.2 Señalización dependiente de BMP4

El factor BMP4 está implicado en el mantenimiento en cultivo de las propiedades fundamentales de CME en conjunto con LIF [31]. La señal de BMP4 es mediada por los factores R-SMAD (SMAD1, 5 y 8), que forman heterodímeros con el CO-SMAD (SMAD 4), y en conjunto inducen la expresión de los genes llamados Inhibidores de la diferenciación 1 y 3 (esquematisado en la Figura I. 7) [60]. La

sobreexpresión de estos genes, reemplazan en función a BMP4, pero no a LIF. Esto sugiere que las cascadas de señalización modulan la expresión génica de diferentes genes blanco. Por otro lado, la cascada de señalización de BMP4 reprime la actividad de ERK, lo que contribuye a disminuir su efecto inhibitorio sobre Nanog, mencionado anteriormente, y por lo tanto, a mantener la auto-renovación de CME [61].

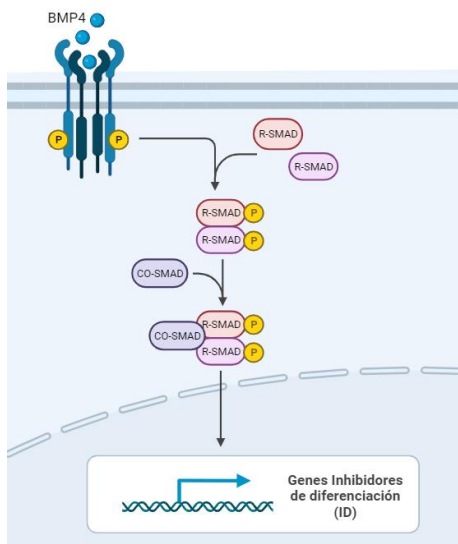


Figura I. 7. Señalización dependiente de BMP4 en CME. Adaptado de Okita & Yamanaka [62].

1.2.3 Factores de transcripción relevantes en CMP

1.2.3.1 El *core* de pluripotencia

En conjunto, todas las vías de señalización mencionadas contribuyen en diferente medida, a mantener el estado indiferenciado mediante la activación de la expresión de un núcleo (o *core*) de tres FTs principales: OCT4, SOX2 y NANOG, que se conocen como los FTs fundamentales de pluripotencia. A través de los años, una gran cantidad de experimentos de CHIP se han utilizado para mapear los sitios de unión al genoma de estos FTs fundamentales de CME [63], [64]. Estos estudios, además de revelar los sitios de pegado específico de OCT4, SOX2 y NANOG, han encontrado un extenso solapamiento entre ellos en numerosos sitios blanco de genes activos, entre los que se encuentran otros FT asociados a la pluripotencia, así como sitios pausados y reprimidos [65], que en general corresponden a genes específicos de diferenciación a distintos linajes. Además, estos FT están involucrados en la regulación de su propia expresión y la de cada uno de los otros. Durante el desarrollo, existe un equilibrio entre la pluripotencia y la diferenciación, sumamente regulado, que se logra principalmente por fluctuaciones en la expresión de estos FTs [66]. En este sentido, las CMP también presentan estas variaciones que, junto con otros factores, determinan la heterogeneidad en

su capacidad de auto-renovación y pluripotencia [67]. En conjunto, este modelo que implica la existencia de este núcleo de FTs de pluripotencia en equilibrio puede explicar cómo las CME pueden mantener la auto-renovación y pluripotencia, y al mismo tiempo un alto nivel de plasticidad, al permanecer preparadas para la diferenciación [68].

Por un lado, el factor de transcripción Oct4, codificado por el gen Pou5f1, es expresado tanto en células en estado totipotente, como en CME [69]. Este FT juega un papel crítico en el mantenimiento de la pluripotencia, tal que en embriones en los que el gen Pou5f1 se encuentra *knockeado* no forman un MCI pluripotente, sino que las células solo se diferencian a trofoectodermo [70]. Por otro lado, la regulación fina de los niveles de expresión de OCT4 es clave para el destino celular, dado que se observa que la disminución del ARN mensajero (ARNm) de Oct4 en un 50%, es suficiente para formar solo células del trofoectodermo, mientras que la sobreexpresión en un 50% promueve la diferenciación a endodermo y mesodermo [71].

Por otro lado, SOX2 es un factor de transcripción con sitio de unión al ADN del grupo de proteínas de alta movilidad [72]. Este gen es expresado en el macizo celular interno y en el ectodermo extraembrionario. De manera similar a lo que ocurre con Oct4, embriones con el gen Sox2 *knockeado* no son capaces de generar un MCI y se diferencian principalmente a trofoectodermo [73]. Se cree que el fenotipo similar en los embriones Sox2-KO y Oct4-KO se debe a la acción sinérgica de estos FT en la regulación de la expresión de diferentes genes específicos de CME, incluidos ellos mismos [74].

SOX2 y OCT4 pueden formar tanto homodímeros, como heterodímeros entre sí, pudiendo interactuar juntos con la mayoría de sus genes blanco, aunque también forman heterodímeros con otros FTs, lo que determina que en ciertos contextos, ante cambios en los niveles relativos de estos FTs y/o expresión de otros *partners*, cambie el patrón de genes regulados por estos [75], [76].

Por último, con respecto a NANOG, el tercer miembro del *core* de pluripotencia, este FT descubierto por su capacidad de mantener la propiedad de auto-renovación de CME incluso en ausencia de LIF [77]. Si el gen de Nanog está *knockeado*, los embriones no pueden generar un macizo celular interno pluripotente, indicando que Nanog es necesario para la adquisición de pluripotencia [78].

En particular, la regulación de la expresión del gen Nanog está regulada por múltiples vías de señalización que involucran diferentes FT, tanto activadores como represores, como OCT4, SOX2, TBX3, KLF4, ESRRB, CDX2, P53, ZFP281, GATA4 y reguladores de cromatina como JMJD2C y el complejo NuRD, entre otros [79]. OCT4 y SOX2 son responsables de la mayor parte de la regulación transcripcional positiva de Nanog en CMP, al unirse a un *enhancer* ubicado a su región promotora proximal [80]. Por otra parte, como comentaremos más adelante, se ha demostrado que existen micro

ARNs (miARNs) que regulan a Nanog a nivel post transcripcional directa o indirectamente [81], y se ha propuesto que esta regulación podría modular procesos tumorales [82].

Finalmente, si bien profundizaremos este tema más adelante, mencionamos que los TFs OCT4, SOX2 y NANOG también son regulados mediante MPTs que han sido ampliamente estudiadas y son de suma relevancia en el mantenimiento del estado pluripotente. Las MPTs en CMP, contribuyen a su alto grado de plasticidad [83]. Específicamente sobre Nanog, FT de especial interés en este trabajo, se han reportado eventos tanto de fosforilación como de ubiquitinación en múltiples residuos [84]. La mayoría de estas MPTs afectan la estabilidad de la proteína NANOG al inducir o prevenir su degradación mediada por proteasoma y fueron estudiadas tanto en el contexto de CME como de células tumorales [85]–[87]. Sin embargo, la relevancia de estas MPTs en las interacciones de NANOG con otras proteínas aún está poco explorada.

Aunque Nanog no es un oncogén clásico, ya que su sobreexpresión no es suficiente para impulsar una transformación, este TF se expresa en diversos cánceres [79], [82]. Se propuso que Nanog puede funcionar como un factor pro-tumorogénico cooperativo o potenciador, según el contexto [88].

1.2.3.2 La red extendida de FTs

Hoy en día se conoce la existencia de múltiples otros FT que también están involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia de CME, más allá del *core* de FTs mencionados anteriormente. Si bien siguen surgiendo nuevos actores con diferentes roles, FTs como Tcf3, Zfx, c-Myc, n-Myc, Klf4, Esrrb, Tcfcp2l1, E2f1, CTCF, Sall4, Dax1, Klf2, Klf4, Klf5, Nac1, Zfp281, Stat3, Tet y Tbx3, así como los co-activadores p300 y Suz12, forman varios complejos transcripcionales y juegan un papel importante en la regulación de los programas transcripcionales de CME [89]. En particular, se ha encontrado que muchos de los genes regulados por OCT4/SOX2/NANOG están co-ocupados por uno o más de estos otros FT implicados en el mantenimiento de las CME. Por lo tanto, las funciones de los FTs del *core* de pluripotencia se ve reforzadas por muchos de estos otros FT mencionados (esquemático en la Figura I. 8). Más adelante volveremos a mencionar a algunos de estos FTs.

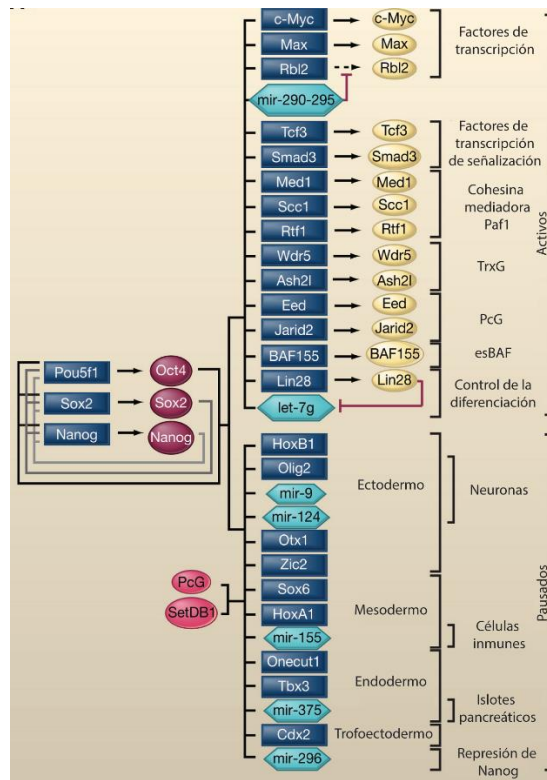


Figura I. 8. Red extendida de regulación de la expresión génica en CME. Adaptado de Richard Young [68].

1.2.4 Otros parámetros relevantes en CMP

1.2.4.1 Modificaciones epigenéticas

Las vías de señalización y las redes de FT mencionadas que regulan la expresión génica se encuentran embebidas en un complejo sistema de múltiples procesos que, en última instancia, regulan el estado pluripotente en CME [90]. En particular, el rol de la epigenética y la regulación de la cromatina en estos procesos ha tomado relevancia en las últimas décadas, con el surgimiento de nuevas tecnologías que permiten realizar análisis más profundos, robustos y a escala global.

La regulación de la expresión génica se encuentra condicionada a la organización jerárquica de la arquitectura de la cromatina en el núcleo, que modula la accesibilidad y proximidad de los genes y elementos regulatorios. Las alteraciones de la estructura de la cromatina que no afectan a la secuencia genómica, pero afectan la expresión génica, son parte de las modificaciones epigenéticas. Específicamente, entre estas modificaciones se encuentran el empaquetamiento y re-arreglo de los nucleosomas, reorganización de las estructuras de cromatina de alto orden, modificaciones en el ADN, principalmente la metilación de citosina (5-mC), diferentes MPTs de las histonas y procesos regulatorios mediados por ARNs no codificantes [91], [92] (esquemático en la Figura I. 9).

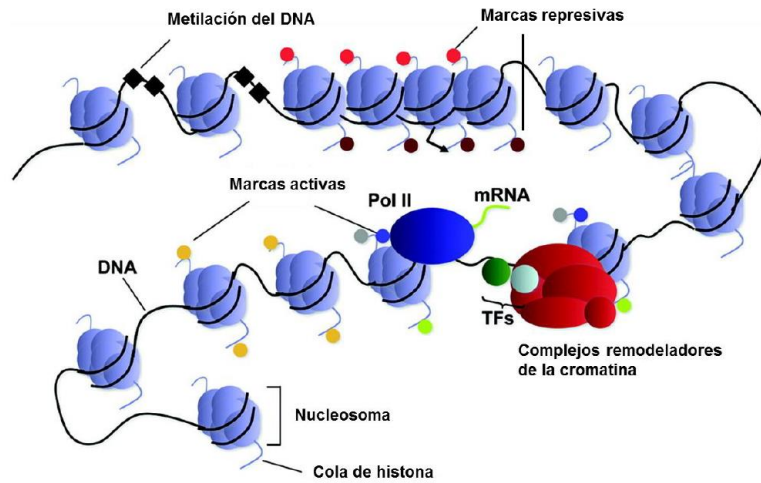


Figura I. 9. Relación entre marcas epigenéticas, accesibilidad de la cromatina y transcripción. Adaptado de [93].

El plegamiento de la cromatina es sumamente dinámico, y cambia en respuesta a diferentes factores. Si bien en este trabajo no entraremos en gran detalle en este tema, mencionamos que las CMP poseen un estado de cromatina más laxo, permisivo o “abierto”, comparado con la cromatina de células diferenciadas, lo que implica que su estructura general se encuentra menos condensada [94]. Se ha propuesto que estas características permiten la rápida ejecución de programas transcripcionales tras la inducción de la diferenciación [95].

En CME, el estado de la modificación de las histonas, a nivel global en el genoma, es diferente al de las células diferenciadas. Por ejemplo, tanto en CME de ratón y humanas se encuentran amplias regiones del genoma enriquecidas simultáneamente en marcas de cromatina activa e inactiva (H3K4me3 y H3K27me3), los cuales se conocen como dominios bivalentes, también como conocidos como regiones pausadas o *poised* [96]. Los genes cuyos sitios de inicio de transcripción se asocian con dominios bivalentes se caracterizan por un bajo nivel de transcripción. La mayoría de los dominios bivalentes están presentes en genes asociados con el desarrollo. Estas marcas, que definen un estado pausado, posibilitan la inducción rápida de estos genes cuando se induce la diferenciación [97].

Además de las modificaciones de las histonas, el ADN también se modifica, siendo la metilación de citosina uno de los mecanismos más estudiados y que está involucrado en regulación de la embriogénesis, la diferenciación celular, el *imprinting* genómico, la carcinogénesis y la inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos, entre otros [98]. Esta modificación del ADN está mediada por enzimas ADN metiltransferasas (DNMT) y está asociada, en general a zonas silenciadas a nivel transcripcional. En su conjunto, estas modificaciones juegan un papel importante, no solo en la regulación de la auto-renovación y la diferenciación de las CM, sino también durante todo el desarrollo embrionario y la vida del organismo adulto [99].

1.2.4.2 Organización dinámica de FTs e interacción con la cromatina

Para entender en profundidad la regulación de la expresión génica por los FTs, hay que analizar su dinámica de interacción con la cromatina, afectada por múltiples parámetros, entre ellos, el grado de compactación de la cromatina. Los FTs pueden interactuar con una amplia variedad de regiones de la cromatina, incluyendo diferentes tipos de regiones regulatorias [100], [101]. El plegamiento jerárquico de la cromatina en el espacio nuclear también define regiones con diferentes niveles de compactación que modulan la difusión de los FT y el proceso de interacción con sus blancos. Además, las diferentes modificaciones epigenéticas regulan localmente la accesibilidad de los TF a sus objetivos, modulando el resultado de la transcripción. En las regiones de la cromatina que están más compactadas, los TF tienen más dificultad para difundir y encontrar sus sitios *target*.

Por otra parte, en los últimos años surgió una enorme cantidad de evidencias que muestran que diversas biomoléculas particionan en compartimientos que no están delimitados por membranas, tanto en núcleo, como en el citoplasma, a los que se le atribuyen diversas funciones que impactan en importantes procesos celulares a través de diferentes mecanismos [102]. Por un lado, pueden regular la disponibilidad de biomoléculas relevantes para procesos clave, controlando así la cinética de las reacciones bioquímicas, tanto concentrando ciertos reactivos acelerando las reacciones, como también secuestrándolos, inhibiendo de esta manera, reacciones que ocurren en diferentes compartimientos [103]. También pueden actuar como reservorios, amortiguando la concentración de ciertas moléculas que, en respuesta a ciertos estímulos, se incorporan o liberan de estos condensados [104]. Particularmente, en relación con la regulación de la transcripción, se han descrito condensados de biomoléculas dentro del núcleo que incluyen diferentes FTs, componentes del complejo y otras biomoléculas relacionadas con la transcripción que se especula que pueden tener diferentes funciones. Se propuso que estos condensados contribuyen a amortiguar la cantidad de moléculas en el nucleoplasma [103]. Muy recientemente, se ha propuesto que un proceso de separación de fases líquido-líquido impulsa la formación de muchos compartimientos nucleares que pueden jugar papeles importantes en la remodelación local de la cromatina, la activación de genes e, incluso, impactando en la salida transcripcional. Previamente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que tanto OCT4 como SOX2 tienen una distribución heterogénea dentro del espacio nuclear, particionando entre el nucleoplasma y condensados dentro del núcleo en CME. Asimismo, estos FTs se reorganizan en el espacio nuclear tanto a lo largo del ciclo celular [105] como ante señales de diferenciación [106].

En conclusión, la regulación de la transcripción es un proceso dinámico que depende de múltiples capas de regulación, por lo que hoy en día, analizar únicamente la concentración nuclear de moléculas relacionadas con la transcripción no alcanza para entender en profundidad estos procesos. Como la

mayoría de los FT, los FTs de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG interactúan dinámicamente con una gran cantidad de blancos en el ADN, por lo que la combinación de parámetros como el estado de compactación de la cromatina, sus marcas epigenéticas, y la distribución y disponibilidad del FT, pueden impactar en el resultado de la transcripción. Además, como mencionaremos más adelante, la dinámica espacio-temporal de la unión de los FTs a la cromatina es un parámetro que también puede cambiar en respuesta a diversos factores y resulta fundamental en la regulación génica [103].

1.3 Cultivo de CMP

1.3.1 Mantenimiento de la pluripotencia *in vitro*

Como mencionamos anteriormente, el cultivo convencional de CME de ratón requiere en el medio de cultivo, la presencia de LIF junto con BMP4, presente en el SFB. Cuando las CME murinas se cultivan en estas condiciones, se observa que ciertos FTs del estado pluripotente como Nanog, Rex1 y Stella poseen un patrón de expresión heterogénea tanto dentro de una misma colonia como en la población celular en general en el cultivo [107]–[109]. Incluso, se ha reportado que aun aislando las CME de mayor expresión de estos FT, mediante FACS, en lugar de mantenerse una población celular con expresión homogénea, la población de células vuelve a ser heterogénea. Esto indica que en condiciones de cultivo tradicional con SFB+LIF, los procesos de transcripción de genes de pluripotencia son intrínsecamente fluctuantes y dinámicos.

Desde hace unos años, mediante la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva y caracterización a escala global de diversos parámetros, se fueron definiendo diferentes estados de pluripotencia [110]–[112]. Estos estados surgen de la caracterización simultánea de los transcriptomas, proteomas y epigenomas de CME cultivadas en diferentes condiciones, que siguen manteniendo su estado pluripotente y que son comparadas con células aisladas de diferentes estadios del desarrollo embrionario. Dependiendo de las condiciones de generación y mantenimiento en cultivo, las CMP se pueden clasificar de forma general como *naïve* o *primed*, dependiendo del estado general del epigenoma y transcriptoma, lo que está directamente asociado con su potencial y su grado de compromiso, es decir, cuan propensas a diferenciarse y cuan comprometidas están en el desarrollo embrionario. Incluso, se logró una mayor resolución en esta clasificación, incorporando nuevos grupos en estadios intermedios y más extremos. Por ejemplo, el estado de pluripotencia *naïve* más similar a células del epiblasto pre-implantatorio del blastocito, se denomina estado basal o *ground state*, mientras que aquellas CMP *primed* son más parecidas al epiblasto post-implantatorio, también llamadas EpiSCs. Estas últimas pueden ser obtenidas directamente desde un embrión post-implantatorio, como generadas a partir de CME e inducidas a diferenciarse hasta ese estado. Todos estos estados se encuentran dentro de un espectro de estados pluripotentes que va desde el estado

ground hasta la pluripotencia *primed*, entre los que las células pueden transitar de manera reversible, dentro de ciertos límites, modulando las condiciones de cultivo.

Por lo tanto, existe una gama de estados pluripotentes que, en general, son una respuesta directa a las condiciones de cultivo. Las diferencias funcionales entre estos estados y si corresponden a fases sucesivas durante la ontogenia continúan en estudio. Sin embargo, es notable que la mayoría de los estados a lo largo del espectro pluripotente *in vitro* son reversibles simplemente intercambiando los parámetros de cultivo. Por estos motivos, es crucial considerar el contexto de cultivo para obtener conclusiones relacionadas con la identidad pluripotente que se está estudiando.

En el año 2008 Ying y colaboradores, reportaron que el uso de ciertos inhibidores de quinasas permitía mantener las propiedades fundamentales de las CMP [111]. Este nuevo sistema de cultivo, denominado cultivo con dos inhibidores (2i), consta de la presencia de PD0325901 y CHIR99021. Estas moléculas inhiben a MEK y GSK3, respectivamente, interfiriendo con la activación de sus vías de señalización. Cuando el cultivo de CME se realiza en medios definidos sin SFB, pero en presencia de LIF y 2i, la expresión fluctuante de ciertos FTs se vuelve homogénea. En particular, la expresión del gen Nanog en las CME cambia a un modo de expresión bialélica, en oposición al estado de expresión monoalélica en el cultivo convencional con SFB+LIF. Con estas características únicas, las CME cultivadas con 2i se dice que se encuentran en el *ground state* de pluripotencia. Si bien hay diferencias entre algunos autores, en la actualidad está aceptado que el cultivo con el agregado de 2i, aún en presencia de SFB, mantiene a las CME en condiciones de pluripotencia *naïve*. En nuestro laboratorio utilizamos de rutina medio de cultivo con SFB+LIF+2i para el mantenimiento del estado de pluripotencia *naïve*. En este estado, no solo son capaces de diferenciarse a todos los tipos celulares embrionarios, sino que además son capaces de, potencialmente, contribuir a la formación de quimeras y a la línea germinal [111].

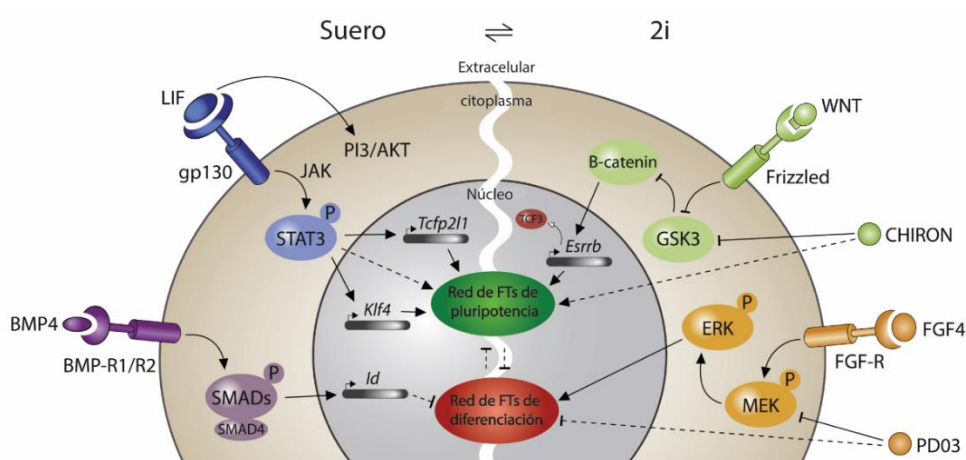


Figura I. 10. vías de señalización en el mantenimiento de la pluripotencia *in vitro*. Adaptado de Hackett et al [112].

1.3.2 Condiciones que promueven la diferenciación

Como mencionamos anteriormente, la principal característica de las CMP es su capacidad de generar células derivadas de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Esta capacidad de diferenciarse hacia todos los tipos celulares de un organismo, además de proveer un excelente modelo de investigación, genera una gran promesa en el área de la medicina regenerativa. En los últimos años se han desarrollado un gran número de protocolos y condiciones de cultivo para diferenciar CME a un amplio espectro de linajes específicos. Además, el estudio de estos procesos de diferenciación permite la generación de modelos de desarrollo embrionario y de modelos de enfermedades, tanto para el estudio de la patología como para el ensayo de fármacos, en especial con CMPI derivadas de pacientes [113].

Además de los protocolos dirigidos a tipos celulares de interés, en los laboratorios de investigación se utilizan de rutina protocolos de diferenciación no dirigidos, como detallaremos a continuación. Éstos son de suma utilidad tanto para el estudio de la salida del estado de pluripotencia *naïve*, como para la evaluación de la pluripotencia, que requiere el análisis de la capacidad de diferenciación a derivados de las tres capas germinales.

Debemos destacar que el mantenimiento de las CMP en cultivo es posible únicamente generando condiciones de cultivo que generen artificialmente el contexto molecular, incluyendo las vías de señalización y programas de expresión génica, específico de las células en una ventana temporal acotada del desarrollo. Esto determina una profunda dependencia de la presencia de ciertas moléculas específicas en el medio de cultivo de CMP. Por esta razón, la ausencia de LIF/2i desencadena la salida del estado pluripotente promoviendo un proceso de diferenciación. Este proceso se denomina “diferenciación no dirigida” debido a que, en ausencia de las moléculas que permiten el mantenimiento en estado pluripotente *naïve*, y sin la presencia de otras moléculas específicas que promuevan la diferenciación hacia un linaje o tipo celular particular, las CME pueden diferenciarse a cualquier tipo celular derivado de las tres capas germinales. En este proceso están involucrados cambios epigenéticos y en los programas transcripcionales. En particular, los niveles de expresión de los FTs de pluripotencia disminuyen en el transcurso de horas, luego de la inducción de diferenciación por ausencia de LIF/2i, verificado además en nuestro sistema experimental [114]. Sin embargo, los diferentes FT tienen una cinética específica; en particular, la expresión de Nanog disminuye rápidamente luego de pocas horas sin LIF/2i, por lo que se lo define como un FT de pluripotencia *naïve*. Contrariamente, los niveles de OCT4 y SOX2 persisten durante un tiempo más largo por lo que son considerados FT de pluripotencia generales ya que también se expresan en estado *primed* [115].

Durante las primeras 48 horas en cultivo en ausencia de LIF y 2i, se desencadenan en las células procesos que conducen a cambios morfológicos claros; las células dejan de crecer en colonias compactas en tres dimensiones con bordes refringentes comenzando a propagarse en dos dimensiones y a distanciarse entre sí, adoptando una morfología menos esférica e irregular. Mas adelante, en la sección de resultados, retomaremos este tema y mostraremos la dinámica de estos cambios.

Por otro lado, como mencionamos, es posible realizar protocolos de diferenciación dirigidos hacia un tipo celular en particular, utilizando medios definidos que contienen factores o moléculas específicos que promueven la diferenciación hacia cada linaje. En general estos factores se determinan empíricamente y son utilizados en protocolos, comparativamente muy costosos, de tiempos largos y en general poco eficientes. Por ejemplo, previamente en nuestro laboratorio utilizamos un protocolo dirigido a progenitores neurales [116], utilizando medios definidos conteniendo Vitamina A y el suplemento B27, que es una mezcla compleja de enzimas antioxidantes, proteínas, vitaminas y ácidos grasos.

Si bien hay enormes avances en el desarrollo de diferentes protocolos dirigidos, aún la eficiencia de la mayoría sigue siendo baja, por lo que es necesario continuar investigando los mecanismos moleculares que gobiernan, tanto el estado pluripotente, como los diferentes procesos de diferenciación para poder optimizar estos protocolos. Este conocimiento, junto con el desarrollo de protocolos de selección y aislamiento de células terminalmente diferenciadas, así como la identificación de estadios intermedios que permitan el mantenimiento en cultivo y expansión de progenitores de tipos celulares de interés, contribuirá a la futura aplicación de derivados de CMP en la clínica [117].

1.4 La quinasa de serinas/treoninas AKT

Si bien ya mencionamos la vía de señalización de PI3K en CME, en esta sección profundizaremos ciertos aspectos de AKT relevantes para este trabajo.

La quinasa AKT, también conocida como quinasa de proteínas B (PKB), es una quinasa de serinas/treoninas, ampliamente conservada desde organismos unicelulares como *Escherichia coli* hasta más complejos como el *Homo sapiens*, presentando un alto grado de homología en especies de mamíferos (Figura I. 11).

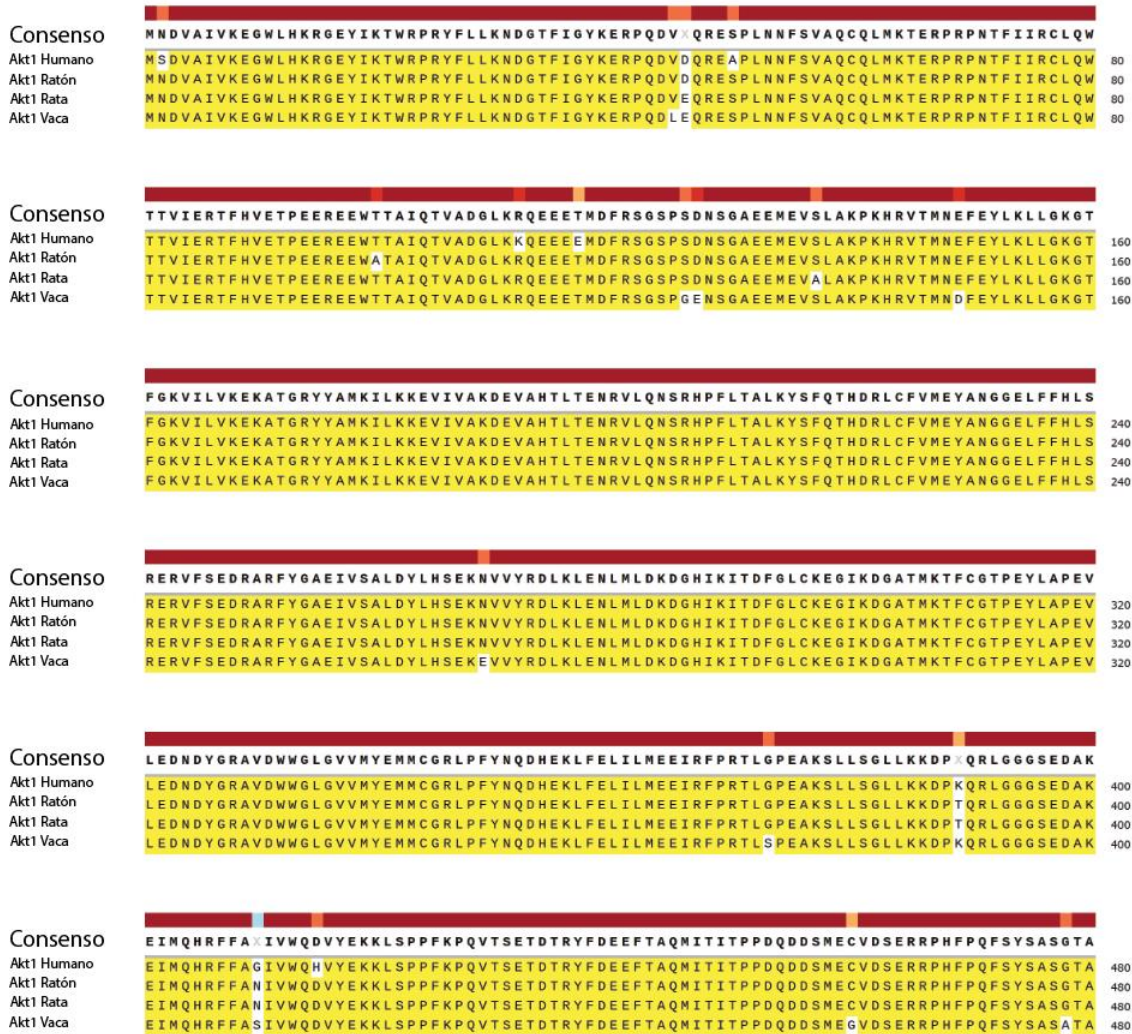


Figura I. 11. Conservación y homología de AKT1 en algunas especies de mamífero.

Como mencionamos anteriormente, esta quinasa participa en la acción de una gran variedad de estímulos, regulando así diversos procesos en diferentes tipos de células [118]. Por lo tanto, es parte esencial de una amplia red de señalización con un gran número de blancos de fosforilación (Figura I. 12). Por ejemplo, está involucrada en diversos procesos como crecimiento celular, proliferación, apoptosis, metabolismo, angiogénesis, entre otros [118]–[124]. Si bien se la conoce en profundidad desde hace mucho tiempo, esta quinasa sigue siendo foco de atención, entre otras cosas, debido a su relevancia en diversas patologías tales como múltiples tipos de cáncer, diabetes e hipertrofia cardíaca, entre otras, en las que se encuentran desreguladas vías en las que participa AKT [125]. Es relevante destacar que la vía PI3K/AKT1 es una de las más desreguladas en el cáncer humano [121]. De hecho, AKT1 está hiperfosforilada e hiperactivada en más del 50% de los tumores humanos [118], parámetros estrechamente relacionados a un mal pronóstico clínico [126]. Por ende, diferentes componentes de estas vías, entre ellos AKT, se presentan como un blanco atractivo para nuevos abordajes terapéuticos, ensayados en más de 300 ensayos clínicos [127].

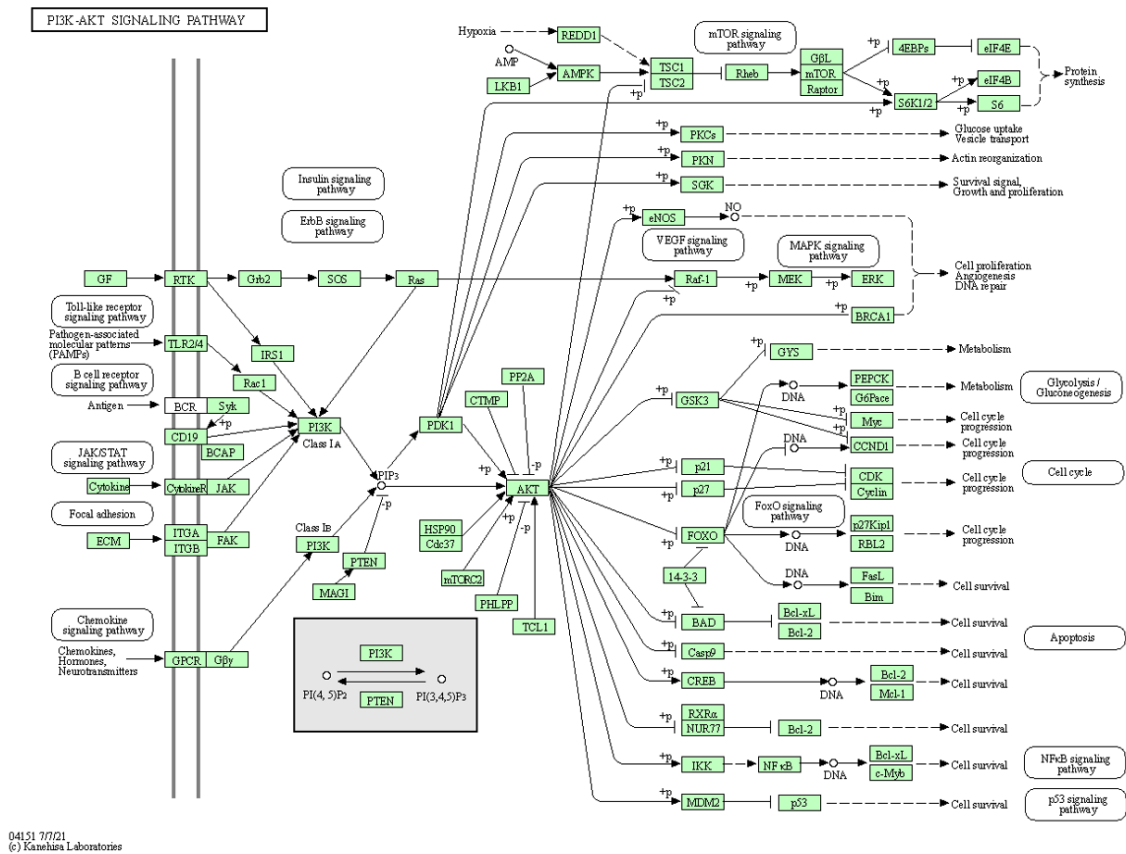


Figura I. 12. Red de señalización general de PI3K/AKT y ejemplos de proteínas blanco. Extraído de la *KEEG pathway database* (mmu04151).

En mamíferos, tres genes Akt codifican las isoenzimas AKT1, AKT2 y AKT3. Las tres isoenzimas presentan una alta identidad de secuencia y una especificidad de sustrato similar [128]. Las isoenzimas AKT comparten la misma estructura fundamental que consta de cuatro dominios distintos: un dominio de homología de pleckstrina (PH) en el extremo N-terminal, esencial para su interacción con lípidos; una región de enlace no estructurada que conecta el dominio PH con el dominio catalítico, que contiene el sitio activo de quinasa de serina/treonina específica; y un dominio C-terminal regulatorio, que a menudo se denomina motivo hidrofóbico, dominio donde se encuentra la S473, clave en la modulación de la actividad de AKT (Figura I. 13) [129].

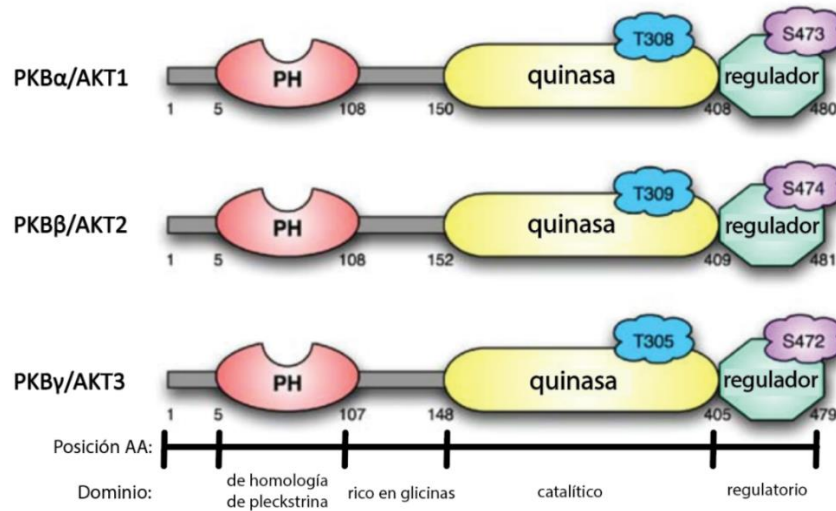


Figura I. 13. Representación esquemática de las estructuras de las isoformas de AKT. Adaptado de Elghazi et al [129].

AKT1 se expresa en todos los tejidos del organismo, mientras que AKT2 únicamente en tejidos que responden a la insulina y está involucrada en el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, AKT3 se expresa fundamentalmente en tejido nervioso y gónadas. Como mencionamos, cada isoforma está codificada por un gen diferente y si bien, existe redundancia entre blancos de fosforilación entre las tres, también se encontraron vías de señalización específicas para cada una [130].

La activación de AKT por diversos factores de crecimiento y factores de supervivencia celular como insulina, EGF, IGF-I, PDGF, entre otros, involucra, en general, el reclutamiento de esta quinasa a la membrana plasmática debido a su afinidad por el PIP3, generado por la quinasa PI3K por fosforilación de PIP2. Este proceso es promovido por la interacción de estos ligandos con su receptor transmembrana específico, similar a lo descrito para LIF. Por otro lado, ocurren dos eventos de fosforilación de AKT, uno de ellos en T308 mediado por la quinasa PDK1, que también es activada por PIP3, y el segundo en S473, por mTORC2 (Figura I. 6) [131], [132]. Una vez en estado activo, las isoformas de AKT llevan a cabo la fosforilación de múltiples proteínas blanco en diferentes compartimentos subcelulares [133]. Por otro lado, la activación es regulada negativamente por fosfatasa; PHLPP y PP2 remueven las fosforilaciones en S473 y T308 respectivamente, mientras que PTEN y SHIP1/2 remueven uno de los grupos fosfato de PIP3, produciendo PIP2 [134]. Con respecto a AKT en CME, se demostró que la expresión de una forma constitutivamente activa de AKT1 (AKT1 Myr), puede mantener un fenotipo no diferenciado, incluso en ausencia de LIF [135]. Experimentos similares se realizaron en CME de diferentes especies de mamíferos, como ratones, humanos y primates, indicando que la activación de AKT1 es importante para el mantenimiento de la pluripotencia en todos estos sistemas [136], [137]. Por el contrario, la eliminación de Akt1 provoca la pérdida de la auto-renovación en CME [138], [139].

1.4.1 Modificaciones post-traduccionales de AKT

A pesar de todo lo que se conoce sobre la regulación de la actividad de AKT1 mediante fosforilación desde hace mucho tiempo, la influencia de otras MPTs sobre la actividad de AKT comenzó a conocerse más recientemente [140].

Como mencionamos anteriormente, la activación de AKT1 es un proceso de varios pasos que implica una serie de eventos finamente regulados de translocación celular y diversas MPTs [118]. Entre estas MPTs, como mencionamos, las fosforilaciones descritas han sido las más estudiadas desde finales del siglo pasado. Con respecto a otras MPTs sobre AKT, se han reportado diversas fosforilaciones de serinas/treoninas, como así también otras MPTs, entre ellas metilación, ubiquitinación, hidroxilación de prolina, acetilación, S-palmitoilación y, de especial interés para este trabajo, SUMOilación (Figura I. 14), que pueden modificar la actividad de esta quinasa [140], [141]. Si todas las MPT de AKT reportadas fueran de ocurrencia independiente, el número de diferentes estados potencialmente posibles de AKT sería mayor a cien millones [141].

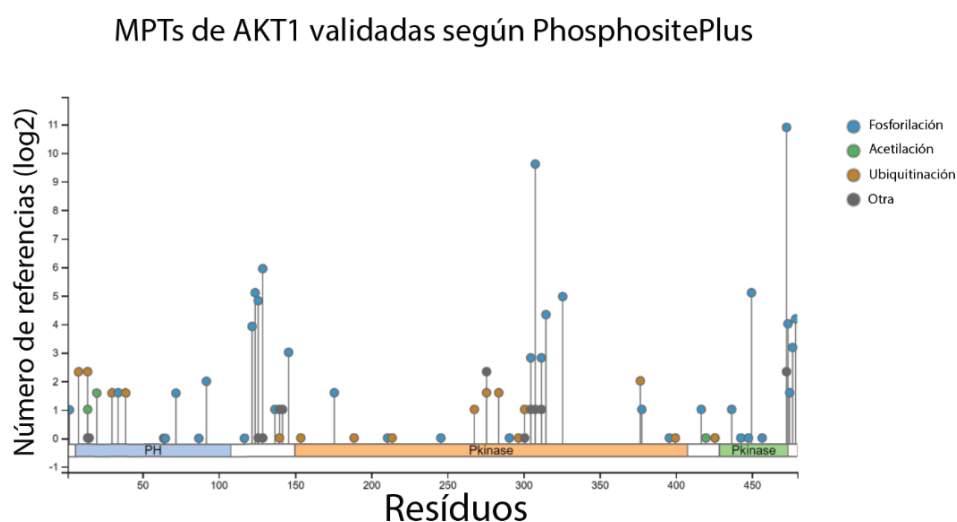


Figura I. 14. Modificaciones post-traduccionales validadas sobre los residuos de la proteína AKT1, consultados en la base de datos *PhosphoSitePlus*.

En particular, con respecto a esta última observación, se ha demostrado que las dos fosforilaciones previamente mencionadas, involucradas en los primeros eventos de activación de AKT1 (S473 y T308), además otorgan diferente selectividad a sus más de 150 sustratos clásicos [142]. Por ejemplo, GATA1 solo es fosforilada por AKT1 cuando ésta se encuentra fosforilada en la T308 (T308-p), ya sea en conjunto con S473-p o sola, mientras que FOXO4 solo es fosforilada por AKT1 en S262 cuando AKT posee la T308-p o la S473-p, pero no ambas (Figura I. 15). Una interpretación interesante de estas observaciones es que la fosforilación de diferentes sustratos, requieren umbrales de actividad AKT distintos [118].

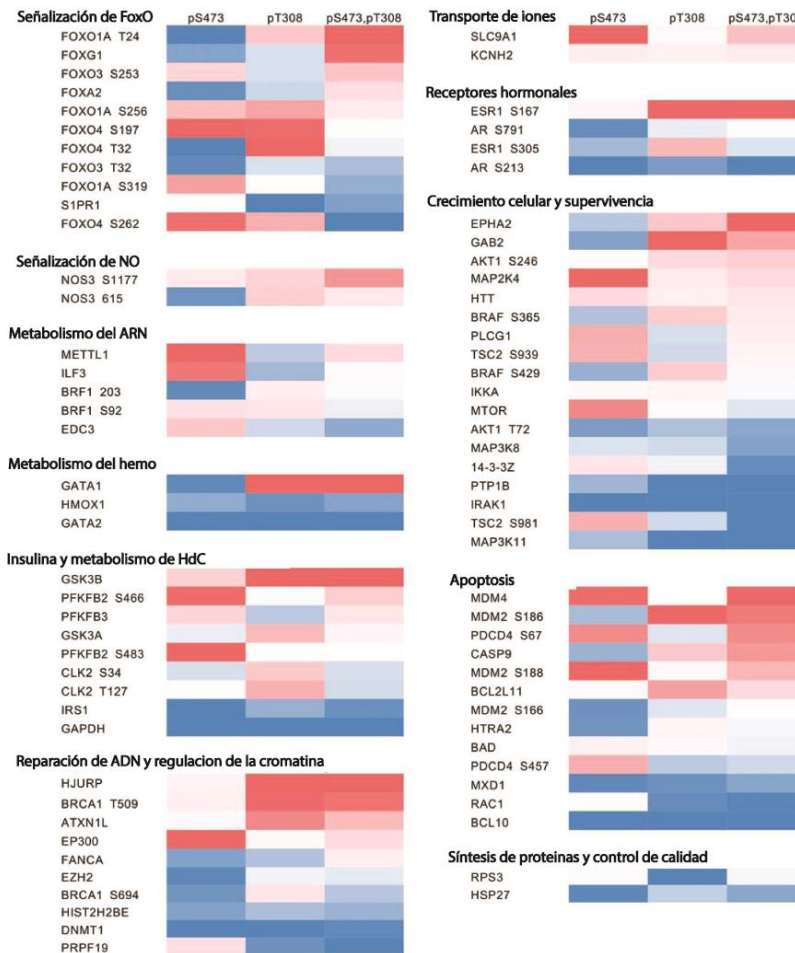


Figura I. 15. Heatmap representando los niveles de fosforilación de proteínas blanco de AKT, según estado de fosforilación de los residuos S473 y T308 de AKT1. Adaptado de Balasuriya et al [142]. Los diferentes colores corresponden a la actividad de AKT relativa: alta (rojo), media (blanco) y baja (azul).

Esto demuestra la relevancia de las MPTs sobre la actividad de esta quinasa, abriendo la puerta a un sinfín de combinaciones de las distintas MPTs que pueden estar ocurriendo en un momento dado de la vida de una célula, modificando el comportamiento de AKT y promoviendo la interacción y fosforilación de diferentes sustratos. Por otra parte, destacamos que AKT no solo actúa sobre sustratos presentes en la membrana plasmática, citoplasma y núcleo, sino que también se la ha encontrado asociada a otros compartimentos subcelulares como mitocondrias, retículo endoplásmico (ER) y lisosomas [143], [144]. Por lo tanto, el conjunto de MPTs sobre AKT1 no solo podría definir su actividad y afinidad por sus blancos, sino también su localización, impactando a otro nivel más en su función, tema que sigue siendo objeto de estudio.

Retomando particularmente la MPT foco de este trabajo, en el año 2013 en un estudio proteómico, se identificó a AKT como un posible sustrato de conjugación al grupo SUMO (en inglés: *Small Ubiquitin-Related Modifier*) [145]. Posteriormente, esto fue validado experimentalmente por varios grupos casi de manera simultánea [123], [146], [147]. La SUMOilación juega un papel importante en la regulación y función de un gran número de proteínas, y la desregulación de esta vía

ha sido asociada con ciertas enfermedades, incluyendo cáncer [148]. Esta MPT, además de impactar directamente en la actividad y función de gran cantidad de proteínas, también afecta la localización y acumulación nuclear de algunas [149] y en consecuencia, modula la disponibilidad para la interacción con diferentes biomoléculas [150].

Hasta el momento, hay pocos trabajos sobre la relevancia de la SUMOilación de AKT en la función de esta quinasa. En estos se demuestra que esta MPT de AKT1 afecta diversos procesos celulares como la supervivencia, la proliferación y el potencial oncogénico de líneas celulares [123], [146], [147], [151]. Sin embargo, hasta el comienzo de este trabajo de tesis doctoral, el rol de esta modificación de AKT1 en CME todavía no había sido reportado.

1.5 La SUMOilación

La conjugación a SUMO es una MPT transitoria y reversible que consiste en la adición covalente de esta pequeña proteína a la proteína blanco a través de un enlace isopeptídico [152]. El grupo SUMO es una pequeña cadena polipeptídica, muy similar a la ubiquitina. Tiene aproximadamente 100 aminoácidos y un peso molecular de 12 kDa. Este grupo es unido a los residuos lisina de la secuencia consenso de SUMOilación en las diferentes proteínas blanco a través de una cascada enzimática de tres etapas que requiere la acción secuencial de una enzima activadora (E1), una enzima conjugadora (E2) y una SUMO ligasa (E3) [153].

La SUMOilación regula diferentes procesos celulares como la transcripción, la localización subcelular, la estabilidad, la interacción proteína-proteína y la interacción proteína-ADN, y juega un papel esencial en diferentes funciones biológicas, incluyendo el crecimiento celular, la respuesta al estrés, la migración celular y la reparación del ADN [154]. La desregulación de la SUMOilación se asocia con diferentes patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardíacas, enfermedades infecciosas y cáncer [155]. Tal es así, que se ha propuesto interferir con la vía de SUMOilación de proteínas como estrategia terapéutica en algunas patologías [156]–[158].

Los mamíferos expresan 5 isoformas de SUMO; SUMO1 a 5. SUMO4 y SUMO5 solo se expresan en tejidos específicos, y su relevancia fisiológica aún no está clara. SUMO2 y 3 comparten un 95% de identidad y se denominan SUMO2/3. Éstos comparten alrededor del 45% de identidad con SUMO1. SUMO1 y SUMO2/3 difieren en su capacidad para formar cadenas “poli-SUMO”, es decir, formar cadenas de donde los grupos SUMO se SUMOilan. Mientras que SUMO2/3 puede formar cadenas poliméricas, SUMO1 no puede hacerlo y solo puede actuar como modificador único o terminador de cadena [159].

Las proteínas SUMO se sintetizan como precursores inmaduros que requieren el clivaje de un dipéptido diglicina en el C-terminal por una proteasa específica de sentrina (SENP) para generar la forma madura (Figura I. 16A,B). El SUMO maduro se activa formando un enlace tioester con la enzima E1 de manera dependiente de ATP. SUMO se transfiere luego de E1 a la cisteína catalítica de la enzima SUMO E2 (Ubc9), en otro enlace tioester, generando el complejo E2-SUMO. Posteriormente, la enzima Ubc9 cataliza la formación de un enlace isopeptídico entre el C-terminal del péptido SUMO y el amino ϵ de una lisina específica de la proteína blanco (Figura I. 16A,C). Este proceso es facilitado por las SUMO ligasas E3, que también otorgan especificidad a las proteínas blanco [160].

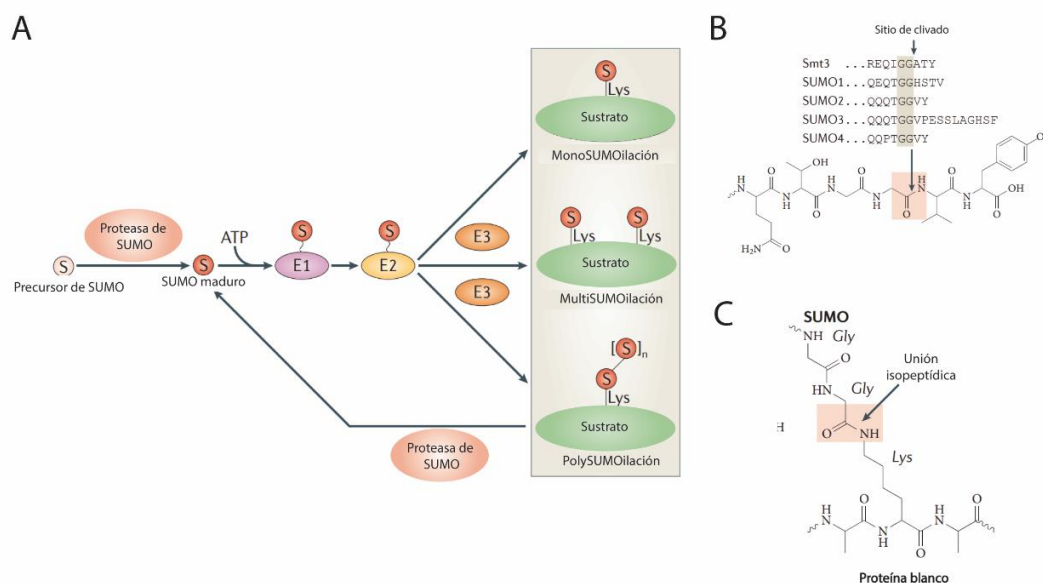


Figura I. 16. Características de la conjugación a SUMO. Adaptado de Hickey et al [160].

Diferentes factores pueden contribuir a la especificidad del sustrato en la vía de SUMO, incluyendo la regulación espacial, temporal y la especificidad las SUMO ligasas E3. Hasta ahora, solo se han reportado unas pocas SUMO ligasas E3, incluyendo miembros de la familia de la proteína inhibidora de STAT (PIAS), PC2, la ligante dual E3 de ubiquitina y SUMO1 TOPORS, entre otros [152]. Las ligasas E3 pueden estar involucradas en múltiples procesos celulares y no solo en el proceso de SUMOilación, como por ejemplo la desacetilasa de histonas HDAC4, la cual posee función a nivel epigenético [161]. Por otro lado, la reversibilidad de la conjugación a SUMO ocurre a través de las peptidasas/isopeptidasas SENPs que producen la desconjugación de grupos SUMO unidos a sus sustratos. Existen diferentes SENPs que se diferencian en su localización subcelular [62,63].

Entre los numerosos sustratos de SUMOilación que se han identificado, hay varios componentes de la vía PI3K/AKT. Por ejemplo, se ha reportado que las subunidades p85 y p110 de la PI3K son susceptibles a la SUMOilación, como así también el regulador PTEN, AKT1 y diversos factores rio abajo en esta vía, muchos de los cuales son blancos de AKT [162].

1.5.1 SUMOilación de AKT

Los primeros reportes sobre la SUMOilación de AKT cumplieron su primera década, y desde entonces muy poco se ha profundizado sobre los efectos de esta MPT en la función de esta quinasa. En el año 2013, Merbl y colaboradores, en un estudio proteómico a gran escala, no enfocado específicamente en AKT, identificaron que las tres isoformas de esta quinasa eran susceptibles a ser SUMOiladas [145]. En el transcurso del mismo año, los grupos de la Dra. Anabella Srebrow [123] y el Dr. Ping Wang [147] publicaron casi de manera simultánea dos trabajos en los que demostraron que AKT1 era SUMOilada y que esto impactaba en su función. Estos grupos generaron mutaciones en diversos residuos lisina probables de ser blanco de esta MPT según la secuencia consenso de SUMOilación en la que se encuentran inmersas y verificaron la susceptibilidad a la SUMOilación (“SUMOilabilidad”) de estas mutantes. Luego de ensayos de SUMOilación tanto *in vitro* como *in vivo* de las diferentes mutantes de AKT1, en conjunto, se demostró que las lisinas K30, K64, K182, K111, K182, K189, K276 y K301 son SUMOilables. Sin embargo, ambos grupos coincidieron que la K276, ubicada dentro del dominio quinasa de AKT1, es el principal sitio aceptor de SUMO. Dos años más tarde, en 2015, el grupo de la Dra. Carmen Rivas también publicó un trabajo llegando a conclusiones similares con respecto a los sitios de SUMOilación de AKT1 [146]. Además, describieron que la SUMOilación de AKT es facilitada por la ligasa E3 de SUMO PIAS1, mientras que es sensible a SENP1 y SENP2.

Utilizando las diferentes mutantes deficientes en SUMOilación, estos grupos, estudiaron los efectos de esta MPT tanto sobre la actividad y fosforilación de AKT1, como también sobre diferentes procesos celulares y como éstos dependían de la SUMOilabilidad de esta quinasa. En conjunto, todos los autores encontraron que la SUMOilación promueve la activación de AKT1, promoviendo así la proliferación celular, la tumorigénesis y la supervivencia celular, entre otros procesos [120], [123], [146]. Sin embargo, sus efectos en CME no habían sido estudiado hasta el momento.

Dado que la actividad de AKT posee una relación estrecha con la fosforilación de sus residuos clave, se preguntaron si existía una conexión entre la SUMOilación a estos eventos de fosforilación, que sea responsable del efecto de la SUMOilación sobre la modulación de la actividad de esta quinasa. Diferentes trabajos sugirieron que la SUMOilación de AKT y su fosforilación parecen ser eventos independientes [120], [123], [146]; sin embargo, todos los autores coinciden que la SUMOilación promueve la actividad quinasa de AKT.

La SUMOilación regula diversas funciones de AKT. Por ejemplo, Risso y colaboradores, encontraron que la SUMOilación de AKT1 modifica el patrón de *splicing* alternativo, la proliferación y

el ciclo celular en células de riñón embrionario humano [123]. Respecto al cambio en el patrón de *splicing*, esta MPT favorece la inclusión del exón que determina que aumente la relación de la isoforma Bcl-xL respecto a Bcl-x el gen Bcl-x, clave en el proceso de apoptosis y, además, promueve la inclusión de un exón particular denominado exón A en el ARNm de Fibronectina [123]. Este hallazgo nos resultó de particular relevancia porque, varios años antes, nuestro grupo había encontrado que la isoforma de Fibronectina que incluye dicho exón incrementa la tasa de proliferación de CME [163].

Por otro lado, AKT también ejerce un efecto regulador sobre la vía de SUMOilación [151]. AKT fosforila directamente a Ubc9 en T35 y SUMO1 en T76 y estas modificaciones promueven la formación del enlace tioester de Ubc9 y la estabilización de SUMO1, respectivamente, induciendo la propia SUMOilación de AKT, y la de otros sustratos como la misma Ubc9, STAT1, CREB y PTEN. La inducción de la SUMOilación de PTEN por AKT se ha propuesto como un mecanismo para detener el bucle de retroalimentación positiva resultante de la activación de AKT.

Tal es la importancia emergente de esta MPT sobre AKT, que incluso ha sido propuesta como posible blanco terapéutico prometedor, ya que se ha visto que la enzima activadora de SUMO SAE1 promueve la progresión del glioma humano al aumentar la SUMOilación de AKT [164].

A partir de los antecedentes descritos en esta sección, en especial sobre la importancia de AKT1 en el contexto pluripotente, y considerando la significativa influencia de la SUMOilación en la función de esta quinasa, postulamos que la SUMOilación de AKT podría desempeñar un papel relevante en el mantenimiento del estado pluripotente en células madre embrionarias. En este trabajo de Tesis exploramos el papel de la SUMOilación de AKT en diferentes procesos relevantes para el estado pluripotente.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Si bien se conocen con gran detalle los mecanismos moleculares que regulan el estado pluripotente en células madre, aún quedan interrogantes por dilucidar.

Dada la importancia de la vía de señalización de la quinasa AKT1 en diversos procesos celulares, y particularmente, en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de CME; y por otro lado, el impacto de la SUMOilación en la función de distintas proteínas, incluyendo AKT, especulamos que la SUMOilación de AKT1 podría tener un rol en distintos procesos relevantes en CME.

Consecuentemente, proponemos la siguiente **hipótesis**:

AKT1 afecta, de manera dependiente de su SUMOilación, diferentes procesos relevantes para el mantenimiento del estado pluripotente en células madre embrionarias.

En este marco, el **objetivo general** de este trabajo es estudiar los efectos de AKT1 y la dependencia de su SUMOilación sobre procesos relevantes para la pluripotencia en células madre embrionarias.

Como **objetivos específicos** de esta Tesis, nos propusimos estudiar los efectos de la SUMOilación de AKT1 y de la mutación E17K sobre:

- I. La distribución subcelular de AKT1.
- II. La expresión de Nanog, uno los FTs de la red principal de pluripotencia.
 - a. Regulación a nivel del promotor, ARNm y proteína.
 - b. Estudio del mecanismo molecular subyacente y análisis del efecto en diferentes contextos celulares.
- III. Parámetros que modulan la expresión génica.
 - a. Organización general de la cromatina mediante el análisis de distribución de HP1 α .
 - b. Distribución subnuclear de los FTs de pluripotencia OCT4 y SOX2.
 - c. Dinámica de interacción con la cromatina de OCT4, SOX2 y NANOG.

3 RESULTADOS

3.1 Capítulo 1

Regulación de la expresión del factor de pluripotencia Nanog por AKT1 y dependencia de su SUMOilación

Como mencionamos anteriormente, AKT/PKB es una quinasa de serinas y treonina conocida por mediar la acción de una amplia variedad de estímulos, regulando así una gran cantidad de procesos en diferentes tipos de células [118]. En particular, AKT juega un papel central en el mantenimiento de las células madre pluripotentes (CMP) de mamífero [135], [136]. Estas células tienen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente y de diferenciarse a todos los tipos de células derivadas de las tres capas germinales [25], [165], constituyendo un excelente sistema para la investigación en biología del desarrollo, el modelado de enfermedades y evaluación de fármacos, entre otras aplicaciones [5]. Estas capacidades se mantienen principalmente por los factores de transcripción (FTs) de pluripotencia Nanog, Oct4 y Sox2, que juntos constituyen la red principal de pluripotencia que induce la expresión de genes cruciales del estado pluripotente e inhibe aquellos que promueven la diferenciación celular [166], [167].

La activación de AKT se produce como consecuencia de su fosforilación por PDK1 y mTORC2 para lo cual es crucial su reclutamiento a la membrana plasmática [131], [132]. Posteriormente, la actividad y especificidad de AKT se regulan finamente por múltiples modificaciones post-traduccionales (MPTs) [140], [168] incluyendo la conjugación al péptido SUMO (en inglés: Small Ubiquitin-Related Modifier) conocida como SUMOilación [162]. Esta MPT requiere un proceso de activación del grupo SUMO que involucra diferentes enzimas específicas, seguida de su ligación a residuos lisina de la proteína blanco, mediada por la enzima SUMO conjugasa UBC9 [154]. La SUMOilación juega un papel importante en la regulación y función de un gran número de proteínas, y la desregulación de esta vía ha sido asociada con ciertas enfermedades, incluyendo cáncer [148]. Esta MPT, además de impactar directamente en la actividad y función, también afecta la localización y acumulación nuclear de algunas proteínas [148], [149] y en consecuencia, modula la disponibilidad para la interacción con diferentes biomoléculas [150].

La SUMOilación de AKT1 afecta diversos procesos celulares como la supervivencia, la proliferación y el potencial oncogénico de líneas celulares [123], [146], [147], [151]. Sin embargo, el rol de esta modificación de AKT1 aún no había sido estudiada en células madre embrionarias (CME).

Dado que AKT1 induce la expresión del factor de transcripción fundamental de pluripotencia Nanog [136], [169], [170] y que la SUMOilación de esta quinasa afecta su actividad en diferentes

contextos, nos preguntamos si esta MPT afecta la regulación de la expresión de Nanog ejercida por AKT1 en CME.

Por lo tanto, en este capítulo nos centramos en los efectos de esta MPT de AKT1 sobre la regulación del factor de transcripción fundamental de pluripotencia Nanog.

3.1.0 Modelo experimental

Con el objetivo de estudiar el efecto de la SUMOilación de AKT1 en el contexto de pluripotencia, utilizamos vectores de expresión de distintas variantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas, gentilmente cedidos por el grupo de la Dra. Srebrow (IFYBINE, CONICET-UBA). Estas variantes se encuentran clonadas en el vector pcDNA6 y marcadas con la etiqueta de hemaglutinina de gripe humana (HA) en su cadena polipeptídica. Por otro lado, además contamos con el plásmido pcDNA6 el cual usamos como control basal en la mayoría de nuestros experimentos. Si bien iremos profundizando sobre los detalles de estas variantes a lo largo de la tesis, como breve introducción, contamos con la variante salvaje (*wild type*) de AKT1 (AKT1 wt) que posee capacidad “normal” de ser SUMOilada [123]. Además, contamos con una variante que posee dos de los sitios blanco de conjugación al grupo SUMO, las lisinas 276 y 301 (K276/301R), reemplazadas por argininas y por lo tanto presenta SUMOilación disminuida, denominada AKT1 2KR [123]. Por otro lado, contamos con la mutante AKT1 E17K que posee una sustitución del ácido glutámico 17 por una lisina (E17K). Esta sustitución, descubierta en diferentes tipos de tumores de mamíferos [171], aumenta la interacción de AKT1 con la membrana plasmática, en principio promoviendo una mayor activación y actividad de esta quinasa [171], [172]. A su vez, el nivel de SUMOilación en esta mutante se encuentra aumentado considerablemente [123]. Finalmente, contamos además con la contraparte de esta mutante oncogénica, pero con las lisinas blanco de SUMOilación mutadas; la variante AKT1 E17K/2KR combina las mutaciones E17K y las 2KR, por lo tanto, aun teniendo la mutación asociada a una mayor SUMOilación, la sustitución en las lisinas produce una variante con SUMOilación disminuida [123]. A su vez, esta mutación en las lisinas también produce la pérdida de efectos río abajo de la mutante E17K [123]. Si bien en algunos experimentos de esta tesis incluimos variantes de AKT1 adicionales que discutiremos en su momento, estas cuatro son las herramientas principales de nuestros estudios y se encuentran esquematizadas en la Figura R. 1A.

En células de la línea W4, que corresponde a una línea establecida de CME a partir de blastocistos de ratón [173], realizamos la transfección de cada variante de AKT1, utilizando el agente de transfección Polietilenimina (PEI). Como se observa en la inmunofluorescencia (IF) de la Figura R. 1B todas las variantes se transfectan en igual proporción. Asimismo, el western blot (WB) de la Figura R.

1C muestra que los niveles de expresión son similares. En conjunto, estos controles demuestran que las cuatro variantes de AKT utilizadas se expresan en nuestro sistema correctamente y de manera homogénea en las condiciones de trabajo. En ambos casos, la visualización de la expresión de las variantes fue a través de un anticuerpo anti-HA. La correcta y homogénea expresión de todas las variantes es una variable fundamental en los experimentos que mostraremos en esta primera etapa. Por este motivo, tanto la integridad de los vectores plasmídicos utilizados, como su concentración, han sido examinadas a lo largo de estos estudios con el objetivo de tener control sobre la masa de ADN transfectada.

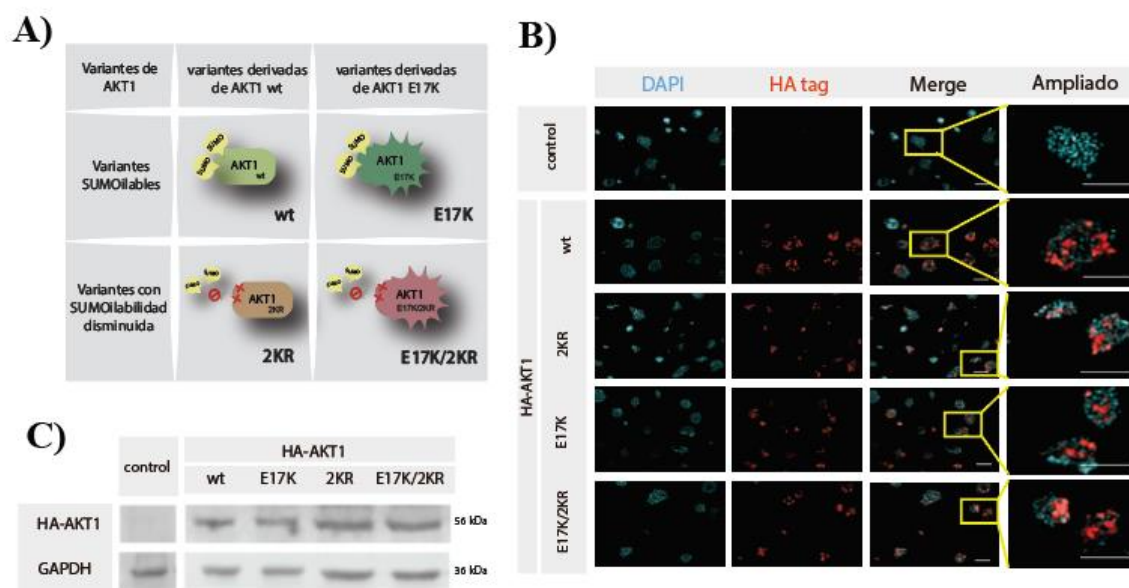


Figura R. 1. Expresión de las variantes de AKT1 en CME. A) Representación esquemática de las principales variantes de AKT1 utilizadas. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en microscopía widefield de células W4 transfectadas con las distintas variantes de HA-AKT1. Las variantes de HA-AKT1 transfectadas fueron visualizadas mediante IF con anticuerpo específico contra el tag HA (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (cian). Barra de escala: 100 μ m. C) Western blot correspondiente a extractos de proteínas totales de CME transfectadas con las distintas variantes de HA-AKT1 o con el vector vacío (control). Se detectó la expresión de las variantes con un anticuerpo específico contra el tag HA y se utilizó un anticuerpo contra GAPDH para detectar esta proteína como control de carga. Adaptado de Francia, et al [174].

Cabe mencionar, que nuestro sistema de estudio se caracteriza por ser un tipo celular con muy baja eficiencia de transfección. Por ejemplo, con agentes de transfección habituales como el PEI, se obtiene una eficiencia de transfección de 5-15%, que para algunos abordajes experimentales, como en aquello en los que se utilizan sistemas reporteros puede resultar suficiente, pero no para otros, por ejemplo en los que las células sin transfectar pueden llegar a enmascarar resultados. A lo largo de este trabajo iremos discutiendo estas limitaciones.

En este punto, debemos comentar que somos conscientes de que hubiese sido óptimo poder analizar el estado de SUMOilación de las variantes de AKT1 usadas en nuestro sistema experimental, por lo que intentamos realizar dicha determinación. Este abordaje involucra la transfección de cada

una de las diferentes variantes junto con un vector codificante para la enzima conjugadora de SUMO y el grupo SUMO conteniendo un tag de histidinas. A continuación, a partir de lisados de células transfectadas se purifica la fracción SUMOilada de cada variante de AKT transfectada en las células, mediante una columna de níquel con afinidad por el tag de histidinas y finalmente, se cuantifica dicha fracción mediante WB, utilizando un anticuerpo que reconoce el tag HA, que como mencionamos, está presente en las construcciones de las diferentes variantes de AKT. Este abordaje experimental requiere una gran masa de proteínas proveniente de las células transfectadas con diferentes vectores en simultáneo. La baja eficiencia de transfección de nuestro sistema combinado con el alto costo del medio de cultivo y agentes de transfección que no nos permitieron escalar el sistema, determinaron que nos resulte imposible obtener la masa de proteínas necesaria para realizar dicha determinación. Mencionamos que realizamos varios intentos en colaboración con el Lic. Laureano Bragado, del grupo de la Dra. Anabella Srebrow, especialistas en esta metodología. De todos modos, los diferentes resultados que fuimos obteniendo producto de diferentes abordajes experimentales, nos permiten confiar en el correcto funcionamiento del sistema experimental, como iremos discutiendo a lo largo de este trabajo.

Por lo tanto, una vez comprobada la correcta expresión de todas las variantes en nuestro sistema, decidimos estudiar si la SUMOilación afecta la distribución de AKT. Se sabe que AKT1 puede ser encontrada tanto en la membrana plasmática, como en el citoplasma, el núcleo, e incluso asociada al citoesqueleto, dependiendo el tipo y contexto celular. Hasta la fecha, no existían reportes de la distribución subcelular de todas estas variantes, y no había estudios previos de ninguna de ellas en CME. Sin embargo, se ha reportado que la variante AKT1 E17K se localiza preferentemente en la membrana plasmática en otro tipo de células [175], pero, hasta este momento, no existían reportes sobre el posible efecto de la SUMOilación en la distribución de esta quinasa.

Para el estudio de la distribución de las variantes de AKT1 en CME, utilizamos el abordaje experimental esquematizado en la Figura R. 2A. Realizamos la transfección de CME con las distintas variantes de AKT1. Luego de 48 horas las células fueron fijadas, se les realizó la marcación con el anticuerpo anti-HA y se tomaron imágenes de microscopia confocal. En la Figura R. 2B se muestran imágenes representativas de la distribución de las distintas variantes de AKT1 en escala de grises y en una LUT (por *look up table*, en inglés) que facilita la visualización de la intensidad de la señal. Cualitativamente, observamos que las variantes AKT1 wt y su contraparte con SUMOilación disminuida AKT1 2KR presentan una distribución ubicua y similar. Por otro lado, las variantes AKT1 E17K y su contraparte de menor SUMOilabilidad AKT1 E17K/2KR, parecen tener una localización preferencial por el borde celular. Como mencionamos anteriormente, si bien existe bibliografía que muestra la traslocación a la membrana de la variante AKT1 E17K, no existía reporte de este comportamiento en CME. Con respecto a la AKT1 E17K/2KR, hasta la fecha no se conocía que la misma

presentase la misma localización que la E17K. Ante estas observaciones, realizamos un análisis formal cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de la marcación tanto en el borde como en el interior celular. Si bien en estos análisis no fue incluido un marcador de membrana, se consideró una franja de 250 nm del borde de las células como aproximación a la región correspondiente a la membrana plasmática. En la Figura R. 2B se muestra la intensidad de fluorescencia promedio del borde de la célula relativizada a la intensidad de fluorescencia promedio del interior de cada célula. En el caso en que esta relación borde/interior es igual a 1, no hay diferencias entre estas dos regiones de la célula, mientras que, si la relación es mayor o menor, eso indica un mayor o menos reclutamiento de AKT1 en el borde celular, respectivamente. Se determinó que en las variantes AKT1 wt y 2KR, tal como fue observado cualitativamente, la relación borde/interior es cercana a 1, no presentando diferencias significativas entre estas dos regiones de la célula, ni tampoco presentando diferencias significativas entre estas variantes. Por otro lado, con respecto a las mutantes AKT1 E17K y E17K/2KR, se observa que la intensidad de la señal es significativamente mayor en el borde celular con respecto al interior de la célula, no presentando diferencias significativas entre ambas, pero sí con las variantes anteriores. Estos resultados indican por un lado que la mutación E17K presente en estas variantes produce una mayor acumulación de la quinasa en la membrana con respecto a las variantes que no la poseen; por otra parte, integrando los resultados obtenidos con las cuatro variantes, concluimos que la SUMOilabilidad no impacta en la proporción de AKT1 en la membrana. Por último, en la Figura R. 2C se muestra la fracción relativa de células que poseen su relación borde/interior mayor o menor a 1 ($FR > 1$ o $FR < 1$, respectivamente). Los resultados indican que la mayor parte de las células transfectadas con cada variante presenta la distribución mostrada en el gráfico anterior, y por lo tanto los promedios anteriores son representativos de la población de cada variante en general.

Debemos recordar que estos resultados provienen de observaciones en células fijadas, dado que la identificación de la variante de AKT transfectada es realizada mediante IF. Como mencionaremos más adelante, el proceso de fijación puede alterar diferentes parámetros celulares, afectando la distribución de las biomoléculas, por lo que complementaremos más adelante este análisis con otros abordajes experimentales (sección 3.2).

Estos análisis iniciales, que corresponden al estudio de la presencia de AKT1 en la membrana de CME, fueron el puntapié inicial, para que, a partir de otras herramientas que serán presentadas más adelante en esta tesis, podamos profundizar en el estudio de la distribución de AKT1 y su dependencia con la SUMOilación, no solo en la membrana, sino en otros compartimentos celulares.

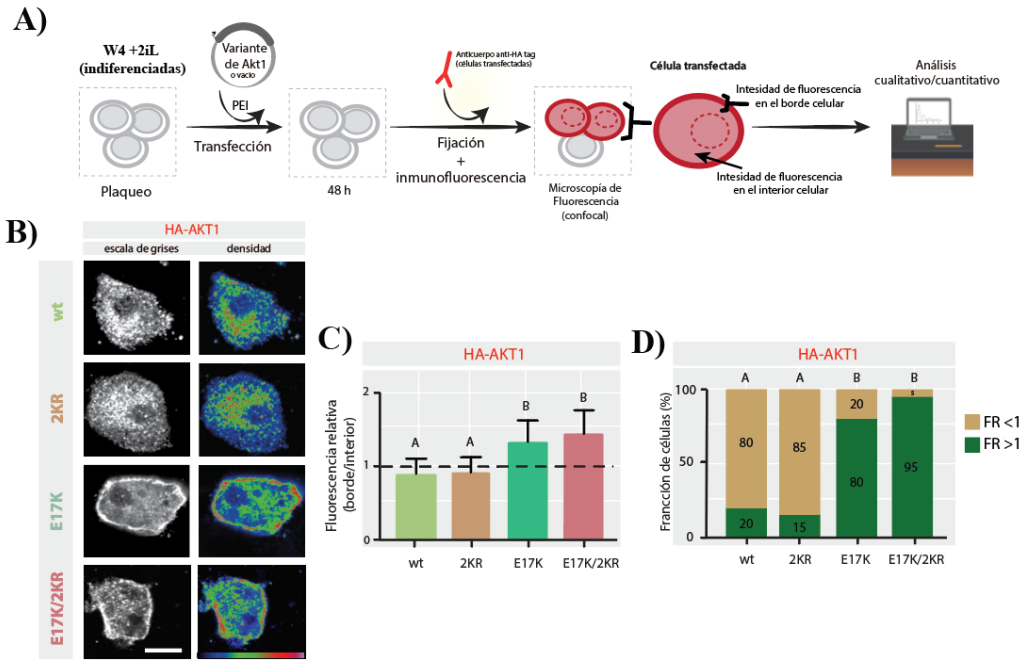


Figura R. 2. La localización subcelular de AKT1 no depende de su SUMOilabilidad. A) Esquema experimental empleado para el análisis de distribución subcelular de las variantes de AKT1. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en microscopía confocal de células W4 transfectadas con las distintas variantes de HA-AKT1. Las células transfectadas y la distribución de AKT1 fueron visualizadas mediante anticuerpo específico contra el tag HA. C) Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de AKT1 en el borde y en el interior celular. Se muestra la intensidad de fluorescencia media del borde relativizado a la intensidad media del interior de las células transfectadas con las distintas variantes de HA-AKT1. Los resultados se muestran como media \pm EE para cada condición. D) Análisis de la fracción (%) de población de células transfectadas en función de su fluorescencia relativa (FR). En todos los casos, letras distintas denotan diferencias significativas entre las variantes de AKT1 ($p < 0.05$). Barra de escala: 5 μ m. Adaptado de Francia, et al [174].

3.1.1 Parte I

Efecto de AKT1 sobre la expresión de Nanog

3.1.1.1 AKT1 induce la actividad del promotor Nanog de manera dependiente de la SUMOilación en células madre embrionarias de ratón

Como mencionamos anteriormente, AKT es clave para el mantenimiento del estado pluripotente en CME, y particularmente induce la expresión de Nanog [136], [169], [170]. En el presente capítulo comenzaremos con el estudio del impacto de la SUMOilación de AKT1 en CME, haciendo foco sobre la regulación de este FT fundamental del *core* de pluripotencia.

Con el objetivo de evaluar el rol de la SUMOilación de AKT1 en la regulación de Nanog en el contexto de pluripotencia, comenzamos estudiando el efecto de las diferentes variantes de AKT1 sobre la actividad del promotor de Nanog. Para esto utilizamos el vector *Nanog5P reporter*. Este vector fue originalmente publicado en 2005 [176] y ha sido ampliamente utilizado en la bibliografía como reportero de la actividad del promotor de Nanog [177]–[179]. Como se observa esquematizado en la Figura R. 3a, este vector contiene el ADNc de la enzima luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*, y en este caso, su transcripción se encuentra regulada por un fragmento de 2,5 kpb de la región promotora proximal del gen de Nanog de ratón (chr6:122,654,000 ~ 122,656,500). Como se mostró mediante análisis de CHIP-Seq (Figura R. 3b) [180], esta región interactúa con múltiples factores de transcripción, algunos de los cuales serán estudiados en este trabajo, lo que convierte a este vector en una excelente herramienta para el análisis de la regulación de este gen. Aún con las limitaciones de este sistema que serán discutidas oportunamente, consideramos que la actividad de luciferasa obtenida en los ensayos con este vector es una buena aproximación de la actividad transcripcional del promotor endógeno de Nanog.

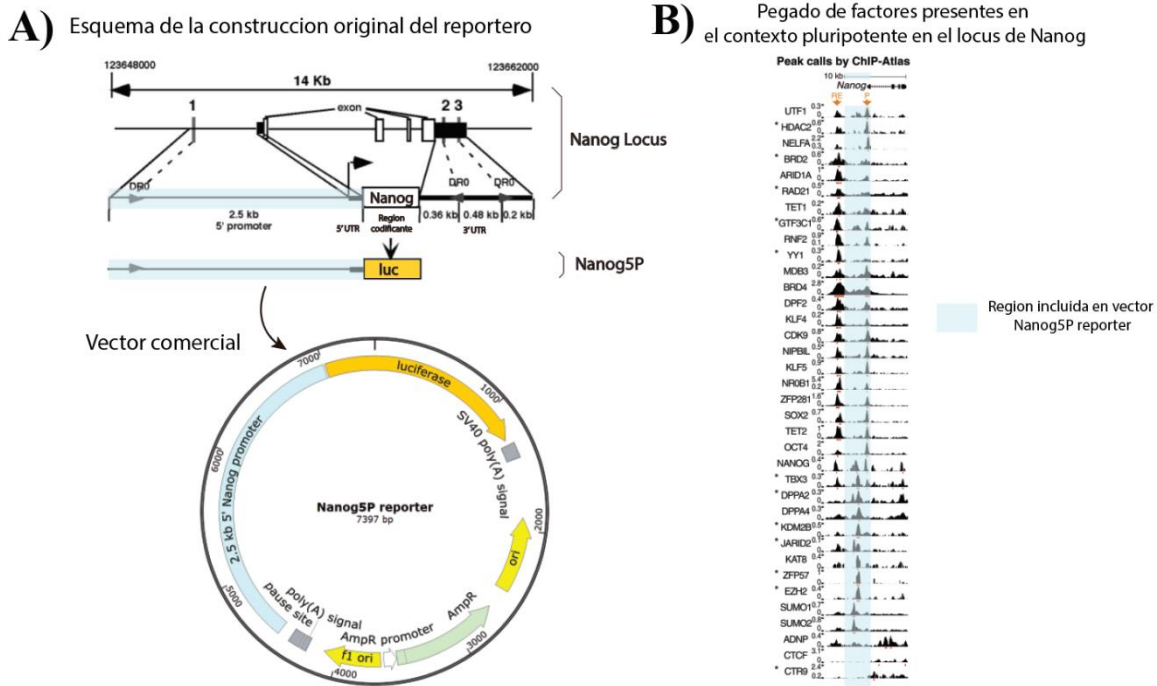


Figura R. 3. Construcción original del reportero de la actividad del promotor de Nanog y presencia de sitios de pegado en la región incluida. A) Esquema de la construcción original, adaptada de Gu et al [176], y esquema del vector utilizado. Los exones del gen se representan como rectángulos; se marcaron en color negro los exones que corresponden a las regiones no codificantes 5' y 3' UTR. La región codificante del gen de Nanog fue reemplazada por el cADN del gen de luciferasa (LUC) B) Análisis de unión de diferentes factores presentes en el contexto pluripotente sobre el locus de Nanog, realizado en la base de datos ChIP-Atlas, adaptado de Knaupp et al [180]. En celeste se resalta la región incluida en el vector Nanog5P reporter.

En células de la línea *W4*, que normalmente expresan Nanog (Figura R. 4A), utilizamos el abordaje experimental esquematizado en la Figura R. 4B. Realizamos la cotransfección de cada variante de AKT1 indicada en los ensayos, junto con el *Nanog5P reporter*, utilizando el agente de transfección PEI, y 48 h luego de la transfección realizamos la medición de la actividad de luciferasa. Dada la importancia de este tipo de ensayo en el desarrollo de esta tesis, aunque se encuentra detallado en materiales y métodos, comentamos brevemente que la medición de la actividad de esta enzima consiste en lisar las células transfectadas, incubar los extractos en un buffer adecuado conteniendo luciferina, el sustrato de la enzima luciferasa, y realizar la cuantificación de los fotones liberados producto de la catálisis de este sustrato. Una mayor señal lumínica es consecuencia de una mayor cantidad de la enzima en cada muestra, que, a su vez, indica una mayor expresión de la misma, producto de una mayor actividad del promotor estudiado. En este tipo de ensayos es habitual cotransfectar un vector que exprese un gen reportero diferente, dirigido por un promotor constitutivo, cuya expresión no debe ser sensible a las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Este vector se utiliza para normalizar los valores obtenidos según los niveles de transfección en cada muestra. Sin embargo, debemos mencionar que intentamos utilizar diferentes vectores que habitualmente se usan en este sistema, como los que codifican para la enzima luciferasa de la especie *Renilla reniformis* regulados por diferentes promotores, pero detectamos que en todos los casos, la expresión del gen reportero de los diferentes vectores a nuestro alcance, se modificaba por la presencia de AKT, seguramente

como consecuencia de elementos regulados por esta vía, por lo que este sistema normalizador no nos resultó de utilidad. Por ese motivo, los resultados de los experimentos realizados con esta técnica fueron normalizados mediante la cuantificación de proteínas totales de cada extracto mediante el método de Bradford y se relativizaron a los niveles obtenidos en la condición basal, en la que el reportero fue cotransfectado con el vector vacío correspondiente. Además, realizamos al menos 3 réplicas técnicas en cada determinación y al menos 3 réplicas biológicas según detallado en cada caso. De todas maneras, como lo comentamos anteriormente, realizamos la verificación de la transfección y expresión similar de las diferentes variantes utilizadas.

Como se observa en la Figura R. 4C, la actividad del promotor de Nanog aumentó cuando se sobreexpresó la variante AKT1 wt con respecto a la condición control transfectada con el vector vacío (basal). Como lo mencionamos previamente, debido a que AKT1 está involucrada en una de las principales vías que mantienen la pluripotencia en CME, con un rol de inducción en la expresión de Nanog, esperábamos encontrar este aumento en la actividad de este promotor, lo que apoya la validez del modelo experimental.

Por otro lado, la variante de AKT1 que posee dos de las lisinas reportadas como blanco de SUMOilación, reemplazadas por argininas, la AKT1 2KR, no tuvo efecto sobre la actividad del promotor de Nanog, dando lugar a una actividad luciferasa similar a los niveles basales (Figura R. 4C). Este resultado indica que la sustitución de estas lisinas SUMOilables produce una pérdida total del efecto inductor de AKT1 sobre el promotor de Nanog, sugiriendo fuertemente que esta inducción depende de la SUMOilación de esta quinasa.

Para poder discernir si la causa de la pérdida del efecto inductor se debe a la pérdida de SUMOilabilidad de la quinasa o a otro efecto consecuencia del reemplazo de las lisinas, por ejemplo, a un cambio conformacional, estudiamos el efecto de otra variante, la AKT1 D274N/E278Q. Esta mutante posee el consenso de SUMOilación que rodea a la K276 mutado, perdiendo parte de su SUMOilabilidad, pero no así la lisina blanco [123]. Como mostramos en la Figura R. 4C, encontramos que la cotransfección de esta mutante tampoco produjo efecto sobre la actividad del promotor, el cual no presentó diferencias respecto a la actividad basal, similar a la variante AKT1 2KR. Estos resultados sugieren fuertemente que la pérdida del efecto inductor encontrada en la mutante 2KR, no se debería, por ejemplo, a un cambio conformacional producido por la sustitución de las lisinas *per se*, sino a la pérdida parcial de la SUMOilabilidad de AKT1.

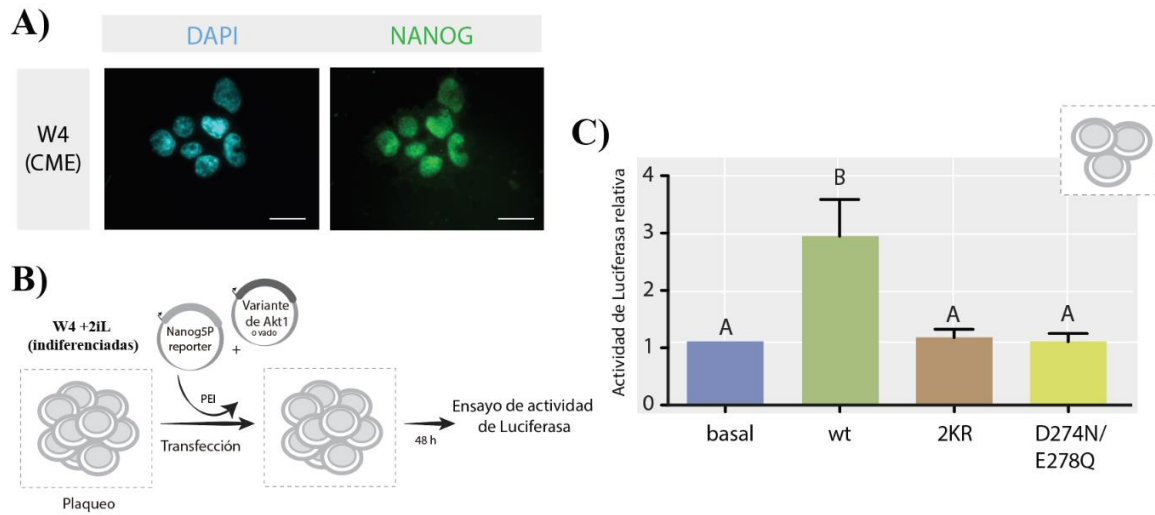


Figura R. 4. Efecto de AKT1 sobre el promotor de Nanog y dependencia de la SUMOilación. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de una colonia de células W4. Se visualizó la proteína de NANOG mediante IF con anticuerpo específico (en verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (en cian). Barra de escala: 20 μm . B) Esquema experimental de los ensayos de luciferasa. C) Efecto de las variantes de AKT1 wt, 2KR, D274N/E278Q y el vector vacío (basal) sobre el Nanog5P reporter. En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. Adaptado de Francia, et al [174].

Los resultados presentados hasta este momento demuestran el requerimiento de la SUMOilabilidad de AKT1, es decir, de su capacidad de ser SUMOilada, para producir un efecto sobre la actividad del promotor de Nanog. A continuación, para evaluar el requerimiento de la SUMOilación propiamente dicha, decidimos interferir con el proceso de SUMOilación. Para esto utilizamos una mutante de la vía de SUMOilación, específicamente, una mutante de la enzima que conjuga el grupo SUMO, la UBC9(C93S), que posee una mutación puntual; la cisteína⁹³ reemplazada por una serina. Esta mutación clave de su sitio activo produce la pérdida de su función conjugasa, y al ser sobreexpresada, actúa como dominante negativa sobre la endógena [181]–[183]. La presencia de esta mutante disminuye la transferencia del grupo SUMO a sus lisinas blanco, y de este modo, la SUMOilación global en la célula. Si bien esta inhibición en la SUMOilación no es específica para AKT1, su SUMOilación también se ve disminuida [147] al igual que la de otras proteínas. Como se observa en la Figura R. 5, en presencia de la UBC9(C93S), la variante wt perdió significativamente su efecto inductor sobre la actividad del promotor de Nanog, demostrando que el proceso de SUMOilación es requerido para esta inducción. Destacamos que el bloqueo de la inducción debido al efecto de la dominante negativa de UBC9 resultó de tal magnitud que determinó que no se observen diferencias respecto al nivel basal (línea de puntos). Como esperábamos, debido a ser una variante con SUMOilabilidad disminuida, con la variante AKT1 2KR no observamos cambios significativos en presencia o ausencia de la UBC9(C93S). Estos resultados demuestran el requerimiento de la SUMOilación de AKT1 para la inducción de la actividad de este promotor.

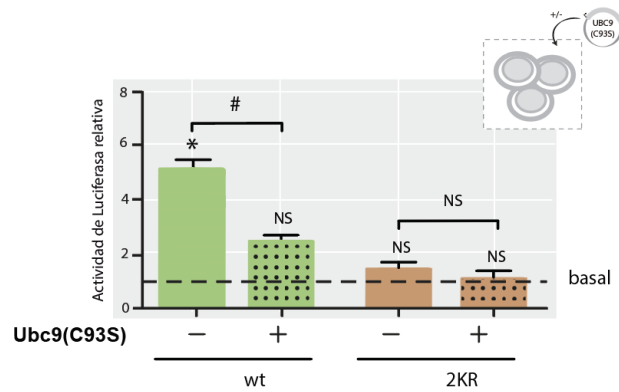


Figura R. 5. Efecto sobre la inducción del promotor de Nanog en presencia UBC9 dominante negativa, UBC9(C93S). Efecto de las variantes de AKT1 wt y 2KR sobre la inducción del promotor de Nanog en presencia (+) o ausencia (-) de la variante dominante negativa de UBC9, UBC9(C93S). En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente (línea punteada) y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. El símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) de las variantes de AKT1 respecto a su basal correspondiente (línea punteada), mientras que el símbolo sobre la línea denota diferencias significativas (#) o no (NS) entre la misma variante de AKT1 +/- UBC9(C93S) ($p < 0.05$). Adaptado de Francia, et al [174].

3.1.1.1 La mutante oncogénica AKT1 E17K induce el promotor de Nanog, mientras que su contraparte deficiente de SUMOilación, AKT1 E17K/2KR, no tiene efecto

Como mencionamos anteriormente, la mutante AKT1 E17K, posee una sustitución aminoacídica del ácido glutámico de la posición 17 por una lisina (E17K). Esta mutación fue detectada en diferentes tipos de tumores de mamíferos [171], aumenta la interacción de AKT1 con la membrana plasmática y en consecuencia también aumenta su actividad [171], [172]. A su vez, el nivel de SUMOilación en esta mutante es mayor que el de la versión wt [123]. Por estas razones y habiendo previamente encontrado un efecto de la SUMOilabilidad de AKT1 sobre la actividad del promotor de Nanog, evaluamos el efecto de esta mutante de AKT1 sobre la actividad del promotor de Nanog. Utilizamos el mismo esquema experimental de la sección anterior (Figura R. 4A), y como se observa en la Figura R. 6A, esta variante, al igual que la wt, indujo la actividad del promotor evaluado, aumentándola significativamente con respecto al basal. Por otro lado, para estudiar la dependencia del efecto sobre el promotor de Nanog de la SUMOilabilidad de esta mutante, evaluamos la actividad del reportero en presencia de otra mutante que combina las mutaciones E17K con las sustituciones de las lisinas K276/301R, la mutante AKT1 E17K/2KR [123]. Ésta posee la mutación oncogénica E17K, pero al no poseer las dos lisinas blanco del grupo SUMO, su SUMOilabilidad se ve disminuida. Al cotransfectar esta variante con el vector reportero, observamos niveles similares al basal (Figura R. 6A), demostrando que incluso conteniendo la mutación hiperactivante E17K, su SUMOilabilidad es clave para su efecto inductor del promotor de Nanog. Por otro lado, esperábamos obtener un efecto inductor mayor que con la variante wt, debido

a la característica hiperactiva de la mutante AKT1 E17K reportado en bibliografía en distintos contextos celulares [172]. De acuerdo con lo esperado y como se observa en la Figura R. 6B, encontramos que esta variante oncogénica indujo la actividad de este promotor incluso aún más que la versión wt. Nuevamente, para confirmar el requerimiento del proceso de SUMOilación en la inducción de la actividad del promotor de Nanog, evaluamos el efecto de interferir directamente con el proceso de SUMOilación, mediante cotransfección de estas variantes de AKT con la mutante dominante negativa de la enzima conjugadora a SUMO usada anteriormente, la UBC9(C93S). Como se observa en la Figura R. 6C, la interferencia de la SUMOilación produjo una disminución significativa del nivel de inducción del reportero producido por AKT1 E17K. Debemos mencionar que si bien la inducción disminuyó significativamente, el efecto inductor no se perdió por completo, probablemente consecuencia de algunas moléculas de AKT1 E17K que lograron SUMOilarse y producen altos niveles de inducción del reportero, suficientes para ser detectados por encima del valor basal. Esto es consistente con la mayor inducción del reportero ejercida por esta mutante respecto a la wt. Finalmente, con respecto a la mutante AKT1 E17K/2KR, no observamos cambios significativos en presencia o ausencia de la UBC9(C93S), lo que es consistente con su SUMOilabilidad disminuida y su falta de efecto sobre el reportero.

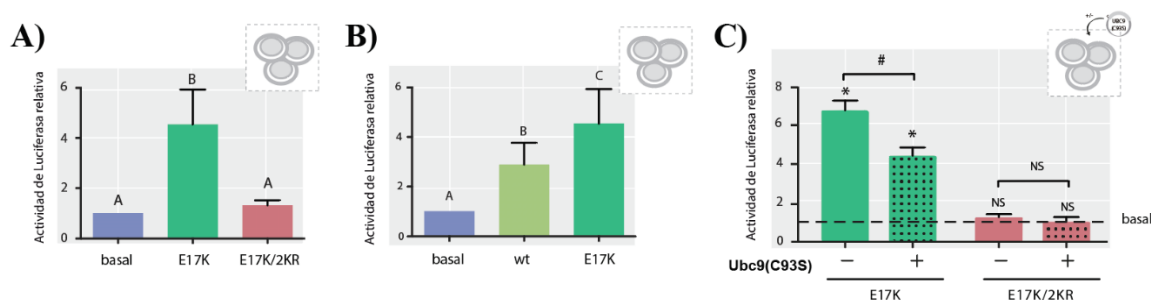


Figura R. 6. Efecto de AKT1 sobre el promotor de Nanog y dependencia de la SUMOilación. A) Actividad de luciferasa del Nanog5P reportero, revelando el efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal). B) Comparación de las veces de inducción de las variantes wt, E17K y el vector vacío (basal). C) Efecto de las variantes de AKT1 E17K y E17K/2KR sobre la actividad del promotor de Nanog en presencia (+) o ausencia (-) de la UBC9(C93S). En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. En los paneles A y B, letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. En el panel C, el símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) de las variantes de AKT1 con su basal correspondiente (línea punteada), mientras que el símbolo sobre la línea uniendo dos barras denota diferencias significativas (#) o no (NS) entre la misma variante de AKT1 +/- UBC9(C93S) ($p < 0.05$). Adaptado de Francia, et al [174].

Los resultados obtenidos con la mutante hiperactiva nos llevaron a preguntarnos si este efecto de mayor inducción respecto a la wt era algo específico de esta mutante oncogénica en particular o un efecto más general debido a la hiperactivación y compartido con otras variantes con hiperactividad. Para explorar esta posibilidad decidimos evaluar el efecto de otra variante hiperactiva de AKT1, la AKT1 MYR, que es constitutivamente activa, pero como consecuencia de cambios diferentes a los que presenta la mutante E17K [184]. La AKT1 MYR tiene su región N-terminal modificada con la región N-

terminal de la proteína LCK, la cual posee una señal de miristoilación y palmitoilación que la direcciona a la membrana plasmática [185]–[187]; por otra parte, la mutante E17K también se asocia a la membrana, pero producto de una mutación diferente. Una vez asociada a la membrana plasmática, la AKT MYR aumenta su interacción con quinasas que incrementan sus niveles basales de fosforilación y en consecuencia, su actividad [184], [185]. Como se muestra en la Figura R. 7A, esta variante también indujo la actividad del reportero, demostrando así que este efecto inductor no es exclusivo de la variante wt y de la mutante E17K, sino que también es producido por otra variante cuya hiperactividad es consecuencia de una mutación diferente. Asimismo, de manera cualitativa, detectamos que esta inducción resultó superior a la producida por las variantes de AKT1 SUMOilables estudiadas anteriormente. Si bien, podemos comparar los niveles de inducción de manera más cuantitativa entre las variantes wt y E17K debido a que éstas se encuentran clonadas en el mismo vector, solo podemos hacer este análisis de comparación de manera cualitativa con la variante MYR debido a que la misma se encuentra regulada bajo un promotor diferente y por lo tanto, esta comparación no es válida dado que sus niveles de expresión pueden ser diferentes. De todos modos, estos resultados demuestran que las tres variantes SUMOilables inducen el reportero y además, que la mutante AKT1 E17K, no llega a saturar nuestro sistema reportero.

Por último, nos pareció relevante evaluar la dependencia de la SUMOilación de AKT1 MYR para la inducción del promotor de Nanog. Es relevante mencionar que la dependencia de la SUMOilación de la actividad de esta variante ya había sido reportada para algunos efectos en otro contexto celular [146], sin embargo, no había sido estudiado en un contexto de pluripotencia, ni sobre la actividad del promotor de un FT. Para estudiar esto, realizamos el mismo ensayo usado anteriormente consistente en el análisis del efecto sobre el reportero mediante cotransfección de la variante en estudio, en presencia o ausencia de la UBC9(C93S). En la Figura R. 7B, se observa que la presencia de la dominante negativa de la enzima conjugadora del grupo SUMO produjo una disminución significativa en el nivel de inducción producido por AKT1 MYR. Es interesante notar que, al igual que observamos en el caso anterior, el efecto inductor no se perdió por completo ya que se observaron diferencias significativas con respecto al basal. Tal como lo mencionamos para la E17K, especulamos que este efecto es consecuencia de algunas moléculas de AKT1 MYR que lograron SUMOilarse y producen altos niveles de inducción del reportero, mayores que en el caso de AKT wt, los cuales son suficientes para ser detectados por encima del valor basal.

Este resultado indica que incluso en esta variante miristoilada, hiperfosforilada e hiperactiva, su SUMOilación es relevante para la inducción de la actividad del promotor de este FT de pluripotencia en el contexto de CME.

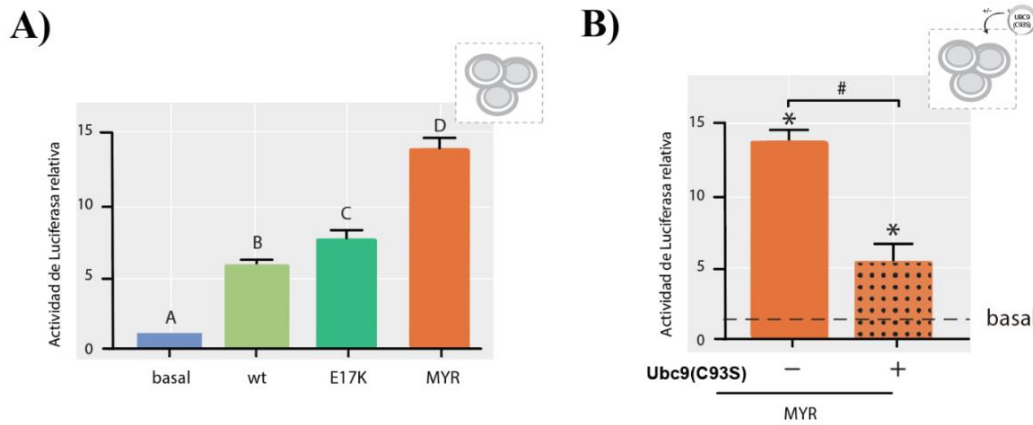


Figura R. 7. Efecto de AKT1 MYR sobre el promotor de Nanog y dependencia de la SUMOilación. A) Comparación de las veces de inducción de las variantes wt, E17K, MYR y el vector vacío (basal). B) Efecto de la dominante negativa UBC9(C93S) sobre el efecto de la AKT1 MYR en el promotor de Nanog. En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. En el panel A, el símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) de las variantes de AKT1 con su basal correspondiente (línea punteada), mientras que el símbolo sobre la línea uniendo dos barras denota diferencias significativas (#) o no (NS) entre la misma variante de AKT1 +/- UBC9(C93S) ($p < 0.05$). En el panel B, letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes.

En conclusión, a partir de los resultados presentados en esta primera sección, demostramos que en contextos en los que AKT1 tiene capacidad de ser SUMOilada, esta quinasa induce la actividad de la región promotora del FT de pluripotencia Nanog. Sin embargo, en contextos de SUMOilabilidad disminuida, AKT1 pierde la capacidad de realizar dicha inducción, o la misma es significativamente menor. Dos abordajes complementarios nos permitieron llegar a esta conclusión; el análisis de variantes de AKT con SUMOilabilidad disminuida por poseer las lisinas a las que se une el grupo SUMO sustituidas, y, por otro lado, la interferencia del proceso de SUMOilación como consecuencia de la presencia de una mutante de UBC9 que funciona como dominante negativa. Esto indica que la SUMOilación de AKT1 tiene un rol relevante en la regulación de la expresión de este FT clave en CMP. Si bien hubiese sido óptimo estudiar el estado de SUMOilación de las variantes de AKT1 usadas en nuestro sistema experimental, la falta de efecto de las mutantes de AKT1 con SUMOilabilidad disminuida, en conjunto con el bloqueo del efecto inductor de las variantes SUMOilables producido por la dominante negativa de UBC9, demuestran el requerimiento de la SUMOilación de AKT1 para la inducción de la actividad de este promotor. En conjunto, estas primeras observaciones sobre el promotor de Nanog constituyen el puntapié inicial para múltiples interrogantes que iremos intentado responder a lo largo de este trabajo de tesis.

3.1.1.2 Efecto de AKT1 sobre el ARNm de Nanog

3.1.1.2.1 Análisis de los niveles del ARNm de Nanog

Una vez determinada la dependencia de la SUMOilación de AKT1 para su inducción del promotor de Nanog, revelado por el sistema reportero, nos propusimos evaluar el efecto a nivel endógeno. Si bien el sistema reportero de Luciferasa utilizado es un sistema confiable y robusto, es sabido que existen diferencias con el promotor endógeno, fundamentalmente, debido a que se trata de un fragmento acotado y el contexto de la cromatina del gen endógeno no es reproducido en el vector. De todos modos, estos modelos son ampliamente utilizados ya que permiten realizar de manera simple una gran cantidad de análisis y suelen presentar una buena aproximación a lo que ocurre endógenamente. Por esta razón, a partir del resultado obtenido sobre la actividad del promotor de Nanog en el sistema reportero, especulamos que el mismo efecto debería verse reflejado en los niveles de ARN mensajero (ARNm) de este gen, lo que confirmaría el efecto sobre su regulación a nivel endógeno.

Decidimos comenzar el estudio del efecto de AKT1 sobre el gen endógeno evaluando los niveles de ARNm de Nanog en presencia de las distintas variantes de AKT1. Como mencionamos anteriormente, la transfección en líneas de CME no es muy eficiente, y con el agente de transfección PEI se obtiene aproximadamente una eficiencia del 10 %. En el ensayo anterior con el sistema reportero, medimos una señal de actividad de luciferasa proveniente exclusivamente de las células transfectadas, ya que las células no transfectadas no expresan esta enzima, por lo que los niveles bajos de transfección no repercuten en el resultado final siempre que la señal lumínica sea suficiente para separarse del ruido del detector. En cambio, para el estudio del ARNm, como toda la población de células en el pocillo expresan Nanog, transfectar con las distintas variantes y cosechar la totalidad de las células no sería informativo del efecto en las células transfectadas con las variantes de AKT, dado que el ARNm de las células transfectadas se diluiría con el ARNm proveniente de la población de células no transfectadas, que, en nuestro caso, son la mayoría. Por esta razón, diseñamos y utilizamos una estrategia que nos permita seleccionar y estudiar solo la población de células transfectadas, cuyo esquema se encuentra presentado en la Figura R. 8A. En este abordaje, realizamos una cotransfección de las distintas variantes de AKT1 junto con un vector que contiene resistencia al antibiótico de selección eucariota *Puromicina*, utilizando nuestro agente de transfección usual. Luego de 24 h de la transfección, el medio de cultivo es reemplazado por medio de cultivo de selección, que consiste en medio de cultivo normal de CME con la adición del antibiótico en una concentración de 1 µg/ml. Luego de 48 h de selección, se cosechan las células que permanecieron vivas luego de la selección (resistentes a puromicina) y se procesan para purificar el ARN. Sobre este ARN, se realiza la retrotranscripción (RT) a ADN copia (ADNc) seguida de PCR cuantitativa (qPCR).

En la Figura R. 8B se muestran los niveles de ARNm de Nanog relativos al control basal y normalizados por la expresión del gen *housekeeping* Gapdh. *A priori*, estos resultados indican que la presencia de ninguna de las distintas variantes de AKT1 modificaría los niveles de ARNm de Nanog endógeno.

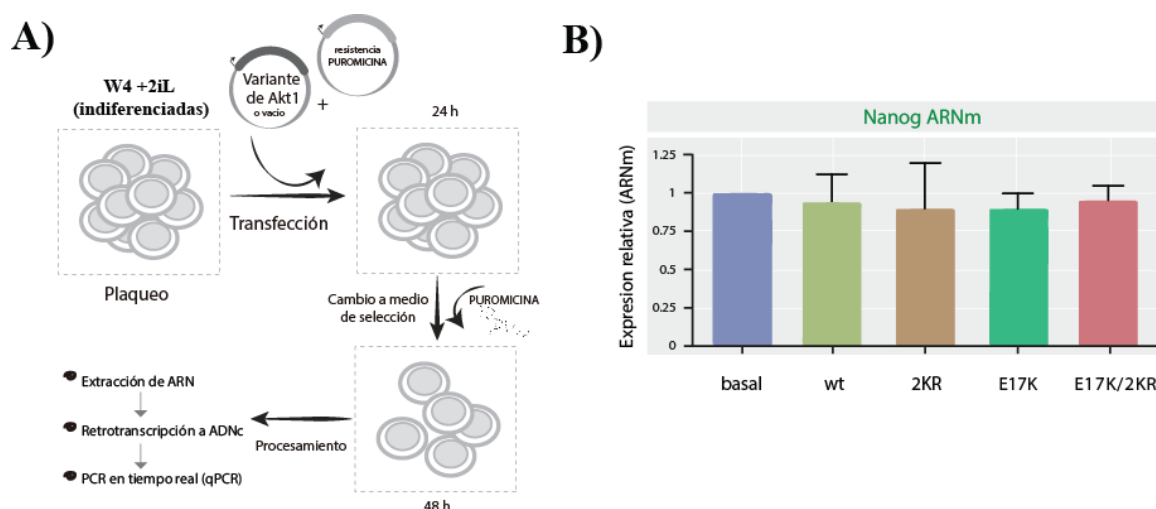


Figura R. 8. Efecto de las diferentes variantes de AKT1 sobre los niveles de ARNm de Nanog. A) Abordaje experimental para la obtención de ARNm de células transfectadas. B) Análisis de expresión génica de Nanog mediante RT-qPCR en células transfectadas con las distintas variantes indicadas de AKT1. Los resultados fueron normalizados utilizando GAPDH como gen housekeeping, relativizados al basal y se muestran como la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. No se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

En primera instancia, nos sorprendió no haber obtenido el mismo efecto observado en el comportamiento de la actividad del promotor en el sistema reportero, en el cual las variantes SUMOilables de AKT produjeron una inducción en esta actividad. Sin embargo, más allá de la posibilidad de que la SUMOilación de AKT1 no tenga absolutamente ningún efecto sobre los niveles de ARNm de Nanog, también pueden existir diversas causas por las cuales no hayamos podido detectar esos efectos en este abordaje experimental. Si bien, hemos realizado los controles de selección correspondientes y tomado todos los recaudos posibles en este tipo de ensayo, existe la posibilidad de que, por ejemplo, exista un efecto, aunque sea marginal, sobre los niveles de ARNm, pero que sumado a la baja cantidad de células transfectadas, éste se diluya como consecuencia de la presencia de células sin transfectar remanentes que hayan resistido a la selección de 48 h con puromicina. A esta altura podríamos complejizar el abordaje experimental, en un intento de mejorar la detección del efecto de las variantes de AKT1 sobre los niveles de este ARNm en células transfectadas, generando nuevos vectores y/o líneas estables (que discutimos más adelante), pero antes de enfocarnos en lo que podría ser un giro en este proyecto, decidimos continuar estudiando el efecto sobre la expresión de Nanog con otras herramientas disponibles que nos permitan estudiar la regulación a diferentes niveles, específicamente, un posible efecto sobre la estabilidad y/o traducibilidad del ARNm de Nanog y los niveles de su proteína. Mas adelante, una vez estudiados estos efectos, recapitularemos este tema.

3.1.1.2 Análisis del efecto de AKT1 sobre el 3'UTR del ARNm de Nanog

Los microARNs (miARNs) son ARNs pequeños, no codificantes, de aproximadamente 19 a 24 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional [188]. Específicamente, como reguladores endógenos de la expresión génica, los miARNs inducen la represión de la traducción o la degradación del transcripto al unirse a los sitios complementarios en la región 3'-no traducida (3'-UTR) de sus genes objetivo [188]. Debido a que los miARNs son capaces de regular una multiplicidad de genes blanco, impactan en una gran variedad de procesos y vías celulares. Por ejemplo, se han demostrado que los miARNs son críticos para el desarrollo, la proliferación y muerte celular, el modelado del sistema nervioso e incluso en el mantenimiento de la pluripotencia [189]–[191]. Además, se ha demostrado que los miARNs juegan un papel mucho más amplio en la regulación de las funciones celulares; la desregulación de la expresión de miARNs podría conducir a una variedad de patologías, especialmente el cáncer. En este sentido, los miARNs pueden funcionar como oncogenes o supresores de tumores [192].

Se ha demostrado que existen miARNs, como los miR-128, miR-126 y miR-149, que actúan como supresores de tumores, que regulan varios genes esenciales para la pluripotencia, particularmente, Nanog, Oct4 y Sox2 [193], [194]; asimismo, estos FTs regulan diferentes *clusters* de miARNs, también importantes en el mantenimiento de la pluripotencia en CME [195]. Específicamente, respecto a la regulación de Nanog, existen miARNs que regulan su expresión tanto de manera directa como indirectamente, y se propone que esto incluso podría modular procesos tumorales [82], [196]. Por ejemplo, el miR-134 actúa como regulador de los niveles de Nanog tanto en CME de ratón [81], como en líneas tumorales [197]. Además, el miR-214, un conocido miARN oncogénico, regula positivamente la expresión de Nanog, produciendo un aumento de este FT [82]. Asimismo, se ha descubierto un gran número de miARNs que modulan la vía PI3K/AKT [198], actuando tanto río arriba como río abajo de AKT, y que en última instancia impactan en la función de esta quinasa [199].

Para estudiar la posibilidad de que AKT regule el ARNm de Nanog mediante algún elemento del 3' UTR, ya sea mediante miARNs u otros factores, utilizamos el sistema pMIR-REPORT. Éste es un sistema reportero que consiste en un vector de expresión de la enzima luciferasa, dirigida por el promotor CMV, pero que tiene la particularidad de contener un sitio de clonado en la región 3' del ADNc del gen reportero, que permite el estudio de regiones regulatorias del 3' UTR de otros transcriptos que podrían afectar la estabilidad y traducibilidad, y que en este reportero impactan en los niveles de actividad luciferasa. Si bien este sistema fue concebido para el estudio del efecto de miARNs, es un reportero del efecto de miARNs y otros potenciales factores regulatorios que actúen sobre el 3' UTR de Nanog, tanto modulando la estabilidad del ARNm, como su tasa de traducción. La

región 3'UTR del ARNm de Nanog fue aislada y clonada en el pMIR-REPORT, dando lugar al pMIR-REPORT-Nanog3'UTR (Figura R. 9A). La construcción, y validación de este vector estuvo a cargo del Dr. Ariel Waisman, quien gentilmente nos la proporcionó para realizar estos análisis.

Para este ensayo utilizamos un abordaje experimental simple (Figura R. 9B), que consistió en cotransfectar las distintas variantes de AKT1 junto con el vector reportero pMIR-REPORT-Nanog3'UTR y realizar la medición de luciferasa y proteínas totales correspondientes. Tal como fue realizado en las secciones anteriores, los resultados de este ensayo se muestran expresados como la actividad de luciferasa relativa a los niveles del basal, que es como en todos los casos, la condición transfectada con el vector vacío. En primer lugar, realizamos una verificación sencilla e informativa de la sensibilidad del reportero en nuestro sistema, que consistió en analizar los niveles basales de actividad de luciferasa en condiciones normales de cultivo de CME (medio completo conteniendo LIF y el coctel 2i, LIF/2i) y en condiciones que promueven la salida del estado pluripotente naïve (medio sin LIF ni 2i por 48 h, -LIF/2i, Figura R. 9C). Elegimos estas condiciones para comprobar la validez del reportero porque en la salida del estado pluripotente naïve se expresan miARNs (entre ellos, el miR-134), que regulan negativamente la expresión de Nanog y otros genes importantes para la pluripotencia, mediante reconocimiento de sus secuencias consenso en la región 3'UTR de sus ARNm blanco e inhibiendo su traducción [200]. Este es uno de los mecanismos presentes en CME que promueven una salida rápida del estado pluripotente. Como se muestra en la Figura R. 9C, al analizar la actividad del reportero del 3'UTR de Nanog, observamos una disminución de la actividad de luciferasa en condiciones de diferenciación respecto al control en presencia de LIF+2i. Dado que estos resultados son consistentes con el efecto reportado de miARNs que se inducen al inicio de la diferenciación, validando el reportero utilizado, estudiamos el efecto de las variantes de AKT1.

Como se muestra en la Figura R. 9D, observamos que las variantes SUMOilables AKT1 wt y E17K, que anteriormente habíamos encontrado que inducían la actividad del promotor de Nanog, no presentaron diferencias significativas respecto al basal. Dado que en este sistema reportero estamos estudiando el efecto únicamente a nivel de la región del 3'UTR, independizándonos de la actividad del promotor de Nanog, concluimos que las variantes SUMOilables de AKT1 no tendrían un efecto sobre elementos regulatorios contenidos en la región estudiada que modulen la estabilidad y/o la traducibilidad del ARNm de Nanog. Por otro lado, vemos que las contrapartes de estas variantes con SUMOilación disminuida, las AKT1 2KR y AKT1 E17K/2KR produjeron un efecto que inicialmente no esperábamos: disminuyó la actividad luciferasa, sugiriendo que disminuye la cantidad o la traducibilidad del ARNm de este vector, indicando una regulación negativa sobre la región 3'UTR de Nanog.

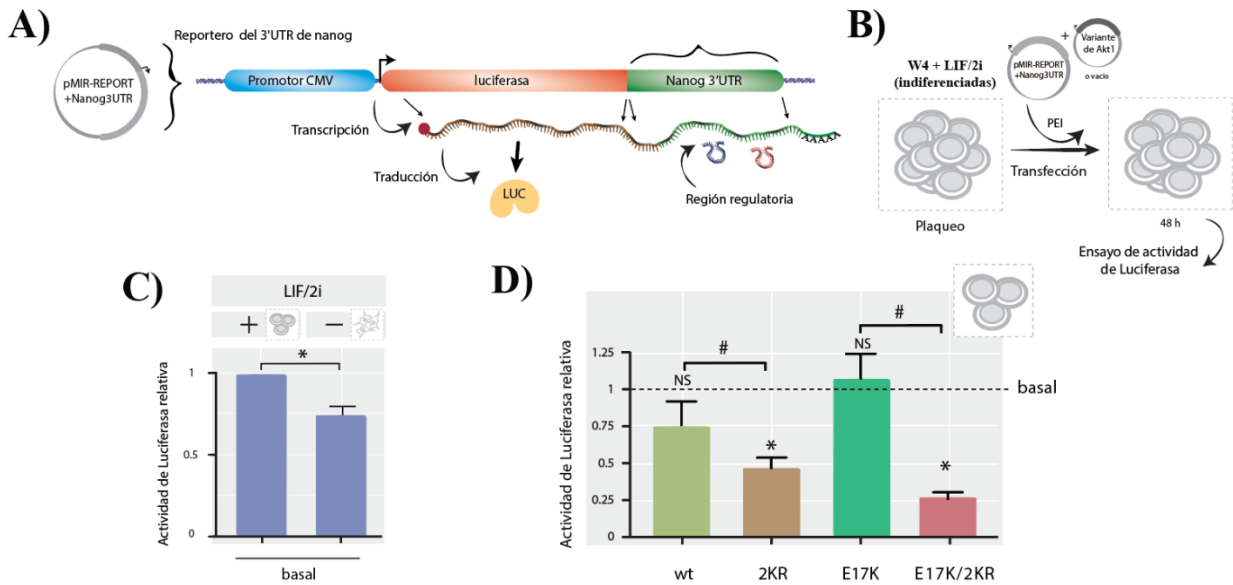


Figura R. 9. Efecto de la SUMOilación de AKT1 sobre la región 3'UTR del ARN mensajero de Nanog. A) Esquema del vector pMIR-REPORT conteniendo la región 3' UTR del ARN mensajero de Nanog reconocida por miARNs regulatorios (ejemplificados en la figura). B) Esquema experimental del diseño experimental. C) Comparación de la actividad luciferasa del reportero del 3' UTR de Nanog en condiciones de cultivo de mantenimiento del estado de pluripotencia naïve (+LIF/2i) y a la salida de este (cultivo en -LIF/2i por 48 h). D) Efecto de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal) en condiciones de cultivo de rutina con LIF/2i. En todos los casos la actividad de luciferasa se relativizó al basal (+LIF/2i) y los resultados se muestran como la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. El símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) de las variantes de AKT1 con su basal correspondiente, mientras que # indica diferencias significativas entre los pares de variantes indicados ($p < 0.05$).

Poniendo en contexto estos resultados con los obtenidos al estudiar el reportero del promotor de Nanog, podríamos especular que las variantes SUMOilables de AKT1 en primer lugar inducirían la actividad del promotor de Nanog, posiblemente aumentando los niveles del ARNm de Nanog y una vez transcrito, su estabilidad o traducibilidad no cambiaría. Sin embargo, especulamos que sí podrían tener un efecto en contextos de diferenciación, debido a la presencia de factores que, como mencionamos, se encuentran presentes en ese contexto y no en la condición evaluada en este experimento. Retomaremos más adelante esta discusión, dado que evaluaremos esta hipótesis en el final de la parte I (sección 3.1.1.4.1). Por otro lado, las variantes de AKT1 con SUMOilabilidad disminuida, no parecen tener efecto sobre la actividad del promotor de Nanog, pero podría haber un efecto sobre la estabilidad o traducibilidad del ARNm, disminuyéndolo. Estos resultados, al menos, no son compatibles con los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de ARNm de Nanog, por lo que especulamos que efectivamente, debe haber habido células no transfectadas remanentes que no permitieron detectar el efecto de las variantes de AKT sobre el gen endógeno, determinando que los resultados de dichos experimentos no sean confiables.

En este punto, nos propusimos confirmar el efecto de las variantes de AKT1 en la expresión de este gen, que en última instancia, son los niveles proteicos de Nanog.

3.1.1.3 AKT1, de manera dependiente de su SUMOilación, produce un aumento de los niveles de la proteína NANOG

Los resultados presentados hasta este punto muestran que la SUMOilación de AKT1 tiene un rol clave en el efecto inductor de esta quinasa sobre la actividad del promotor de Nanog, aunque hasta este momento no hemos mostrado resultados que indiquen que el efecto observado sobre el vector reportero sea un reflejo de lo que sucede a nivel endógeno. En este contexto nos propusimos evaluar el efecto de las variantes de AKT1 sobre del producto final de este gen: el FT NANOG. Para esto utilizamos el abordaje presentado en la Figura R. 10. En este ensayo transfectamos las células con las distintas variantes de AKT1 y posteriormente visualizamos las proteínas de interés mediante inmunofluorescencia (IF). Esta técnica nos permite detectar y cuantificar las proteínas de interés dentro de las células utilizando anticuerpos específicos y visualizándolos mediante microscopía de fluorescencia. En este caso, dado que todas las variantes transfectadas de AKT1 se encuentran fusionadas al tag HA, como ya mencionamos, es posible identificar las células transfectadas mediante la marcación con un anticuerpo específico contra este tag. De esta manera, mediante el uso de otro anticuerpo que reconoce específicamente la proteína NANOG, presente en toda la población de CME, podemos comparar sus niveles en células transfectadas y células sin transfectar dentro de un mismo campo.

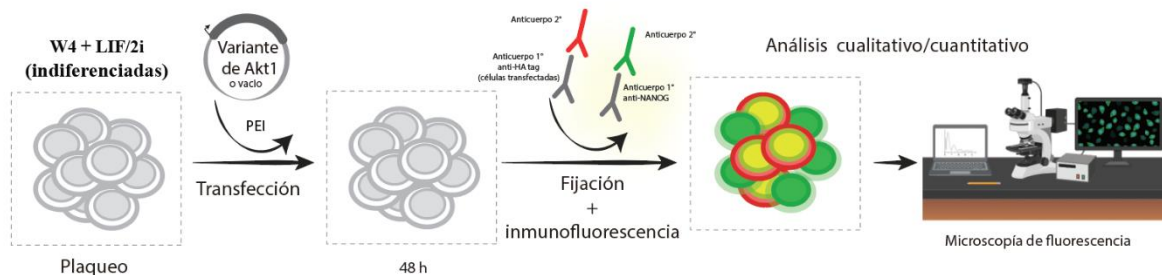


Figura R. 10. Cuantificación de la proteína endógena de Nanog: esquema experimental.

En la Figura R. 11A se muestran imágenes representativas de células transfectadas con las diferentes variantes de AKT1 o con el vector vacío. En la primera fila y en color cian se observan los núcleos marcados con DAPI. En la segunda fila, en color rojo, se observan las células positivas para la marca de HA, que expresan las distintas variantes HA-AKT1 y en la tercera fila, en verde, se observa la señal de NANOG. En la última fila, las células transfectadas y las no transfectadas fueron delineadas en rojo y amarillo respectivamente, para una mejor identificación. Como se observa en la columna del control, todas las células expresan Nanog de manera más o menos homogénea en estas condiciones de cultivo evidenciado por niveles similares de NANOG. En cambio, cuando las células son

transfectadas con AKT1 wt, en aquellas células positivas para el tag HA, observamos un aumento considerable en la cantidad de proteína endógena de Nanog. Este aumento no se observó en aquellas células transfectadas con su contraparte con SUMOilabilidad disminuida, la AKT1 2KR. Con respecto a la variante oncogénica AKT1 E17K, detectamos un aumento en la señal de la proteína de Nanog en aquellas células transfectadas comparadas con la no transfectadas, similar a lo observado con la AKT1 wt. Por otro lado, la variante con SUMOilación disminuida que porta esta misma mutación, la AKT1 E17K/2KR, tal como sucedió anteriormente con la AKT1 2KR, no se observó un aumento en los niveles de NANOG respecto a las células sin transfectar. Posteriormente, realizamos un análisis cuantitativo de estas observaciones, determinando la intensidad de fluorescencia de la señal de NANOG y comparando las células transfectadas con las células sin transfectar dentro del mismo campo visual para cada variante de AKT1 (Figura R. 11B). En esta cuantificación observamos que la señal de NANOG con las variantes SUMOilables AKT1 wt y AKT1 E17K es significativamente mayor comparada tanto con las células sin transfectar como con sus contrapartes de SUMOilación disminuida AKT1 2KR y AKT1 E17K/2KR. A su vez, con estas últimas variantes, los niveles de NANOG no son significativamente distintos a los de las células sin transfectar. Resulta interesante destacar que no encontramos diferencias significativas entre los niveles de NANOG de las células transfectadas con las variantes AKT1 wt y con AKT1 E17K, como sí las habíamos encontrado cuando evaluamos el efecto sobre la actividad del promotor de este FT. Si bien la actividad del promotor puede ser más alta, podrían existir otros mecanismos regulatorios que compensan la cantidad final de proteína, como discutiremos más adelante.

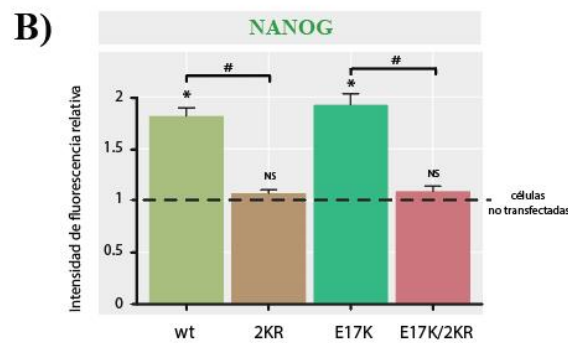
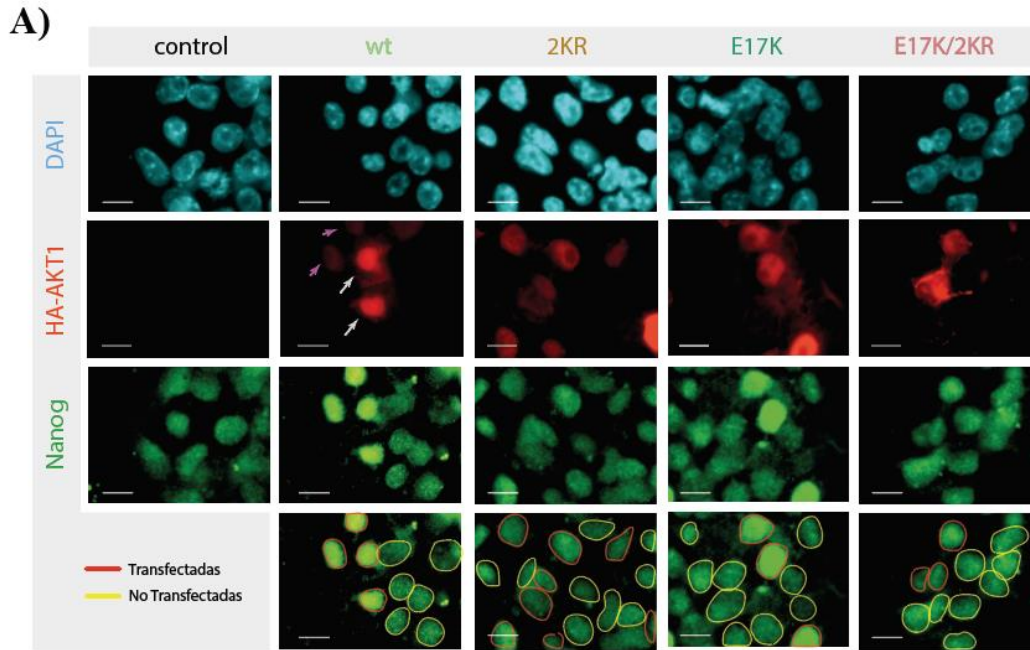


Figura R. 11. AKT1 de manera dependiente de su SUMOilación produce un aumento en los niveles de la proteína endógena de Nanog. A) Imágenes representativas de IF en microscopía widefield de células W4 transfectadas con las distintas variantes de HA-AKT1. Se visualizó la fluorescencia de los núcleos con DAPI (en cian), de las células transfectadas mediante el tag HA (en rojo) y de la proteína de NANOG mediante anticuerpo específico (en verde). En la fila inferior, se marcaron células representativas de la población transfectada (línea roja) y sin transfectar (línea amarilla). B) Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia. Los gráficos representan la intensidad media de fluorescencia de la señal proteína NANOG en células transfectadas con las distintas variantes de AKT1, relativizado a la intensidad media de las células sin transfectar del mismo campo \pm EE para cada condición. El símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) de las células transfectadas de las variantes de AKT1 comparadas con las células no transfectadas correspondientes, mientras que # indica diferencias significativas entre los pares de variantes indicados ($p < 0.05$). Barra de escala: 20 μ m. Adaptado de Francia, et al [174].

En resumen, el aumento de los niveles de proteína endógena de Nanog producido por las variantes SUMOilables y la falta de efecto de las variantes con SUMOilación impedida, revelan tanto la importancia como el requerimiento de la SUMOilación de AKT1 para la inducción de los niveles de la proteína de Nanog

A su vez, estos resultados son consistentes con los mostrados en secciones anteriores, los cuales sugieren que la SUMOilación de AKT1 es requerida para inducir la actividad del promotor de Nanog. Si bien a esta altura del trabajo no encontramos un paralelo con los niveles de ARNm de este gen, creemos que puede existir un efecto inductor sobre éste, el cual no pudimos detectar con el abordaje

utilizado. Una vez sintetizado este ARNm, la SUMOilabilidad de AKT1 parece ser importante para mantener su estabilidad o traducibilidad, que en última instancia repercute en los niveles endógenos del producto final de este gen: la proteína NANOG. Además, el conjunto de estos resultados indica que existe un correlato entre lo que sucede con el reportero de la actividad del promotor de Nanog y los niveles de la proteína endógena de este TF.

3.1.1.4 El efecto de AKT1 sobre Nanog es dependiente del contexto celular

¿Es específica de CMP la inducción de la expresión de Nanog por AKT1 o también ocurre en otros contextos celulares?

A partir de los resultados anteriores, decidimos estudiar la dependencia del contexto celular del efecto de AKT1 en el promotor de Nanog, con el objetivo de comenzar a investigar posibles mediadores de este efecto e intentar dilucidar en última instancia el mecanismo molecular subyacente. Hipotetizamos que esta inducción ocurre también en otros contextos pluripotentes y que es un efecto exclusivo de células pluripotentes y no generalizado. Para evaluar esta hipótesis, comenzamos estudiando el efecto de las variantes de AKT1 con diferente SUMOilabilidad en la actividad del promotor de Nanog en otro modelo pluripotente, para luego analizar también el efecto en contextos de células diferenciadas.

Como se mencionó anteriormente, las células madre pluripotentes inducidas (CMPI) son células madre pluripotentes reprogramadas, derivadas de células terminalmente diferenciadas. En general, las CMPI son derivadas de fibroblastos debido a la facilidad de obtención de este tipo de celular en un organismo adulto, comparado con otros tipos celulares. El patrón de expresión génica y propiedades generales de las CMPI son similares a las CME. En nuestro laboratorio, previamente fueron generadas de manera exitosa, líneas de CMPI de ratón a partir de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios [201]. En especial, dada su característica de CMP, éstas expresan Nanog, y su promotor endógeno está asociado con marcas epigenéticas activas, en contraposición a los mencionados fibroblastos (MEF) de los que provienen. Utilizando la plataforma de minería de datos (*datamining*) <https://www.stemformatics.org/>, en donde se encuentran precargados un gran número de conjuntos de datos derivados de experimentos del tipo ómicos, realizamos un análisis de comparación entre estos tipos de CMP de ratón y MEF para mostrar el contraste en la diferencia de expresión de este TF en el que estamos haciendo foco en estos contextos. Como se observa en la Figura R. 12, el panel superior muestra el resultado del análisis de expresión de Nanog, tanto por proteómica (espectrometría de masa) como por transcriptómica (RNA-seq) de estos tres tipos celulares mencionados. Por otro lado, en el panel inferior se compara la presencia de marcas de histonas

correspondientes a regiones promotoras activas (ChIP-seq de H3K4me3) y marcas de promotores inactivos (ChIP-seq de H3K27me3) y metilación de ADN (detección de 5-mC mediante tratamiento con bisulfito seguido de secuenciación), todos sobre la región promotora de Nanog. En conjunto, ambos análisis son consistentes con que Nanog se expresa y su promotor esta activo en el contexto celular de CMP, en contraste con las células MEF donde su expresión no detectable y su promotor está asociado a marcas represivas.

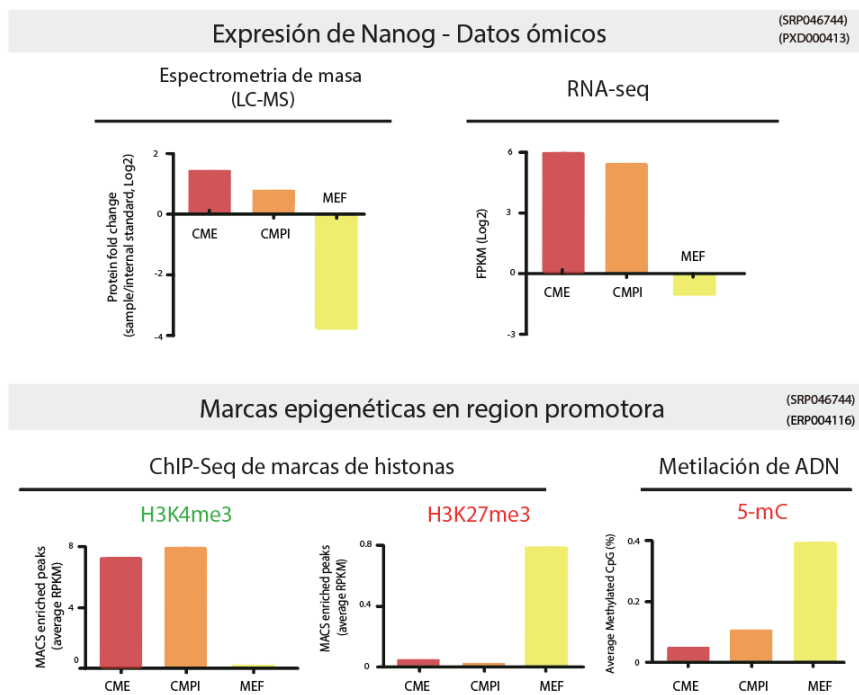


Figura R. 12. Expresión de Nanog y marcas epigenéticas en su promotor en CME, CMPI y MEF. Se utilizó la plataforma de datamining Stemformatics para realizar el análisis a partir de datos disponibles públicamente [202], [203]. En el panel superior se muestran datos de expresión de LC-MS (proteína) y RNA-seq (ARNm). En el panel inferior se muestra el estado de las marcas epigenéticas dentro de la región promotora de Nanog de datos de ChIP-seq de marcas de histonas (H3K4me3 y H3K27me3, asociadas a promotores activos y marcas represivas, respectivamente) y de metilación de citosina (asociadas a regiones inactivas) por secuenciación post Bisulfito. Los números identificadores de cada set de datos públicos se encuentran indicados en la figura. Adaptado de Francia et al. [204].

Luego de este análisis bioinformático, evaluamos la actividad del reportero en CMPI. Como se muestra en la Figura R. 13A, co-transfectamos una línea de CMPI previamente generada en nuestro laboratorio con el Nanog5P reporter, junto con las diferentes variantes de AKT1 previamente utilizadas o el vector vacío. Como esperábamos y de manera consistente con lo obtenido en CME, las CMPI transfectadas con las variantes SUMOilables wt AKT1 y E17K AKT1 mostraron una mayor actividad del reportero de Nanog, mientras que ninguna de las mutantes deficientes en SUMOilación, AKT1 2KR y E17K/2KR, tuvo efecto (Figura R. 13B, barras solidas). Además, al co-transfectar la mutante UBC9 (C93S) que interfiere con la vía de conjugación a SUMO, el efecto inductor de las variantes SUMOilables se vio afectado (Figura R. 13B, barras punteadas). En conjunto, estos resultados en CMPI,

junto con los obtenidos previamente en células CME, demuestran la dependencia de SUMOilación de AKT1 para la inducción del promotor de Nanog en dos contextos diferentes de células pluripotentes.

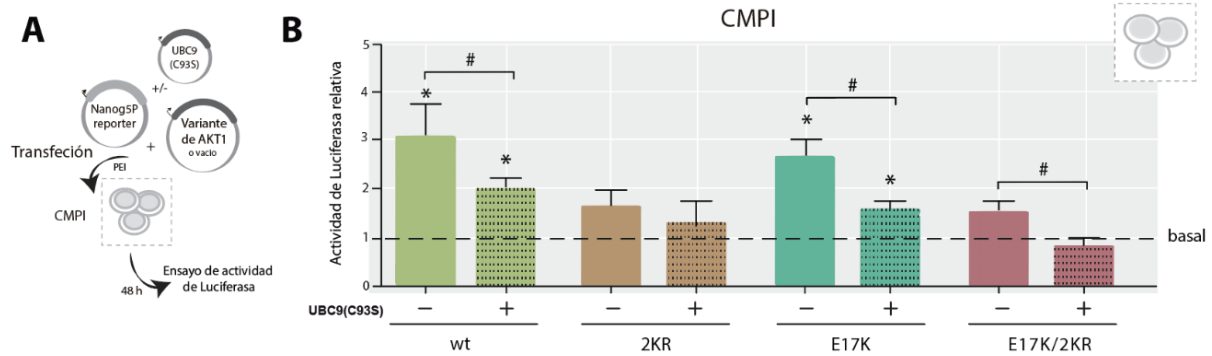


Figura R. 13. La SUMOilación de AKT1 induce la actividad del promotor de Nanog en CMPI. A) Esquema experimental. B) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K y E17K/2KR y el vector vacío (basal) en presencia (+) o ausencia (-) de la UBC9(C93S). En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente (línea punteada) y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. El asterisco (*) sobre las barras indica diferencias significativas de las variantes de AKT1 con su basal correspondiente (línea punteada), mientras que el símbolo de numero (#) sobre dos barras denota diferencias significativas entre la misma variante de AKT1 +/- UBC9(C93S) ($p < 0.05$). Adaptado de Francia et al. [204].

A partir de los efectos dependientes de la SUMOilación de AKT1 sobre la expresión de Nanog en CMP, decidimos estudiar si este efecto sobre Nanog ocurre en cualquier contexto o si depende de un mecanismo molecular específico presente en CMP y ausente en células diferenciadas. Para esto, evaluamos el efecto de las distintas variantes de AKT1 en diferentes contextos celulares. Empezamos estudiando el efecto sobre la actividad del promotor de Nanog en la línea de MEF, NIH/3T3. Estas células, si bien derivan de un contexto embrionario, son células con un alto grado diferenciación y han sido utilizadas de rutina en nuestro laboratorio como sistema heterólogo que no expresa los FTs de pluripotencia [205]–[207]. Si el efecto encontrado fuese exclusivo de células pluripotentes, en este sistema esperaríamos no observar el efecto de AKT1 sobre Nanog anteriormente visto en CME. En la Figura R. 14A, confirmamos la ausencia de NANOG en MEF mediante IF, contrastado con CME donde sí se observa su presencia. Como control realizamos una transfección con un vector que codifica la proteína de fusión Nanog-GFP; en MEF, la señal positiva de NANOG solo aparece en las células transfectadas con dicho vector (panel derecho). En la Figura R. 14B se encuentra esquematizado el abordaje experimental, para el cual realizamos una cotransfección de las MEF con las distintas variantes de AKT1 o el vector vacío junto con el Nanog5P reporter para posteriormente realizar la medición de la actividad de luciferasa. Como se muestra en la Figura R. 14C, en este contexto de células diferenciadas observamos una respuesta muy diferente a la que habíamos encontrado en CME. No sólo no observamos inducción del reportero por las variantes SUMOilables, sino que, además, sorprendentemente, todas las variantes de AKT reprimieron la actividad del promotor de Nanog

respecto a basal, sin diferencias entre las variantes de AKT SUMOilables y aquellas con SUMOilabilidad disminuida.

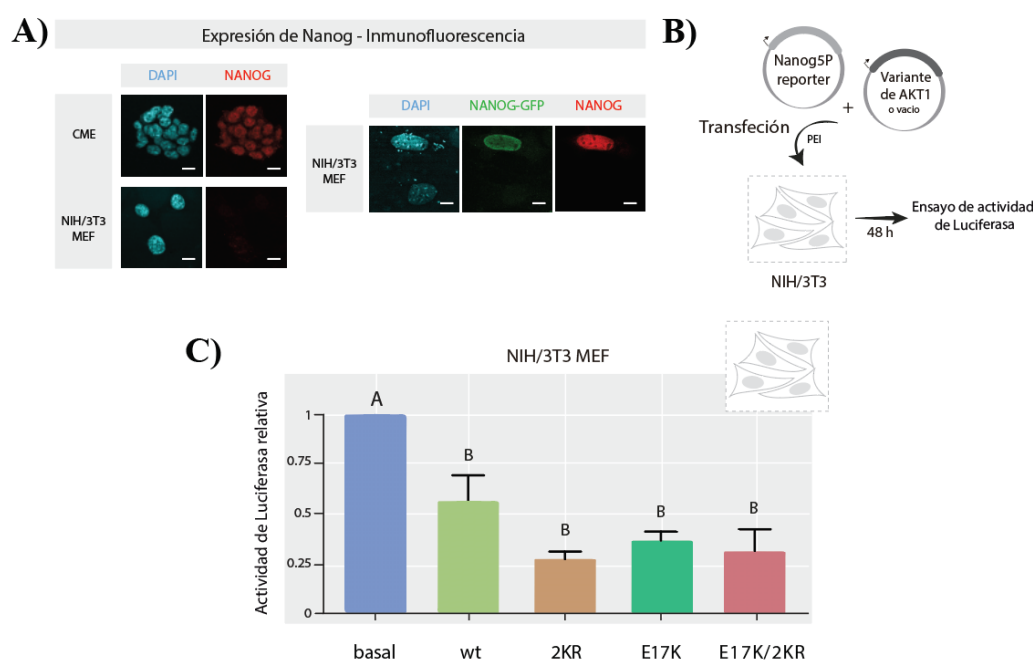


Figura R. 14. Efecto de AKT1 sobre el promotor de Nanog en la línea NIH/3T3. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en microscopía widefield de células W4 (CME) comparadas con NIH/3T3 (MEF). En el panel izquierdo se visualizó la fluorescencia de los núcleos con DAPI (en cian) y de la proteína de NANOG mediante anticuerpo específico (en rojo). En el panel derecho, se muestran células NIH/3T3 transfectadas con un vector de expresión de la proteína de fusión NANOG-GFP (verde) y analizadas mediante IF como en el panel izquierdo. Barra de escala = 20 μ m. B) Esquema experimental de los ensayos de luciferasa empleados, utilizando el reportero de actividad del promotor de Nanog, Nanog5P reporter. C) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal). En todos los casos los resultados se relativizaron al basal y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. Adaptado de Francia, et al [174].

Como mencionamos, estos resultados indican que el efecto inductor sobre la expresión de Nanog observado en CME sería consecuencia de la existencia de un mecanismo molecular específico del contexto pluripotente, o al menos ausente en MEF, en el cual AKT interviene activamente, y es poco probable que sea parte de una respuesta general o inespecífica de la sobreexpresión de esta quinasa. Además, indican que la mera expresión de AKT no es suficiente para poner en marcha las vías necesarias para inducir la expresión de este TF de pluripotencia en MEF, donde como ya mencionamos, éste no se expresa.

Estos resultados que revelaron una respuesta tan diferente y marcada entre una línea celular diferenciada y las CMP nos llevaron a indagar otros escenarios. Para responder el interrogante si AKT1 es capaz de modificar la expresión de este TF en esos contextos celulares o si el mecanismo detrás se encuentra restringido a contextos pluripotentes, decidimos ampliar la evaluación anterior a otros contextos celulares diferentes, estudiando este efecto en dos líneas celulares adicionales: utilizamos la línea celular derivada de riñón embrionario humano HEK 293T y la línea derivada de osteosarcoma

humano U-2 Os. En la Figura R. 15A, se observa que tanto la línea HEK 293T como la U-2 Os, no poseen marcación de NANOG positiva, confirmando la ausencia esperada de esta proteína en las HEK, de acuerdo a lo reportado [208], [209]; sin embargo, contrariamente a lo esperado de acuerdo a la bibliografía [210], tampoco detectamos NANOG en las U-2 Os. En ambas líneas, la marca positiva para NANOG solo aparece en células transfectadas con el vector Nanog-GFP, transfección que realizamos como control de la IF en estas células.

Para evaluar el efecto de la SUMOilación de AKT1 sobre la actividad del promotor de Nanog en estas líneas utilizamos el mismo esquema experimental, graficado en la Figura R. 15B. En la Figura R. 15C, se muestran los resultados obtenidos en la línea U-2 Os, donde observamos una respuesta diferente a la obtenida en CME: nuevamente, todas las variantes de AKT1 reprimieron significativamente la actividad del promotor de Nanog con respecto al basal. Esto es similar a lo obtenido anteriormente en la línea NIH/3T3, indicando que, en este contexto tumoral, AKT1 no ejerce el mismo efecto que en CMP sobre la actividad de su promotor.

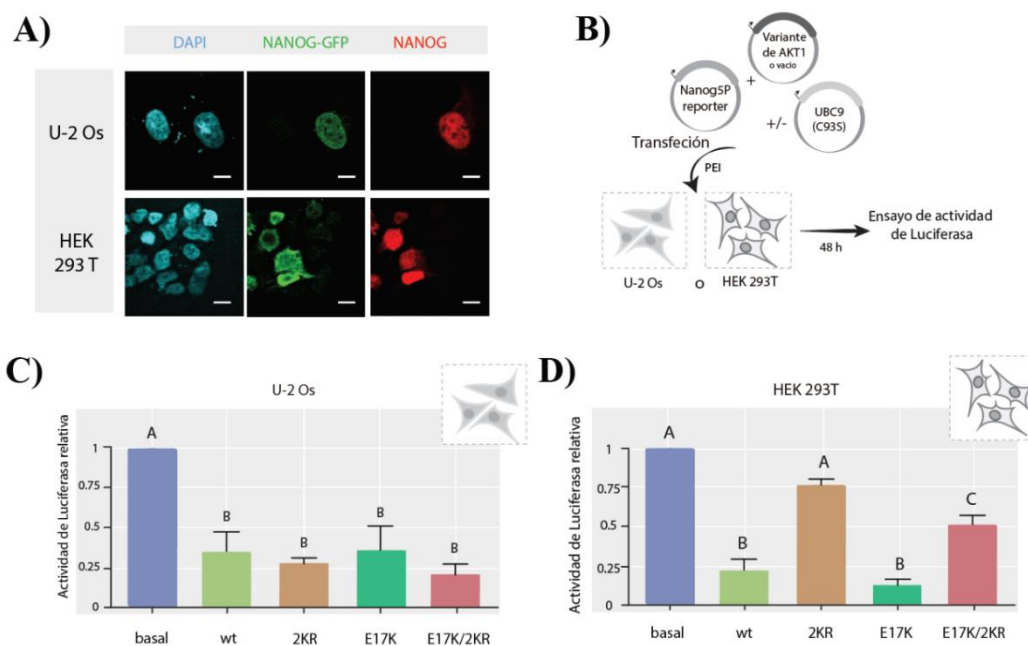


Figura R. 15. Efecto de la SUMOilación de AKT1 en las líneas celulares HEK 293T y U-2 Os. A) Imágenes representativas de IF en microscopía *widefield* de células U-2 Os y HEK 293T transfectadas con un vector de expresión de la proteína de fusión NANOG-GFP (verde). Se visualizó la fluorescencia de los núcleos con DAPI (en cian) y de la proteína de NANOG mediante anticuerpo específico (en rojo). Barra de escala = 20 μm. B) Esquema experimental de los ensayos de luciferasa empleados. C-D) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal) en las líneas celulares indicadas. En todos los casos los resultados se relativizaron al basal y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa ± Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. Adaptado de Francia et al. [204].

Por otro lado, en la Figura R. 15D se muestran los resultados obtenidos en la línea HEK 293T. Sorprendentemente obtuvimos un perfil distinto a los obtenidos hasta este momento. Por un lado, la variante AKT1 wt tuvo un efecto represor sobre la actividad de este promotor, tal como observamos

en las líneas MEF y U-2 Os. Sin embargo, la versión AKT1 2KR no produjo ningún efecto sobre el reportero. A su vez, la variante hiperactiva AKT1 E17K también reprimió a este promotor, mientras que su contraparte con SUMOilación disminuida, AKT1 E17K/2KR, perdió parcialmente este efecto represor. En resumen, sorprendentemente, en la línea HEK, las variantes SUMOilables de AKT1 disminuyeron significativamente la actividad del promotor de Nanog, mientras que esta represión se perdió parcial o totalmente al perderse su capacidad de ser SUMOiladas, sugiriendo una dependencia, de manera inversa, de esta MPT en este contexto celular, al igual que lo que ocurre en CME.

Estos resultados nos resultaron sumamente interesantes dado que AKT1 mostró tener efectos diferentes sobre el reportero de manera dependiente del contexto, dado que en unos casos indujo y en otros reprimió y además, en algunos casos parece depender de la SUMOilación, mientras que en otros parece ser independiente de esta MPT. Esto nos llevó a estudiar en mayor profundidad el último caso, en el que los resultados sugirieron dependencia de la SUMOilación, al igual que en CME, pero con un efecto contrario, es decir, represión en lugar de inducción. Para confirmar la dependencia de la SUMOilación del efecto represor de AKT sobre el vector reportero en la línea HEK 293T, evaluamos su actividad en presencia de las variantes SUMOilables de AKT1, pero interfiriendo con el proceso de SUMOilación mediante transfección de la dominante negativa de UBC9 usada anteriormente. Asimismo, dada la particularidad del resultado de las variantes más activas y SUMOilables, decidimos incluir en este ensayo la variante AKT1 MYR para evaluar si producía el mismo efecto represor y dependiente de la SUMOilación. Como fue mencionado anteriormente, la AKT1 MYR es una variante constitutivamente activa que posee una mutación no relacionada con el resto de las variantes de AKT1 usadas en este trabajo, que promueve su hiperactivación a partir de su translocación a la membrana. En la Figura R. 16, se muestran los resultados de este ensayo. En primer lugar, observamos que tanto para la AKT1 wt como para la E17K, el efecto represor se pierde al interferir con el proceso de SUMOilación en presencia de la UBC9(C93S), evidenciado por los niveles de actividad del promotor similares a los niveles del basal en cada caso (línea de puntos). Por otra parte, AKT1 MYR reprimió la actividad del promotor de Nanog, de manera similar a las otras AKT SUMOilables. Asimismo, observamos que este efecto se perdió en presencia de la UBC9(C93S), confirmando que el efecto sobre el promotor de Nanog en este sistema es opuesto, pero notablemente, también es dependiente de la SUMOilación de AKT1.

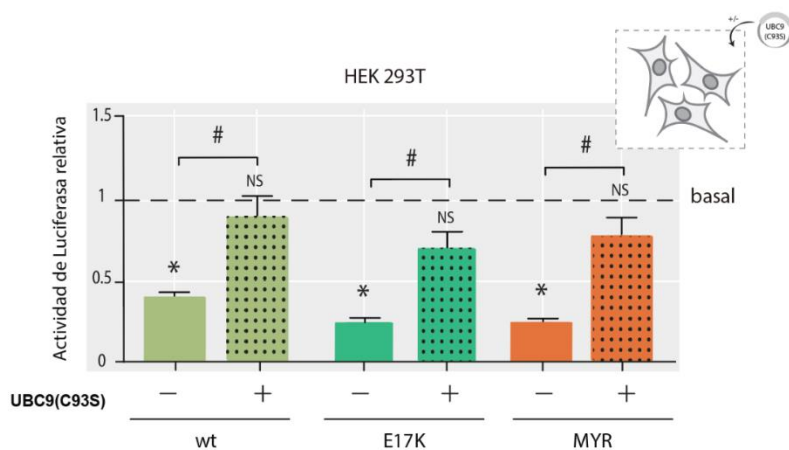


Figura R. 16. Consecuencias de la dominante negativa de UBC9 sobre el efecto de AKT1 en la línea HEK 293T. Efecto de las variantes de AKT1 wt, E17K y MYR sobre la actividad del promotor de Nanog en presencia (+) o ausencia (-) de la variante dominante negativa de la enzima conjugadora a SUMO UBC9, la UBC9(C93S). En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. El símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) de las variantes de AKT1 con su basal correspondiente (línea punteada), mientras que el símbolo sobre dos barras denota diferencias significativas (#) o no (NS) entre la misma variante de AKT1 +/- UBC9(C93S) ($p < 0.05$).

En conclusión, integrando los resultados obtenidos en las distintas líneas celulares, concluimos que el efecto inductor de Nanog ejercido por AKT1 en CME no es una respuesta universal consecuencia de la sobreexpresión de esta quinasa, sino que depende del contexto celular evaluado. Podríamos especular que la inducción observada es específica al menos dentro del contexto pluripotente y que la existencia de mecanismos moleculares distintos en cada uno de los contextos evaluados tienen un rol clave en el efecto de AKT1 sobre la expresión génica y de su dependencia de la SUMOilación. Más aún, haber encontrado contextos en los que el efecto de AKT1 no dependa de la SUMOilación, sugiere fuertemente que la dependencia de esta MPT no es únicamente consecuencia de diferentes niveles de actividad de la quinasa, sino que podría involucrar otro mecanismo, muy probablemente diferente capacidad de interacción con otros factores regulatorios. Por estos motivos, como detallamos en la siguiente sección, decidimos evaluar un contexto celular con diferentes características que los anteriores. Específicamente, nos pareció relevante estudiar que pasaba en un escenario que posee parte de la maquinaria de pluripotencia activa, pero con expresión de Nanog reprimida respecto a las CME e CMPI.

3.1.1.4.1 AKT1 induce el promotor de Nanog también a la salida de la pluripotencia naïve

Hasta ahora hemos determinado que la inducción del promotor de Nanog por AKT de manera dependiente de su SUMOilación se produce en dos modelos diferentes de CMP que expresan Nanog, y no así en líneas celulares diferenciadas que no expresan este TF. Por estas razones, decidimos

indagar un poco más en el contraste que hallamos entre células pluripotentes y células diferenciadas. Siguiendo con nuestra hipótesis que esta inducción ocurre en el contexto pluripotente pero no así en células diferenciadas, decidimos evaluar la respuesta del promotor de Nanog en otro contexto que podría proporcionar algunas pistas sobre el mecanismo detrás de este proceso; CME en una etapa temprana de diferenciación. Como mencionamos previamente, el medio de cultivo de mantenimiento de CMP, en el que realizamos los ensayos mostrados hasta ahora, contiene la citoquina LIF en conjunto con los inhibidores "2i", los cuales mantienen las CMP en estado naïve. Por el contrario, el cultivo de estas células en ausencia de estas moléculas desencadena la salida del estado pluripotente promoviendo la diferenciación. En este proceso, los niveles de expresión de los FTs de pluripotencia disminuye de manera diferente; mientras que la expresión de NANOG disminuye rápidamente luego de pocas horas, los niveles de OCT4 y SOX2 persisten durante un tiempo más largo como veremos a continuación. Durante las primeras 48 horas de la inducción de diferenciación por ausencia de LIF/2i (cambio de medio de propagación estándar conteniendo LIF y 2i por medio de cultivo sin estas moléculas), se desencadenan en las células procesos que conducen a cambios morfológicos claros; las células dejan de crecer en colonias compactas en tres dimensiones con bordes refringentes comenzando a propagarse en dos dimensiones y a distanciarse entre sí, adoptando una morfología un poco más ahusada (Figura R. 17A). Asimismo, luego de este periodo NANOG es casi indetectable (Figura R. 17B) mientras que OCT4 y SOX2 todavía son detectables (Figura R. 18) [106], [115].

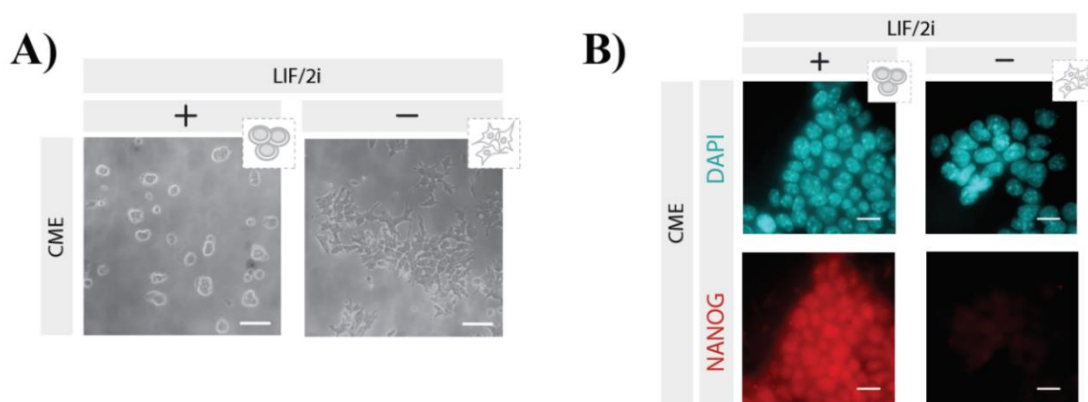


Figura R. 17. Cambios en CME al inicio de la diferenciación. Imágenes representativas de microscopía de CME cultivadas con (+) LIF/2i o inducidas a diferenciarse por tratamiento sin (-) LIF/2i durante 48 h. A) Imágenes de microscopía de contraste de fase donde se evidencian los cambios morfológicos. Barra de escala: 100 μ m. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia widefield. Los núcleos se tiñeron con DAPI (cian) y la presencia de NANOG fue revelada por IF mediante anticuerpo específico (rojo). Barra de escala: 20 μ m. Adaptado de Francia et al. [204].

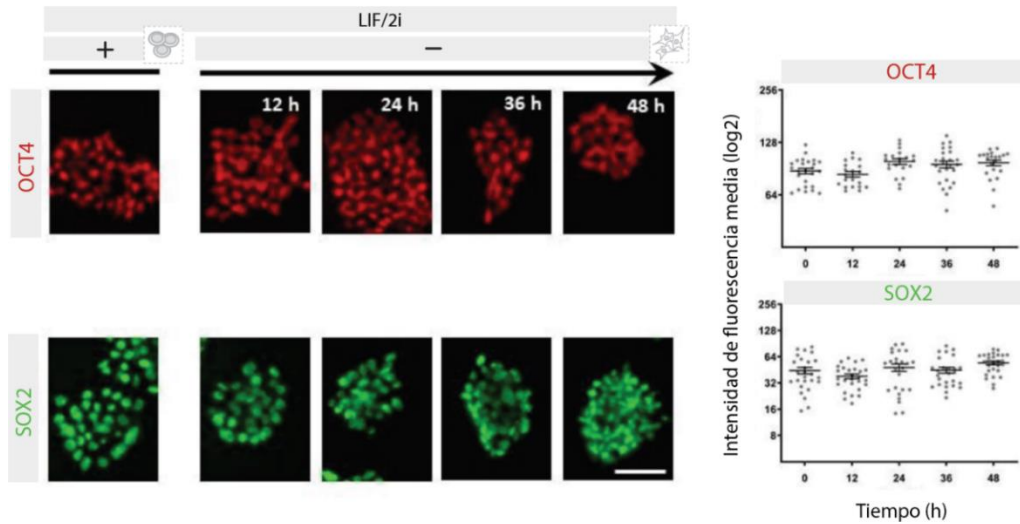


Figura R. 18. Expresión de OCT4 y SOX2 en el estado indiferenciado y en diferenciación temprano. Imágenes representativas de IF de OCT4 y SOX2 en CME cultivadas con (+) LIF/2i o inducidas a diferenciarse por tratamiento sin LIF/2i (-) por diferentes tiempos, hasta 48 h y su cuantificación. Barra de escala: 100 μ m. Adaptado de Veneri et al [106].

Para estudiar el efecto de AKT1 en el promotor de Nanog en el contexto de esta ventana temporal, analizamos la actividad del reportero luego de 48 horas de inducción de diferenciación por retiro de LIF y 2i (-LIF/2i), como esquematizado en la Figura R. 19A. Como esperábamos, la actividad basal de la luciferasa fue menor en las células en el proceso de diferenciación (-LIF/2i) que en las cultivadas en condiciones estándar (+LIF/2i) (Figura R. 19B). Sorprendentemente, al evaluar el efecto de las variantes de AKT1 en el promotor de Nanog, encontramos el mismo perfil obtenido en el contexto de pluripotencia naïve, es decir, aquellas variantes que pueden ser SUMOiladas inducen la actividad del promotor de Nanog mientras que las variantes de AKT1 con conjugación a SUMO disminuida no tuvieron ningún efecto (Figura R. 19C). Estos resultados evidencian un mecanismo conservado en las células pluripotentes incluso en etapas tempranas de la diferenciación, cuando Nanog ya está disminuyendo, pero otros TF de pluripotencia, u otros factores, aún están presentes.

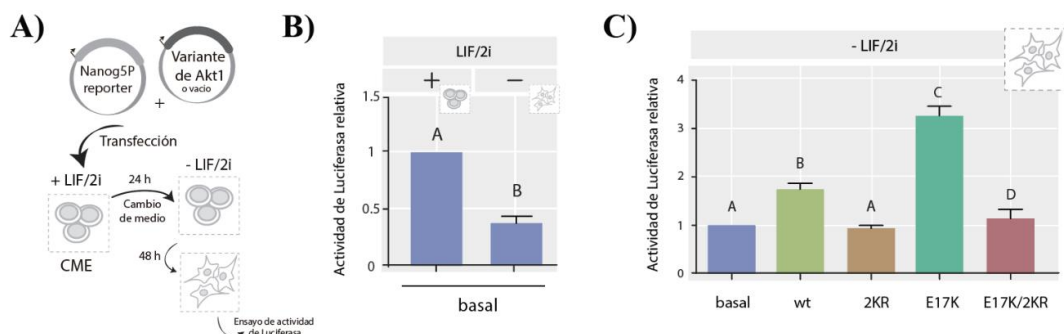


Figura R. 19. Efecto de las mutantes de AKT1 el promotor de Nanog en CME cultivadas durante 48 h sin LIF/2i. A) Esquema experimental de los ensayos de luciferasa. B) Niveles basales de actividad del reportero del promotor de Nanog en CME cultivadas con y sin LIF2i durante 48 h. C) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal) en CME cultivadas sin LIF2i durante 48 h. En todos los casos los resultados se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre condiciones. Adaptado de Francia et al. [204].

A partir de los resultados obtenidos en este contexto de diferenciación, donde concluimos que el efecto de AKT1 sobre el promotor de Nanog es detectable incluso a la salida de la pluripotencia naïve, decidimos evaluar el efecto de las variantes de AKT1 sobre el reportero del 3'UTR de Nanog en estas condiciones. En la Figura R. 9 habíamos mostrado el efecto de estas variantes en el estado pluripotente, en la cual no habíamos obtenido un perfil consistente con los efectos obtenidos a nivel promotor y proteína. Especulamos que las variantes SUMOilables podrían no tener un efecto a este nivel en las condiciones de cultivo en presencia de LIF+2i, pero podrían actuar sobre ciertos factores relacionados con la regulación post-transcripcional de Nanog que aparecen en el contexto de diferenciación. Utilizando el abordaje experimental presentado en la Figura R. 19A, pero en este caso usando el reportero pMIR-REPORT-Nanog3'UTR presentado anteriormente en lugar del reportero del promotor, analizamos el efecto de las variantes de AKT sobre el 3'UTR de Nanog para estudiar un posible efecto sobre la estabilidad y/o traducibilidad del ARNm de Nanog. Como mostramos en la Figura R. 20, observamos que en este contexto, en el cual sí existen factores que modulan negativamente la estabilidad del ARNm de este FT, en primer lugar, la sobreexpresión de AKT1 wt parece tener un efecto inductor, comparado con el basal correspondiente. Es interesante destacar que los niveles alcanzados son similares a la condición basal +LIF/2i con lo que parece lograr un efecto "protector" ante la diferenciación. Por otro lado, la mutante AKT1 E17K parece promover la estabilidad o traducibilidad de este ARNm aún en mayor medida que AKT1 wt. Estos resultados son diferentes a los observados en presencia de LIF y 2i (Figura R. 9D). Por el contrario, ambas variantes con SUMOilabilidad disminuida, AKT1 2KR y E17K/2KR, parecen tener un efecto negativo sobre esta región 3'UTR, tanto en estas condiciones (-LIF/2i, Figura R. 20), como en condiciones de pluripotencia naïve (+LIF/2i, Figura R. 9D). Es decir, estas variantes simulan o incluso acentúan el efecto negativo producido por las señales de diferenciación sobre el 3' UTR de Nanog.

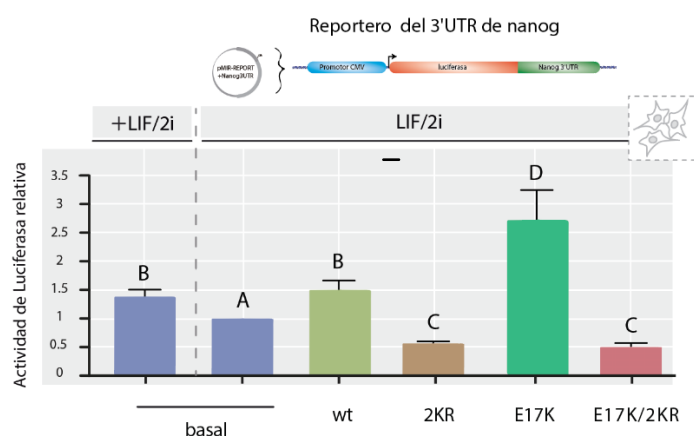


Figura R. 20. Efecto de las variantes de AKT1 sobre el reportero del 3'UTR de Nanog en condiciones de diferenciación. Efecto de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal) sobre el reportero del 3'UTR de Nanog en condiciones de cultivo que promueven la salida del estado pluripotente naïve (-LIF/2i), comparada con la condición basal en cultivo de rutina (+LIF/2i). En todos los casos la actividad de luciferasa se relativizó al basal (-LIF/2i) y los resultados se muestran como la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En conjunto, integrando los resultados obtenidos en los distintos contextos celulares, incluyendo los diferentes contextos de pluripotencia, concluimos que deben existir diferentes factores que median distintos mecanismos moleculares en cada uno de los contextos evaluados, definiendo, tanto la naturaleza del efecto de AKT1 en la regulación de la expresión de Nanog, como su dependencia de la SUMOilación de esta quinasa. Si bien nuestros resultados indicarían que esta regulación podría ser distinta en los diferentes niveles de regulación, el nivel transcripcional sigue siendo uno de los puntos centrales y es en el que nos enfocamos en este trabajo. Por lo tanto, a partir de los hallazgos principales de esta sección, donde encontramos que AKT1 modula la actividad del promotor de Nanog, especulamos que debe existir al menos un factor que actúa como intermediario en este efecto, a este nivel. Por lo tanto, como detallaremos en la siguiente parte, a partir de estos indicios, decidimos evaluar diferentes factores como posibles candidatos que medien esta regulación.

3.1.2 Parte II

Análisis de candidatos a mediar la inducción de Nanog por AKT1

En la parte I de este Capítulo, detallamos los experimentos cuyos resultados nos permitieron concluir que AKT induce la expresión de Nanog de manera dependiente de su SUMOilación. En un intento por dilucidar el mecanismo involucrado, todavía desconocido, pero con algunos indicios, hipotetizamos que existe al menos un factor que actúa como intermediario en la conexión entre esta MPT de AKT1 y la regulación de la expresión génica de Nanog. En esta parte, exploraremos más a fondo el mecanismo molecular detrás de esta regulación.

La expresión del gen Nanog está regulada por múltiples vías de señalización que involucran diferentes FTs [82], [84], [211]–[216]. Entre todos los posibles candidatos, ya sean inductores o represores, nos concentramos en aquellos que además de ser parte de la regulación de este gen y que se encuentren en el contexto de pluripotencia, posean alguna conexión reportada, ya sea directa o indirecta con la vía de señalización río abajo de AKT. Hipotetizamos que la perturbación, ya sea en la actividad o expresión, de un factor crucial para este efecto, interferiría con la inducción observada en el promotor de Nanog. Como iremos detallando, utilizamos diferentes abordajes experimentales para interferir con estos candidatos, dependiendo del tipo de factor y herramientas disponibles. En todos los casos analizamos si esta interferencia modificaba el efecto en el reportero de Nanog de las variantes de AKT1 descritas anteriormente. Como prueba de concepto, en la mayoría de estos ensayos usamos el Nanog5P reporter junto con la variante wt de AKT1, la cual induce la actividad de este promotor, y la mutante AKT1 2KR como control negativo, ya que su presencia no induce al reportero e indica que todo el proceso de inducción es dependiente de la SUMOilación en el contexto mostrado. La Figura R. 21 se esquematizan los resultados esperados en estos abordajes experimentales. El panel i muestra una situación control, sin interferir con ningún mediador específico, por lo tanto, el mismo se encontraría activo en nuestro sistema. Por otro lado, al interferir con un factor que no está relacionado con la regulación de Nanog por AKT1 o al menos no es un mediador esencial, esperamos obtener resultados similares a lo obtenido en el panel ii (y panel i). Finalmente, en el caso de interferir con un mediador esencial, esperamos que la inducción de la actividad del reportero en presencia de AKT1 wt disminuya en comparación con la observada en la condición de control (sin perturbaciones en el sistema), como se encuentra esquematizado en el panel iii.

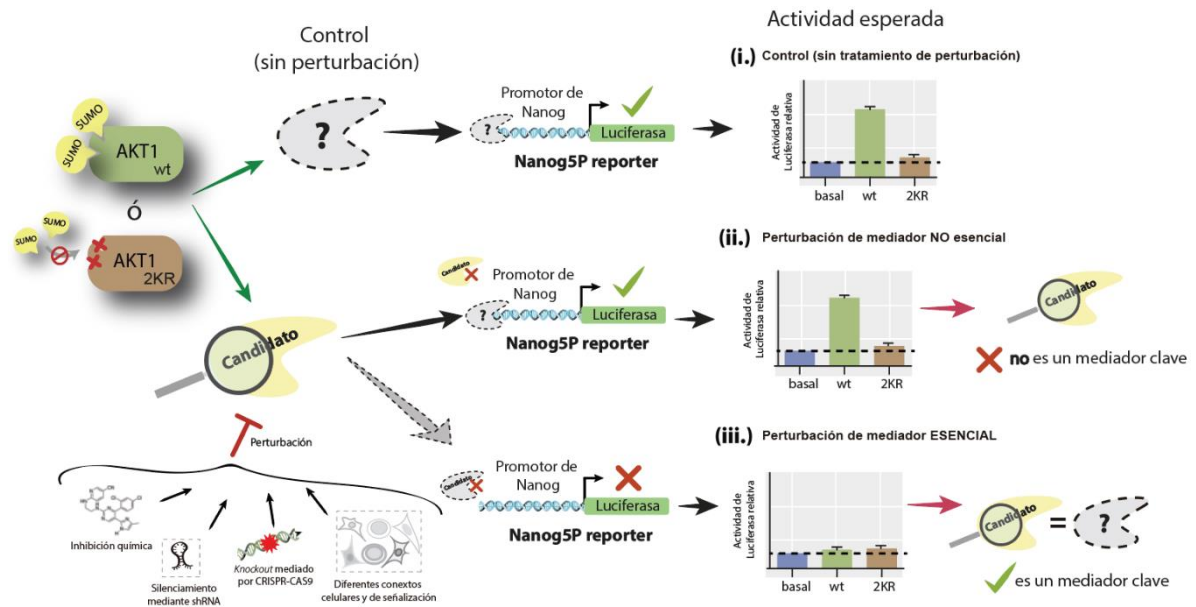


Figura R. 21. Hipótesis del mediador. Representación esquemática de los resultados esperados en los casos en que en el abordaje experimental no se interfiera con la función de ningún factor (panel i), se interfiera con un candidato que no sea un mediador esencial (panel ii) o se interfiera con un candidato que efectivamente sea un mediador esencial (panel iii). Adaptado de Francia et al. [204].

3.1.2.1 Las vías de GSK3β y MEK

Antes de profundizar en la búsqueda de un posible mediador, queremos hacer mención de dos vías en particular que bien podrían haber estado involucradas en este efecto, pero debido a las condiciones experimentales utilizadas, descartamos su participación, como lo explicamos a continuación.

Como mencionamos anteriormente, una de las principales conexiones entre AKT y Nanog es a través de la enzima Glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3β) [217]. La expresión de Nanog se induce tras la activación de la vía de señalización PI3K/AKT mediada por LIF y la posterior fosforilación e inactivación de GSK3β [218]. Si bien la regulación río abajo de esta quinasa es compleja y hay reportes contradictorios, existe cierto consenso en que GSK3β fosforila y activa TCF3, el cual es un represor transcripcional de varios genes de pluripotencia, incluido Nanog [54]. Por esto motivo, en un contexto de GSK3β inactiva, esta quinasa no produce la activación de Tcf3, contribuyendo positivamente a la expresión de Nanog y otros genes de pluripotencia. Estos antecedentes propondrían a GSK3β como un candidato trivial a mediar el efecto observado por AKT, y que podría depender de su SUMOilación.

Si bien existen diversas composiciones que puede tener el medio utilizado para propagar las CMP preservando el estado pluripotente (medios definidos, no definidos, con o sin suero e incluyendo o no diferentes inhibidores), la condición estándar de cultivo de estas células para su mantenimiento en

estado indiferenciado y pluripotente requiere solo el agregado de LIF al medio de cultivo con suero, el cual es suficiente para mantener la pluripotencia. En los últimos años se ha extendido el uso de dos inhibidores agregados al medio de cultivo de rutina. Estos inhibidores son el CHIR99021 y PD0325901, que inhiben de manera potente y específica a GSK3 y MEK respectivamente y que en su conjunto se denominan *2i*. El principal beneficio en la presencia de estos inhibidores es la promoción de un estado de pluripotencia naïve, cuyo perfil de expresión génica y características epigenéticas, son similares a las de CME presentes en el embrión en estadio pre-implantatorio. Si bien en este trabajo no estamos haciendo foco en las diferencias de los tipos de pluripotencia, nos interesa destacar que, hasta este punto, hemos demostrado que la SUMOilación de AKT1 es necesaria para la inducción de Nanog en CME, cultivadas en presencia de LIF y *2i*. A partir de estas observaciones, especulamos que ni las vías río abajo de GSK3 β ni de MEK son esenciales para esta regulación debido a que se encuentran inhibidas en nuestros ensayos por sus inhibidores específicos, por la presencia de *2i* en el medio. De todos modos, para confirmar esta hipótesis, evaluamos el efecto analizando el efecto de los inhibidores de manera separada; en presencia de LIF solo o con LIF y CHIR99021 o con LIF y PD0325901. Como mostramos en la Figura R. 22, en estas tres condiciones estudiadas, AKT1 wt produjo la inducción del reportero mientras que la AKT1 2KR no tuvo ningún efecto.

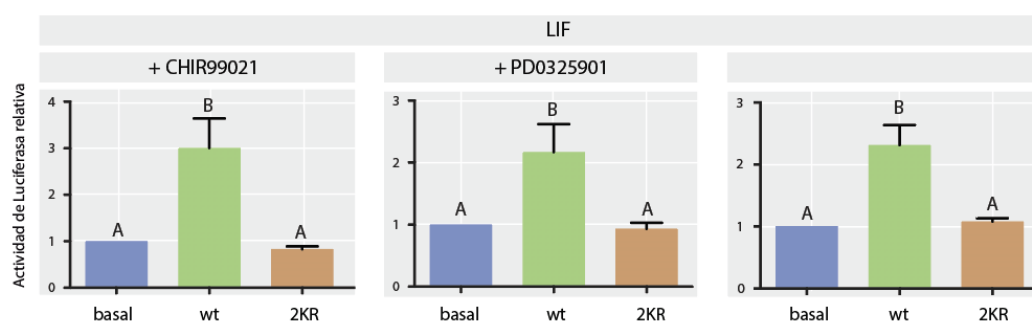


Figura R. 22. AKT induce la actividad del promotor de Nanog en presencia de los inhibidores CHIR99021 y PD0325901. Efecto sobre el promotor de Nanog en de las variantes de AKT1 wt, 2KR y el vector vacío (basal) en CME. En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente (línea punteada) y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. Adaptado de Francia, et al [174].

Estos resultados demuestran que AKT1 induce la actividad del promotor de Nanog de manera dependiente de la SUMOilación independientemente de la presencia de estos inhibidores, lo que revela que ni la vía río abajo de GSK3 β ni la de MEK son esenciales para este efecto.

3.1.2.2 Los factores de transcripción OCT4, SOX2, NANOG y KLF4

Como mencionamos anteriormente, los FTs OCT4, SOX2 y NANOG están involucrados en la regulación del gen Nanog en sistemas pluripotentes [80], [219]–[221]. Estos FTs constituyen una red principal de pluripotencia que induce la expresión de genes cruciales del estado pluripotente e inhibe aquellos que promueven la diferenciación celular [166], [167]. Se conoce que la fosforilación por diferentes quinasas, incluyendo AKT, afecta la actividad de estos FTs [222]–[227]. En particular, la fosforilación de OCT4 por AKT aumenta su estabilidad, promueve su localización nuclear y su interacción con SOX2 [224]; sin embargo, también acelera su degradación [227]. Además, AKT regula la expresión génica de Sox2 [223], y también fosforila a este factor de transcripción mejorando su estabilidad y actividad, requeridas para la reprogramación celular [225]. A partir de estos reportes previos, en conjunto con nuestros resultados que mostraron que la inducción de Nanog por AKT dependiente de SUMOilación ocurre en CMP, pero no en células terminalmente diferenciadas, hipotetizamos que estos FT podrían tener un papel clave en el efecto observado, ya que éstos son esenciales en CMP y en general no se expresan en células terminalmente diferenciadas.

Comenzamos realizando un análisis de comparación de datos de RNA-seq disponibles públicamente [202] con el objetivo de contrastar los niveles de expresión tanto de OCT4 como de SOX2 en CMP y MEF (Figura R. 23A). Como esperábamos, estos dos FTs centrales se expresan en CMP, tanto en CME como en CMPI, pero no en las MEF, lo que también verificamos por WB (Figura R. 23B).

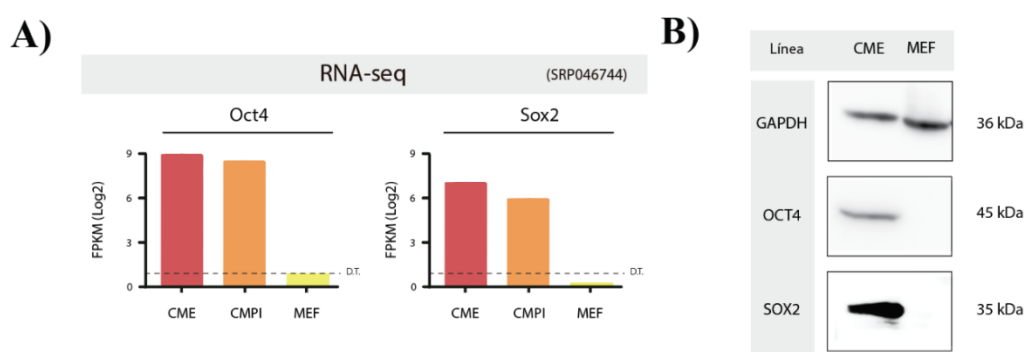


Figura R. 23. Expresión de Oct4 y Sox2 en CMP y MEF. A) Datos de expresión de RNA-seq (ARNm) de Oct4 y Sox2 de set de datos de CME, CMPI y MEFs disponibles públicamente. Se utilizó la plataforma de *datamining* Stemformatics para realizar el análisis [202], [203]. Los números identificadores de cada set de datos públicos se encuentran indicados en la figura. La línea de puntos indica el umbral de detección (D.T: detection threshold). B) Western blot correspondiente a extractos de proteínas totales de CME y NIH/3T3 (MEF). Se detectó la expresión de OCT4 y SOX2 con anticuerpo específico para cada uno y se utilizó GAPDH como control de carga. Adaptado de Francia et al. [204].

En este punto podemos afirmar que el efecto inductor de AKT sobre Nanog ocurre en contextos celulares que expresan OCT4 y SOX2; tanto en CMP en estado indiferenciado, como en las primeras

48 horas de diferenciación [106], [115] (Figura R. 18) y contrariamente, no ocurre en MEFs, las cuales no expresan estos FTs. Esta correlación, en conjunto con la importancia de estos FT en la regulación de Nanog y su relación con AKT, respalda nuestra hipótesis que sostiene que OCT4 y SOX2 son posibles mediadores del mecanismo molecular subyacente estudiado. Por estos motivos, continuamos con el estudio de la participación de estos FTs como intermediarios en la regulación de Nanog mediada por AKT. Además, en estos análisis decidimos incluir a NANOG como control. No esperamos que este FT desempeñe un papel fundamental en esta inducción, debido a que en el proceso de diferenciación temprana, donde encontramos efecto, su expresión y actividad se encuentran disminuidas (Figura R. 17 y Figura R. 19).

Comenzamos estudiando si estos FTs se unen efectivamente a la región del promotor de Nanog incluida en el reportero utilizado. Utilizamos la herramienta ChIP Atlas [228] para analizar datos públicos de experimentos de ChIP-seq realizados en CME [229]–[231] y confirmamos que OCT4, SOX2 y NANOG se unen a sitios presentes en la región incluida en el reportero Figura R. 24.

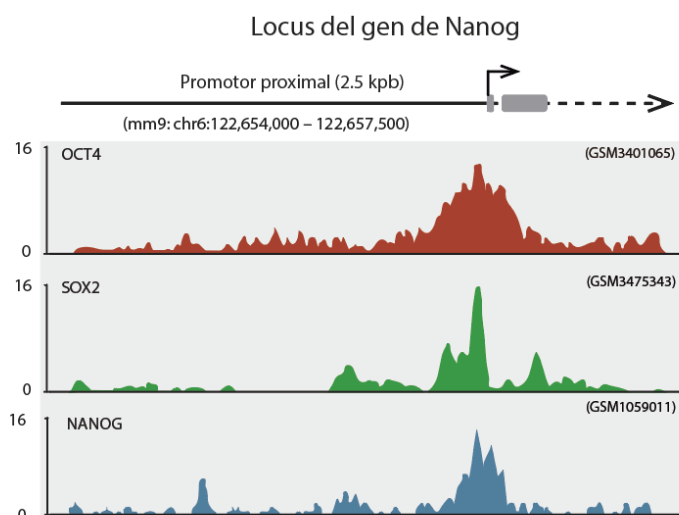


Figura R. 24. En CME los FTs OCT4, SOX2 y NANOG se unen a una región incluida en el reportero Nanog5P. Visualización representativa del perfil de enriquecimiento (lecturas por millón) de OCT4, SOX2 y NANOG en la región del locus genómico de Nanog de 2.5 kbp incluido en el reportero Nanog5P. Estos resultados corresponden al análisis de datos de ChIP-seq de experimentos realizados en CME, obtenidos de la base de datos pública ChIP Atlas. Los datos fueron visualizados usando el software Integrative Genomics Viewer (IGV). Los números identificadores de cada set de datos públicos se encuentran indicados en la figura. Adaptado de Francia et al. [204].

Con el objetivo de evaluar el posible rol de estos FTs en la vía de señalización de AKT1, nos propusimos disminuir su expresión mediante una estrategia de *knockdown* (silenciamiento génico, KD) por transfección de ARN de horquilla corta o mejor conocida como *short hairpin* ARNs (shARNs) específicos. Brevemente, se realizó la cotransfección de los vectores conteniendo los shARN específicos para cada FT o un control shARN contra la proteína GFP (shGFP) junto con las variantes wt

y 2KR de AKT1, como esquematizamos en la Figura R. 25A. Los vectores de shARN utilizados son plásmidos comerciales que ya se habían utilizado previamente en el laboratorio con resultados favorables [116], [206], [207], [232]–[235]. Evaluamos nuevamente la eficacia de cada shARN, mediante análisis por RT-qPCR con primers específicos, utilizando células transfectadas con shGFP como control y detectamos una reducción significativa en la expresión de cada uno de los FTs evaluados (Figura R. 25B). Sorprendentemente, al evaluar el efecto de AKT sobre el reportero, en ninguna de las condiciones en las que se disminuyó la expresión de estos FT, se obtuvo una respuesta consistente con lo esperado para un mediador esencial de este efecto; es decir, no se modificó la respuesta previamente obtenida en la actividad del promotor de Nanog en comparación con el shARN de control (Figura R. 25C).

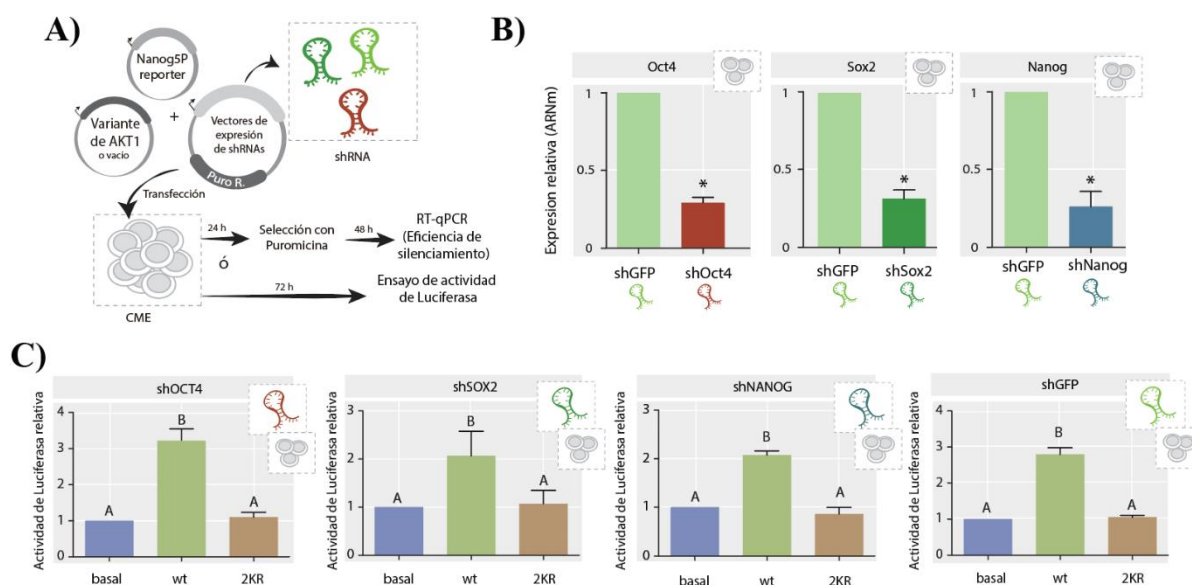


Figura R. 25. Efecto de la SUMOilación de AKT1 en contextos de *knockdown* de Oct4, Sox2 y Nanog. A) Abordaje experimental en el uso de shARN. B) Análisis de expresión génica de Oct4, Sox2 y Nanog mediante RT-qPCR en CME transfectadas con los shARN correspondientes. Los resultados fueron normalizados utilizando GAPDH como gen housekeeping, relativizados al control (shGFP) y se muestran como la media ± EE de al menos tres experimentos independientes. Asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$). C) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR y el vector vacío (basal) cotransfectadas con el shARN indicado. En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa ± Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. Adaptado de Francia et al. [204].

Estos resultados sugirieron que ninguno de estos tres FTs son mediadores exclusivos de este efecto. Si bien es poco probable, debemos mencionar que al no producir un *knockout* de estos genes, sino únicamente una disminución en su expresión, no podemos descartar completamente la participación, al menos parcial, de OCT4, SOX2 o NANOG, ya que, al reducir su expresión, los niveles restantes podrían ser suficientes para mediar parcialmente el efecto.

Por otro lado, además del *core* de pluripotencia, otros FTs como KLF4 y TBX3, entre otros, también han sido reportados como moduladores del gen Nanog [236]–[238], y también están regulados por

AKT [238]–[240]. Basados en estas evidencias, decidimos investigar si alguno de estos dos FTs son mediadores exclusivos de este efecto. Decidimos comenzar con KLF4 que además de ser un factor presente en el contexto pluripotente, y por lo tanto un posible mediador, ya contábamos con el shARN comercial, como herramienta disponible y probada en el laboratorio. Nuevamente, como se muestra en la Figura R. 26A, evaluamos si se une a sitios en la región promotora incluida en nuestro reportero, con resultados positivos. En la Figura R. 26B, mostramos la eficiencia en la disminución de la expresión del gen blanco producida por este shARN, la cual es similar a las eficiencias producidas por los vectores mostrados anteriormente, y finalmente en la Figura R. 26C se muestran los resultados del ensayo de luciferasa evaluando la actividad del promotor de Nanog y el efecto de AKT1. Nuevamente, observamos que el efecto obtenido coincide con el esperado para un factor perturbado que no es mediador esencial de esta inducción.

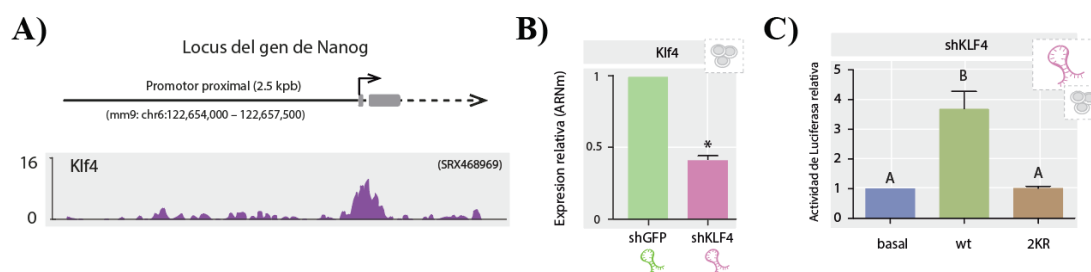


Figura R. 26. Efecto de la SUMOilación de AKT1 en contexto de *knockdown* de KLF4. A) Visualización representativa del perfil de enriquecimiento (lecturas por millón) de KLF4 en la región del locus genómico de Nanog incluido en el reportero Nanog5P, de datos de ChIP-seq de experimentos realizados en CME obtenidos de la base de datos público ChIP Atlas. Los datos fueron visualizados usando el software Integrative Genomics Viewer (IGV). Los números identificadores de cada set de datos públicos se encuentran indicados en la figura. B) Análisis de expresión génica de Klf4 mediante RT-qPCR en CME transfectadas con el shARN correspondientes. Resultados normalizados utilizando GAPDH, relativizados al control (shGFP) y mostrados como la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$). C) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR y el vector vacío (basal) cotransfectadas con el shARN de Klf4. Los resultados se relativizaron al basal y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes.

Finalmente, podemos descartar el rol del FT KLF4 como mediador esencial de la inducción de Nanog producida por AKT1. Si bien hemos evaluado candidatos fuertes a formar parte de esta vía, en este punto todavía no agotamos los candidatos que podrían tener un rol relevante en esta inducción. Por ejemplo, como detallamos en el siguiente apartado, TBX3, además de los FTs dentro del *core* de pluripotencia que fueron descartados, constituye uno de los posibles mediadores de esta regulación.

3.1.2.3 El factor de transcripción TBX3

TBX3 es un FT involucrado en el mantenimiento de la pluripotencia en CMP. Especialmente, se ha propuesto que la vía de PI3K/AKT activa a este FT con consecuencias en la regulación de la

transcripción del gen Nanog [237], [238]. Este FT no es detectado en NIH/3T3 [241], línea celular en la que previamente hemos encontrado que AKT no induce el promotor Nanog como ocurre en CMP, sino que su efecto es completamente diferente. Esta evidencia señala a este FT como un candidato fuerte para mediar el mecanismo que estamos estudiando. En primer lugar, estudiamos si este FT interactúa con la región del promotor de Nanog incluida en el reportero utilizado. Para esto, nuevamente, utilizamos la herramienta ChIP Atlas para analizar datos públicos de experimentos de ChIP-seq realizados en CME. Como se muestra en la Figura R. 27, encontramos que TBX3 se une a la región del promotor de Nanog incluida en el reportero, por lo que continuamos con el estudio de la posible participación de este TF.

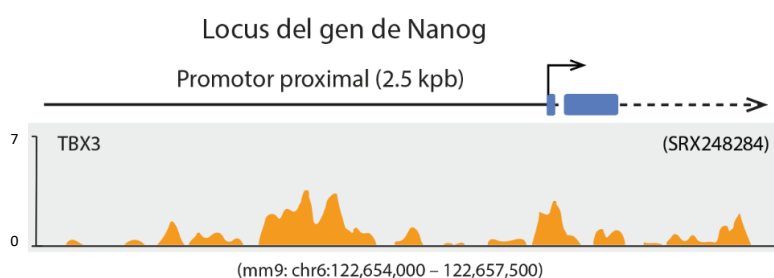


Figura R. 27. El reportero Nanog5P incluye sitios de unión a los que se une TBX3 en CME. Visualización representativa del perfil de enriquecimiento (lecturas por millón) de TBX3 en la región del locus genómico de Nanog de 2.5 kbp incluido en el reportero Nanog5P. Estos resultados corresponden al análisis de datos de ChIP-seq de experimentos realizados en CME, obtenidos de la base de datos público ChIP Atlas. Los datos fueron visualizados usando el software Integrative Genomics Viewer (IGV). Los números identificadores de cada set de datos públicos se encuentran indicados en la figura.

Con el objetivo de evaluar la posible relevancia de TBX3 en la vía de señalización de AKT1, nos propusimos realizar nuevamente ensayos de silenciamiento de este FT por shARN. Debido a que no contábamos con esta herramienta, realizamos una búsqueda bibliográfica de posibles secuencias blanco previamente utilizadas y que hayan tenido buenos resultados en el silenciamiento y encontramos posibles secuencias [242]. A continuación, enviamos a sintetizar los oligonucleótidos elegidos para clonar en el vector Tet-pLKO-puro que sirve para realizar silenciamiento mediante la estrategia de shARN, y que además es inducible por Doxiciclina (Addgene Plasmid #21915, Figura R. 28A). En la Figura R. 28B se muestra un esquema del sitio de unión del shARN a la región 3'UTR del transcripto de Tbx3. Las secuencias específicas se encuentran detalladas en la Tabla 3 de la sección Materiales y métodos. En el momento en que llegaron los oligonucleótidos, fueron resuspendidos, hibridados para la formación del oligonucleótido doble cadena y clonados en el vector mencionado. Luego de obtener clones, elegimos dos y los enviamos a secuenciar. En paralelo, evaluamos la capacidad de silenciamiento del gen blanco de estas construcciones. Transfectamos CME con estos plásmidos, y dada la baja eficiencia de transfección de las CME, para evitar que se diluya el material con células sin transfectar, realizamos una selección de las células transfectadas con el antibiótico puromicina por 48 h, cuyo gen de resistencia se encuentra codificado en el vector de clonado (Figura R. 28A). Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas, purificamos ARN total y

cuantificamos los niveles de ARNm de Tbx3 mediante RT-qPCR. Realizamos varios intentos de silenciamiento con ambas construcciones, pero no obtuvimos el nivel de silenciamiento esperado con ninguna. En la Figura R. 28C se muestran los resultados de estos intentos. Antes de continuar, analizamos los resultados de la secuenciación de los vectores realizada en paralelo y detectamos que ambos clones independientes tenían varias mutaciones cuando se compararon con los oligonucleótidos originales ordenados y que estas mutaciones eran exactamente las mismas en ambos clones Figura R. 28D.

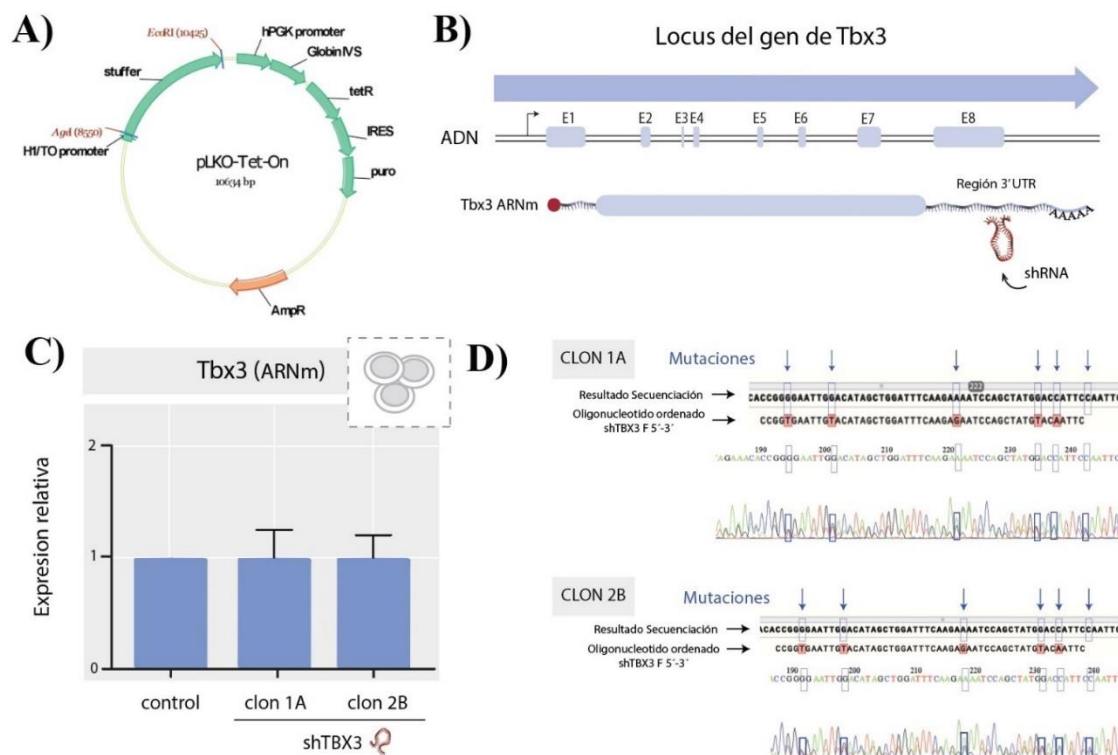


Figura R. 28. Generación de vectores del sistema shARN para silenciamiento de Tbx3 y su evaluación. A) Esquema del vector Tet-pLKO-puro, Addgene Plasmid #21915. B) Esquema de los sitios blanco en el ARNm de Tbx3 del shARN utilizado. C) Para estudiar la eficiencia de silenciamiento de Tbx3 por dos clones del vector shARN generado, se analizaron los niveles de ARNm de Tbx3 mediante RT-qPCR de las células transfectadas seleccionadas mediante tratamiento con puomicina durante 48 h. Los resultados fueron normalizados utilizando la media geométrica de Gapdh y Pgl1 y referidos al control (células transfectadas con shGFP). Las barras representan la media relativa ± Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. D) Comparación de la secuencia de oligonucleótidos enviada a sintetizar con el resultado de la secuenciación de los clones independientes del vector generado conteniendo el shARN contra Tbx3.

Esto nos llevó a razonar que las mutaciones no ocurrieron durante el proceso de clonado, sino que los mismos oligonucleótidos sintetizados ya tenían las mutaciones detectadas. Por este motivo, enviamos un reclamo y pedido de resíntesis de los oligonucleótidos y volvimos a realizar todo lo anteriormente descrito, obteniendo los mismos resultados de falta de silenciamiento. No entraremos en detalle en los intentos posteriores con estas nuevas construcciones, pero comentamos brevemente que intentamos generar líneas estables que expresaran el shARN específico para Tbx3 de manera inducible y tampoco tuvimos éxito en el silenciamiento. Como en este punto este FT seguía

siendo un candidato fuerte a ser el mediador del efecto sobre Nanog, descartamos este abordaje y diseñamos otro, cuyos resultados serían más determinantes; decidimos generar una línea de CME *knockout* (KO) del gen Tbx3.

Con este nuevo objetivo, realizamos una búsqueda bibliográfica de grupos que hayan reportado la generación de líneas Tbx3-KO, especialmente mediante el sistema CRISPR-Cas9 debido a su simplicidad, alta eficiencia y a que en el laboratorio se habían generado previamente líneas KO mediante esta estrategia [116], [243]. Tanto en este caso como en el del shARN decidimos utilizar secuencias previamente reportadas para aumentar las posibilidades de éxito. Encontramos un grupo que había generado una línea Tbx3-KO de CME [244], al cual contactamos y gentilmente nos envió los vectores PSpCas9(BB)-2A-Puro conteniendo los ARN guías (sgARN) para el gen de Tbx3. Como se esquematiza en la Figura R. 29A, contamos con dos guías, una con sitio blanco en el exón 1 de este gen y el otro en el exón 2. Si bien tanto las secuencias específicas de estos sgARNs como la obtención de esta línea KO se encuentra detallada en la sección de materiales y métodos (Tabla 3), comentamos brevemente que se realizó la transfección de CME con estos plásmidos y realizamos la selección de las células transfectadas con el antibiótico Puromicina por 48 h para quedarnos con aquellas células que, por ser resistentes a este antibiótico, nos aseguramos que hayan estado expuestas a la presencia de la construcción transfectada. Luego de la amplificación de esas células en medio de propagación sin antibiótico, realizamos una selección de clones. Cultivamos las células en muy baja densidad y luego de 72-96 h, obtuvimos colonias clonales separadas entre sí y lo suficientemente grandes para poder colectarlas manualmente. Bajo una lupa y con un *tip* de punta fina, pasamos algunas colonias a otros pocillos individuales para lograr su propagación. Elegimos uno de los clones y evaluamos la presencia de la proteína TBX3 con un anticuerpo específico tanto por IF como por WB, confirmando la ausencia de esta proteína en el clon elegido y por lo tanto la interrupción en ambos alelos de este gen (Figura R. 29B-C). Este clon además posee morfología y ciclo celular normal, comparado con la línea parental (Figura R. 29D).

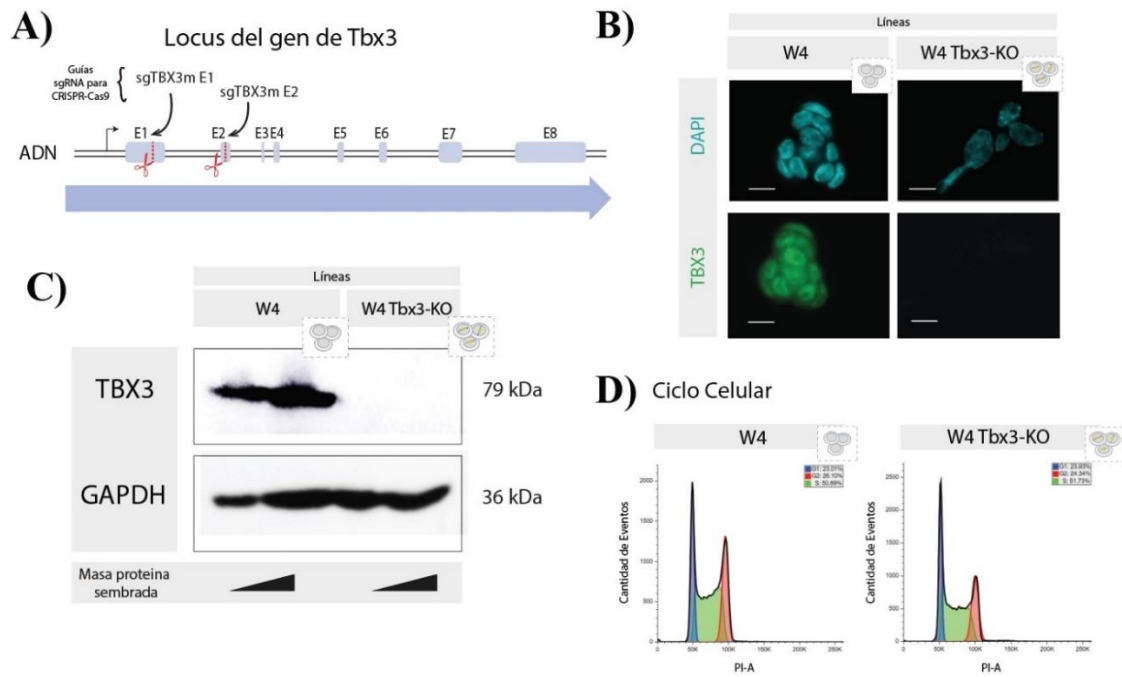


Figura R. 29. Generación de la línea de CME W4 Tbx3-KO. A) Esquema de los sitios blanco en el genoma de ratón de los ARN guías (sgARN). B) Imágenes representativas de IF en microscopía widefield de las líneas CME W4 parental y W4 Tbx3-KO. Los núcleos se tiñeron con DAPI (cian) y la presencia de Tbx3 fue revelada mediante anticuerpo específico (verde). Barra de escala: 10 μ m. C) Western blot correspondiente a extractos de proteínas totales de la línea parental (W4) y W4 Tbx3-KO. D) Perfil del ciclo celular fue analizado mediante tinción con yodo de propidio seguido de citometría de flujo.

Una vez obtenida esta línea W4 Tbx3-KO, estudiamos el efecto de las variantes de AKT1 en el reportero de Nanog anteriormente usado. Como se muestra en la Figura R. 30D, la actividad basal del reportero fue más baja en la línea Tbx3-KO en comparación con la parental, consistente con la actividad inductora de este FT sobre la expresión de Nanog y además evidenciando que este reportero es sensible a la ausencia TBX3. Si bien esperábamos obtener un resultado diferente dado que hay evidencias fuertes que sugieren que este TF podría ser el mediador buscado, la ausencia de TBX3 no modificó el efecto de las variantes de AKT1 en el ensayo del reportero de Nanog, mostrando la inducción característica de AKT1 wt y la ausencia del efecto con la mutante 2KR (Figura R. 30E). Además, incluimos las variantes que incluyen la mutación E17K, también obteniendo el mismo perfil de inducción, reforzando la conclusión obtenida.

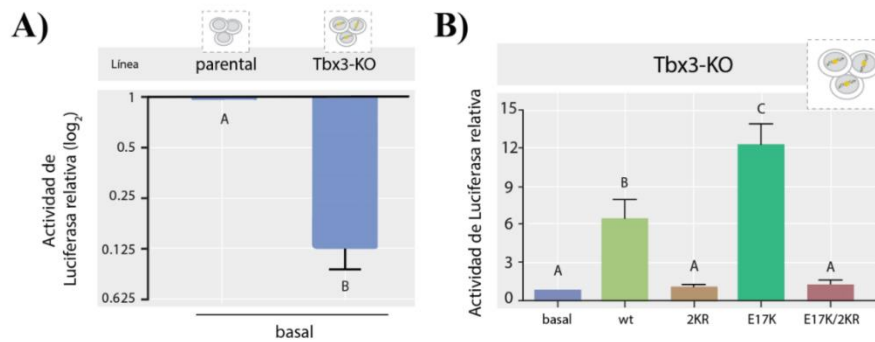


Figura R. 30. AKT induce la actividad del promotor de Nanog en ausencia de TBX3. Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR, E17K, E17K/2KR y el vector vacío (basal) en la línea parental de CME y Tbx3-KO. En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente (línea punteada) y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes. Adaptado de Francia, et al [174].

Estos resultados, al haber sido obtenidos en una línea *knockout* del gen de Tbx3, excluyen absolutamente a este FT candidato como un mediador esencial del efecto estudiado. En este punto, antes de cambiar completamente de estrategia experimental, y aprovechando herramientas disponibles, decidimos dar una última oportunidad a la búsqueda del mediador, analizando otro FT con una conexión conocida entre AKT1 y la regulación de Nanog: la proteína p53.

3.1.2.4 La proteína supresora de tumores p53

La proteína supresora de tumores p53 es un FT involucrado en múltiples procesos celulares como la regulación del crecimiento, ciclo celular, proliferación y muerte, en múltiples sistemas. Su regulación es muy compleja e involucra múltiples vías de señalización, incluyendo a PI3K/AKT. En particular, AKT regula los niveles de p53, tanto de forma positiva como negativa con una fuerte dependencia del contexto celular. Además, se conoce que p53 reprime la transcripción del gen Nanog mediante la unión directa a su promotor y reclutamiento del correpresor mSin3a [245]. Basados en estas evidencias previas, especulamos que p53 podría estar involucrado en la inducción del promotor de Nanog por AKT1, de manera inversa respecto a lo que esperábamos de TBX3 o de otros TFs inductores. Es decir, hipotetizamos que AKT1 podría interferir con la represión de p53 sobre Nanog incluso en el contexto pluripotente; recordemos que la regulación fina de estos factores es el producto del balance de múltiples FTs con diferentes funciones que responden a diferentes estímulos.

Para estudiar la dependencia de p53, analizamos el efecto de las variantes de AKT1 sobre el reportero de Nanog en una línea de CME, también derivada de la línea W4, en la cual ambos alelos del gen p53 fueron previamente *knockeados* (p53-KO) en el laboratorio [48]. Como esperábamos, debido al efecto represor de p53 sobre Nanog, el nivel basal de luciferasa fue más alto en las células

p53-KO en comparación con la línea celular wt (Figura R. 31A). Consistentemente, la cotransfección de un vector de sobreexpresión de p53 wt produjo una disminución de la actividad luciferasa, validando tanto la sensibilidad del reportero a la ausencia de este FT, como también su amplio rango dinámico. Al evaluar el efecto de las variantes de AKT en el contexto p53-KO, la versión wt produjo la inducción del promotor de Nanog la mutante 2KR no tuvo efecto (Figura R. 31B), mostrando la respuesta esperada para un candidato no mediador. A su vez, en el experimento de rescate donde incluimos el vector de sobreexpresión de p53 wt previamente mencionado, se obtuvieron resultados similares (Figura R. 31C).

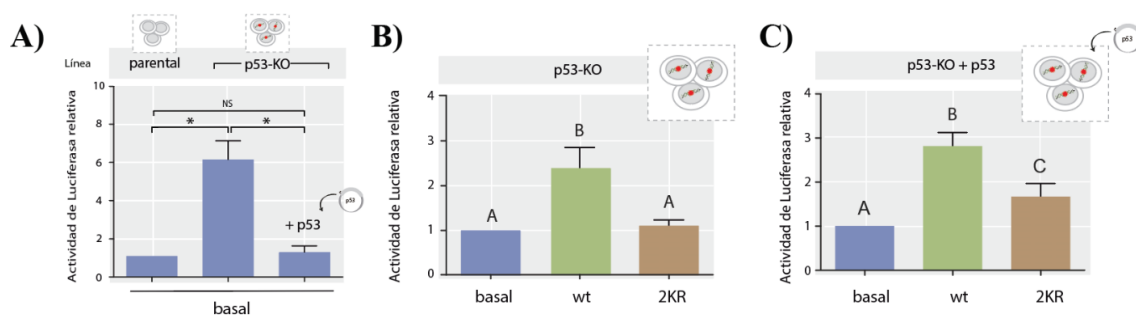


Figura R. 31. AKT1 induce la actividad del promotor de Nanog en ausencia de p53. A) Niveles basales de actividad del reportero del promotor de Nanog en la línea CME parenta, p53-KO y p53-KO transfectada con p53 wt (rescate). B-C) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de AKT1 wt, 2KR y el vector vacío (basal) en la línea p53-KO (B) y p53-KO transfectada con p53 wt (rescate) C). En todos los casos los resultados se relativizaron al basal de la condición correspondiente y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de al menos tres experimentos independientes. En panel A, el símbolo sobre las barras indica diferencias significativas (*) o no (NS) entre las diferentes condiciones ($p < 0.05$). En los paneles B y C, letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre variantes.

Estos resultados demuestran que la ausencia de p53 no desacopla la vía de señalización río abajo de AKT1, que en última instancia impacta sobre la actividad del promotor de Nanog. En conclusión, p53 no es un factor fundamental para el mecanismo de inducción estudiado.

3.1.2.5 Nuevos candidatos revelados por análisis bioinformático

En conjunto, nuestros resultados descartaron las vías río abajo de GSK3- β y MEK y a los FTs OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, TBX3 y p53 como mediadores esenciales de la inducción de Nanog por AKT1, dependiente de SUMOilación. Estos resultados, hasta ahora negativos en cierto sentido, pero aun así muy informativos, nos llevaron a considerar un nuevo enfoque para intentar develar el todavía elusivo, mecanismo molecular subyacente a esta regulación. Como adelantamos al comienzo de este capítulo, dado que el efecto de AKT1 sobre el promotor de Nanog en MEF es completamente opuesto en comparación con las CMP, hipotetizamos que un factor crucial para el efecto encontrado en las CMP debe estar presente en este contexto, es decir, tanto en las CME como en las CMPI, pero ausente

en las MEF. Con el objetivo de detectar diferencias que puedan proporcionar una pista sobre el mediador buscado, realizamos un análisis exploratorio de un conjunto de datos disponibles públicamente provenientes de RNA-seq de CME, CMPI y MEF [202]. Comenzamos cruzando los datos de transcriptómica de cada uno de los tres tipos celulares. En la Figura R. 32A se muestra el patrón de expresión, representando en un diagrama de Venn los genes expresados específicos y compartidos en los diferentes escenarios. Definimos grupos I a VII, basados en el número de genes contenidos y el o los tipos de células en el que se expresan. Para acotar la lista de posibles candidatos que surgieran de este análisis, obtuvimos una lista curada y actualizada a la fecha del análisis (diciembre 2022) de proteínas que son fosforiladas por AKT1, utilizando la base de datos *PhosphoSitePlus* [246]. Finalmente, cruzamos la información de ambos análisis para identificar los genes blanco de AKT1 presentes en los diferentes grupos, como se observan mapeados sobre diagrama de Venn en la Figura R. 32B. Somos conscientes que esta lista puede no estar completa debido a que algunos blancos de AKT1 pueden no haber sido identificados o incluidos en la base de datos a la fecha. Por otro lado, como se esperaba, la mayoría de los blancos de AKT1 se asignaron dentro del grupo que contenía los transcritos compartidos entre los tres tipos celulares (grupo I), y solo unos pocos se ubicaron en el resto de los grupos específicos.

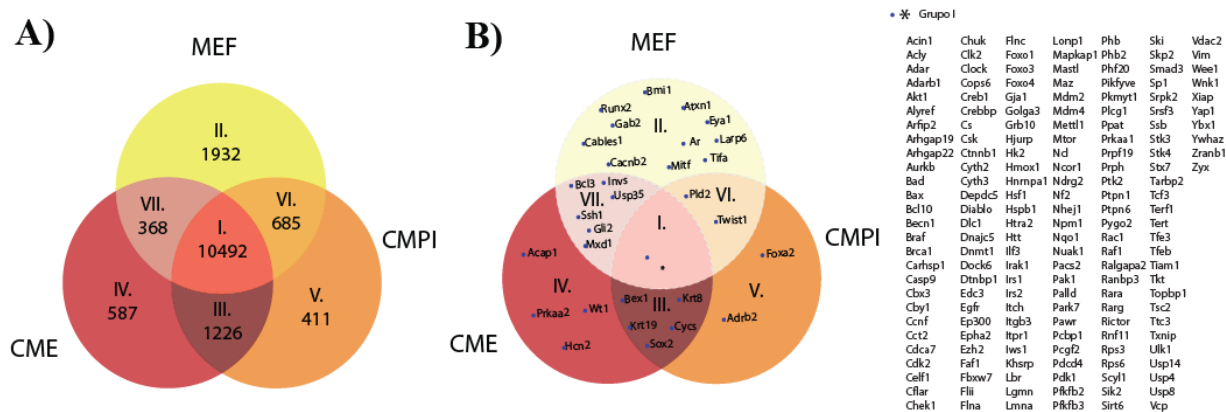


Figura R. 32. Análisis transcriptómico de CME, CMPI y MEF. Análisis de un conjunto de datos disponible públicamente de un experimento de RNA-seq de CME, CMPI y MEF (SRP046744). A) Diagrama de Venn que muestra los genes expresados de cada línea celular por encima del umbral, agrupados por la intersección de transcritos de los tres tipos celulares. Los grupos se numeran arbitrariamente del I al VII dependiendo de la cantidad de transcritos que contienen. B) Análisis de cruzamiento de datos entre los grupos de transcritos determinados con la lista actualizada de blancos de AKT1 disponible en *PhosphoSitePlus*. Adaptado de Francia et al. [204].

En este caso, son de nuestro interés aquellos blancos de AKT1 en los grupos III, IV y V, que se expresan en las células pluripotentes, condiciones en las que detectamos la inducción dependiente de SUMO, pero no en las MEF. Estos genes muestran en la tabla de la Figura R. 33 A.

A)

Grupo	Gen	Uniprot #	Función asociada
IV	Acap1	Q8CI47	Proteína activadora de la GTPasa para la familia del factor de ribosilación ADP
	Hcn2	O88703	Canal activado por hiperpolarización de nucleótidos cíclicos
	Prkaa2	Q8BRK8	Subunidad catalítica alfa-2 de la proteína quinasa activada por AMP 5'
	Wt1	P22561	Proteína homóloga al tumor de Wilms - Factor de transcripción
III	Bex1	Q9R224	Molécula adaptadora involucrada en la señalización de p75NTR/NGFR
	Cyts	P62897	Citocromo c - Proteína transportadora de electrones
	Krt19	P19001	Queratina, tipo I, citoesquelética 19 - Organización de las fibras musculares
	Krt8	P11679	Queratina, tipo I, citoesquelética 8 - Organización de las fibras musculares
V	Sox2	P48432	Desarrollo embrionario - Factor de transcripción
	Adrb2	P18762	Receptor adrenérgico beta-2
	Foxa2	P35583	Factor de transcripción nuclear de hepatocitos 3-beta

B)

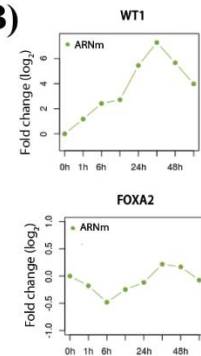


Figura R. 33. Genes blanco de AKT1 expresados en CMP. A) Detalle de la función asociada a los genes blanco de AKT1 expresados en CMP según Uniprot. B) Niveles de expresión del ARNm de Foxa2 y Wt1 (log₂ fold change) a partir de un análisis de RNA-seq de CME diferenciadas a EpiLSCs. El análisis de datos se realizó en la plataforma de datamining Stem Cell Atlas a partir de datos multiómicos disponibles públicamente. Adaptado de Francia et al. [204].

Aunque ninguno de ellos ha sido vinculado directamente con la expresión de Nanog en CME, a excepción de Sox2, creemos que constituyen un excelente grupo de candidatos para futuros análisis, especialmente aquellos factores involucrados en vías de señalización o identificados como FT, específicamente Foxa2 y Wt1. Destacamos que estos dos FTs permanecen expresados en las etapas tempranas de un protocolo de diferenciación a células de tipo epiblasto (EpiLCs) [247] como se reveló por el análisis de datos ómicos disponibles (Figura R. 33B), lo cual es compatible con la inducción de Nanog por AKT1 incluso en las etapas tempranas de diferenciación, demostrado en el capítulo anterior (Figura R. 19).

Con respecto a estos dos FTs señalados en particular, WT1 se expresa en varios tipos de cáncer y está asociado con la vía PI3K/AKT y el mantenimiento de las características de células madre en cáncer [248]. Además, es importante durante la embriogénesis; está involucrado en el desarrollo de múltiples órganos y tejidos y en los últimos años se ha descubierto que también regula la expresión génica a nivel epigenético [249].

Por otro lado, Foxa2 es un FT pionero involucrado en la diferenciación a linajes endodérmicos [250], es necesario para la remodelación de la cromatina durante la diferenciación pancreática e interviene en el remodelado de nucleosomas durante la diferenciación de CME [251]. Nos resultó sumamente interesante que la fosforilación de este FT por AKT promueve su exclusión nuclear y la consecuente inhibición de su actividad transcripcional, tanto en condiciones de activación de AKT1 por insulina, como en cáncer de mama [252], [253]. Esta evidencia destaca a este FT como un fuerte candidato para mediar la regulación de Nanog por AKT. Además, debido a que se ha reportado que FOXA2 recluta corepresores en ciertos sitios blanco [254], especulamos que las variantes SUMOilables de AKT1 podrían inducir indirectamente la expresión de Nanog al promover la exclusión nuclear de

FOXA2 en contextos pluripotentes. Esta hipótesis se encuentra en estudio hasta el momento de escritura de esta tesis.

En síntesis, en este capítulo hemos demostrado que AKT1 induce la expresión de Nanog de manera dependiente de su SUMOilación en CMP (Parte I) y aportamos indicios sobre el mecanismo molecular subyacente a esta regulación (Parte II), que hasta este momento resulta elusivo. Con respecto a esto último, conocemos cuales de los factores triviales río abajo de AKT1 no son esenciales en este mecanismo de regulación de Nanog bajo nuestra hipótesis. Sin embargo, nuevos candidatos surgieron de análisis bioinformáticos de datos públicos, los cuales se encuentran en estudio.

3.2 Capítulo 2

Las diferentes variantes de AKT1 tienen distinta distribución subcelular y afectan diferencialmente parámetros que modulan la expresión génica

Como mencionamos anteriormente, se conoce que la localización de las biomoléculas entre de los diferentes compartimentos celulares y su distribución dentro de éstos impacta en diferentes procesos [103]. Por ejemplo, la compartimentación de ciertas proteínas puede modular sus interacciones con otras biomoléculas y, en consecuencia, la velocidad de reacciones enzimáticas y la ocurrencia de diversos procesos celulares. Diferentes parámetros impactan en el direccionamiento y distribución de las proteínas; entre ellas, las diferentes MPTs que éstas pueden sufrir. Específicamente, con respecto a la SUMOilación, la MPT que es foco de este trabajo, puede modular la localización y acumulación nuclear de algunas proteínas [148], [149] y también puede afectar de manera directa ciertas interacciones proteína-proteína [150]. En paralelo a los efectos encontrados en CME sobre la regulación de Nanog, especulamos que la SUMOilación de AKT1 podría estar añadiendo una capa adicional de regulación de su función, modulando su distribución y probablemente impactando en su señalización río abajo. En particular, la organización subcelular de AKT1 podría verse modificada por esta MPT, modulando no solo su activación, sino también la disponibilidad y probabilidad de encontrar proteínas que interactúan con ésta, por lo tanto, afectando su función de manera específica para cada contexto celular.

En este contexto, nuestros análisis preliminares sobre la distribución de AKT1 realizados en células fijadas, sugirieron que esta MPT no afecta el reclutamiento de AKT1 a la membrana plasmática en CME (capítulo 1) [174]. Esta observación es importante en el contexto de AKT1, dado que la traslocación a membrana es un requisito fundamental para la activación de esta quinasa debido a la localización de las quinasas PDK1 y mTORC2, que activan AKT1 mediante fosforilación [131], [132]. Si bien todas las variantes de AKT en principio son susceptibles a estos eventos de translocación transitoria a la membrana y posterior fosforilación, recordemos que las variantes que contienen las mutaciones E17K (la AKT1 E17K y E17K/2KR) fueron las que presentaron una localización preferencial en la membrana plasmática con respecto a las otras (wt y 2KR). Sin embargo, de estas dos mutantes, únicamente la variante SUMOilable AKT1 E17K indujo la expresión de Nanog, mientras que la variante con SUMOilación disminuida, E17K/2KR, no mostró efecto alguno sobre la expresión de este gen. Esta falta de correlación entre el efecto de la SUMOilación de AKT sobre su localización preferencial en la membrana y sus efectos río abajo en la expresión de Nanog, nos llevó a explorar más en detalle el impacto de esta MPT en la distribución de esta quinasa. Especulamos que la SUMOilación puede tener

efectos sobre la localización subcelular de AKT1, que pueden no haber sido detectados en el análisis anterior, o que pueden haber estado enmascarados producto del proceso de fijación. Por este motivo, decidimos abordar un diseño experimental en células vivas que nos permitan realizar un análisis más profundo sobre la distribución de AKT y a su vez, el estudio de procesos dinámicos, como describiremos más adelante. Para esto, generamos vectores de expresión que codifican las distintas variantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas [255] utilizadas previamente [174], pero fusionadas a la proteína fluorescente *mCherry*. Estas proteínas de fusión, además, abrieron nuevas posibilidades para el estudio de procesos dinámicos tanto sobre la misma AKT, como su efecto sobre otras proteínas; específicamente, proteínas asociadas a la cromatina y los FTs de pluripotencia que serán abordadas más adelante en este capítulo.

3.2.1 Generación de vectores de expresión codificantes de variantes *mCherry*-AKT1

En la sección correspondiente de materiales y métodos describimos en detalle la generación de estas construcciones. Brevemente, como se encuentra esquematizado en la Figura R. 34, utilizamos el vector pmCherry-C1, un plásmido comercial diseñado para generar proteínas de fusión a la proteína fluorescente *mCherry*.

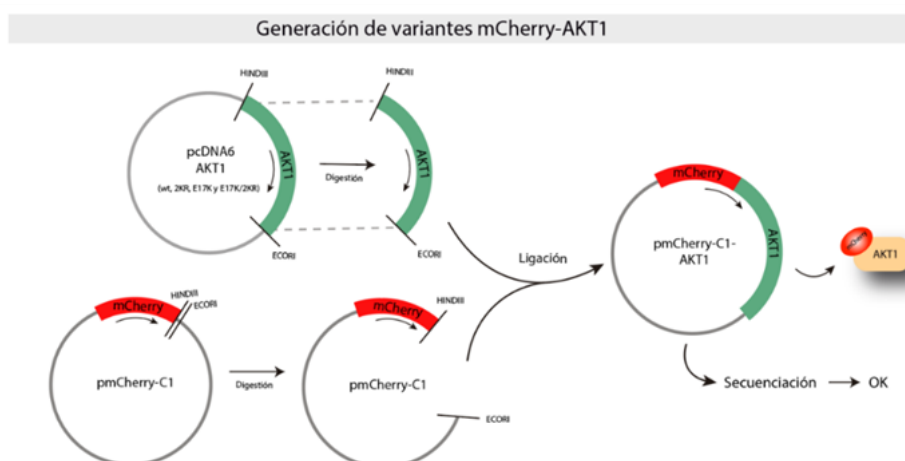


Figura R. 34. Generación de variantes *mCherry*-AKT1. Esquema experimental de la generación de los vectores codificantes para las diferentes variantes de AKT1 fusionadas a la proteína fluorescente *mCherry*. Brevemente, se digirieron tanto los vectores originales de las variantes de AKT1 con las enzimas HINDIII y ECORI y se ligaron al vector pmCherry-C1 digerido con las mismas enzimas. La correcta inserción, la presencia de mutaciones adicionales y ausencia de mutaciones indeseadas se verificó mediante secuenciación.

Luego del estudio de las secuencias de los vectores originales de las variantes de AKT1 y de los sitios de restricción de este vector, identificamos las enzimas de restricción adecuadas (HINDIII y ECORI) para la digestión del vector pmCherry-C1 y los vectores codificantes de las variantes de AKT1,

de manera de obtener las construcciones de fusión direccionadas correctamente, manteniendo el marco de lectura. Realizamos el clonado y enviamos a secuenciar las construcciones generadas, corroborando la correcta inserción y la ausencia de mutaciones no deseadas (Figura R. 35A).

Una vez generadas las construcciones y habiéndolas verificado mediante secuenciación, estudiamos si las variantes de AKT SUMOilables fusionadas a m-Cherry tenían el mismo efecto sobre el reportero de Nanog que las versiones de AKT estudiadas hasta el momento. Como se muestra en la Figura R. 35B, mCherry-AKT1 wt indujo el reportero y la mutante mCherry-AKT1 E17K produjo una mayor inducción, mostrando un efecto similar al de las construcciones utilizadas previamente y validando de esta manera el nuevo sistema experimental.

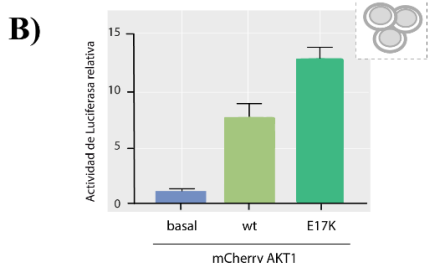
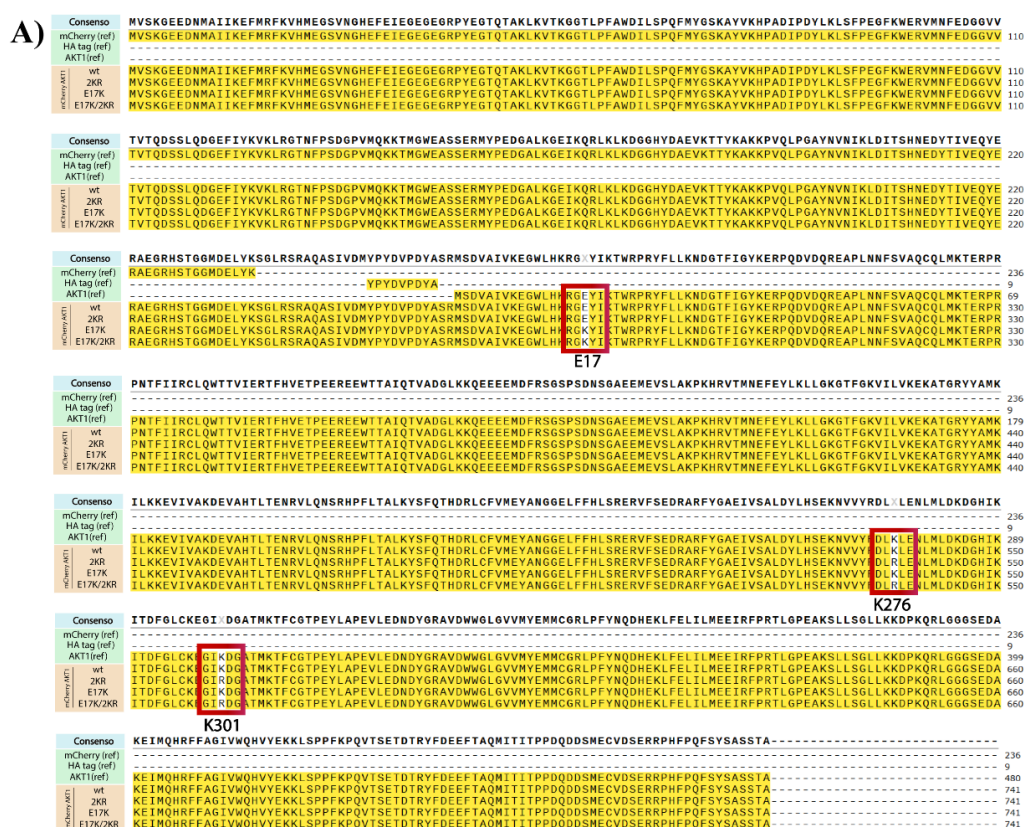


Figura R. 35. Validación de las construcciones generadas, codificantes de las proteínas de fusión mCherry-AKT1. A) Resultados de la secuenciación y posterior alineamiento de las diferentes construcciones mCherry-AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas. B) Efecto sobre el promotor de Nanog de las variantes de mCherry-AKT1 wt y E17K y el vector vacío (basal) en CME. Los resultados se relativizaron al basal y se muestran como la media de la actividad de luciferasa relativa \pm Error Estándar (EE) de un n=2.

Posteriormente, transfectamos en CME cada variante mCherry-AKT1 y comenzamos analizando su distribución subcelular. Previamente, en el capítulo 1 habíamos mostrado que todas las variantes se distribuían ubicuamente en CME y que las mutantes E17K y E17K/2KR mostraban una localización preferencial en la membrana, comparadas con la variante *wt*, en células fijadas [174]. En este ensayo con las nuevas variantes fluorescentes, esperábamos obtener observaciones similares, pero que nos permitan realizar un análisis más detallado. En la Figura R. 36 se observan imágenes representativas de microscopía confocal de las distintas variantes de AKT1 transfectadas en CME. Se muestran en pseudocolor rojo (red LUT) para una mejor visualización. En esta figura se observa que la variante AKT1 *wt* y su contraparte deficiente de SUMOilación AKT1 2KR tienen una distribución homogénea tanto en el citoplasma celular como en sus límites, lo que indica que ninguna de estas variantes de AKT1 presenta un reclutamiento preferencial en la membrana plasmática. Contrariamente, las células que expresan la variante oncogénica AKT1 E17K mostraron una mayor intensidad de la señal en los límites celulares, lo que sugiere que esta mutante se concentra en la membrana. Este resultado es consistente con reportes previos que muestran que esta variante de AKT1 se localiza preferentemente en la membrana plasmática en otro tipo de células [175]. Como se mencionó anteriormente, debido a que los principales activadores de AKT se localizan en la membrana, se especula que esta mayor localización en la membrana, respecto a AKT1 *wt* podría ser una de las causas de la hiperactividad de esta mutante [171], [172]. Es relevante destacar que, la mutante AKT1 E17K/2KR mostró una distribución similar a la mutante E17K, lo que indica que la deficiencia en su SUMOilación no altera las características de distribución subcelular producidas por la mutación E17K.

Por otra parte, como se observa en la figura, en ambas mutantes E17K observamos una población de células con una señal de AKT1 más intensa en la zona de la membrana y a su vez, una población en la que no se observa dicha intensidad incrementada. Más adelante entraremos en detalle sobre esta característica encontrada. Por último, observamos que existen zonas donde se observa una total exclusión de esta de quinasa; específicamente en los nucleolos y en pequeñas regiones en el citoplasma, en lo que parecieran ser estructuras definidas, cuya identidad será el foco de futuros análisis.

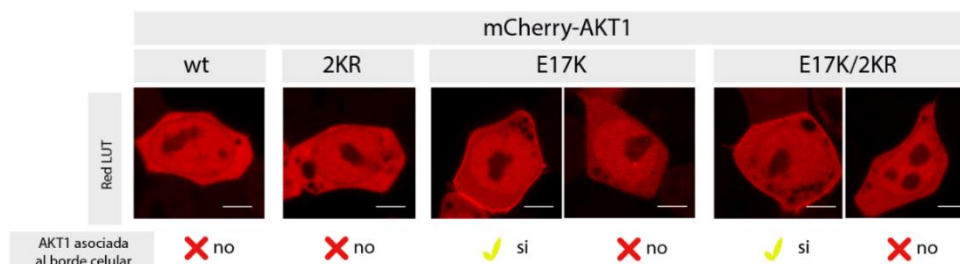


Figura R. 36. Visualización de las variantes de AKT1 fusionadas a mCherry en CME. Imágenes representativas de microscopía *confocal* de CME vivas, previamente transfectadas con las distintas variantes de mCherry-AKT1 (*wt*, 2KR, E17K, E17K/2KR). Se muestran imágenes de células representativas pertenecientes a las poblaciones con o sin AKT1 identificada en el borde celular. Barra de escala = 5 μ m.

A partir de la obtención de estas variantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas fusionadas a la proteína fluorescente mCherry y verificación de la correcta expresión, comenzamos a estudiar en células vivas los efectos de su SUMOilación, tanto sobre la misma AKT, como río abajo en su señalización mediante diferentes técnicas involucrando microscopia de fluorescencia.

3.2.2 Análisis de la distribución de las diferentes variantes de AKT1

Como adelantamos en la sección anterior, si bien observamos que en general la distribución de las variantes era la esperada, en aquellas con la mutación E17K, que produce una traslocación mayor a la membrana, encontramos que en la población de células transfectadas, existe una fracción en la cual efectivamente se encuentra esta característica, pero otra en la que no. Como esto nos llamó la atención, decidimos estudiar esto en mayor profundidad.

En la Figura R. 38 mostramos imágenes representativas de células que expresan las distintas variantes, haciendo foco en lo señalado previamente. Estas imágenes se encuentran presentadas en FIRE LUT para una mejor visualización de las distribuciones donde además incluimos un perfil de intensidad representativo de la región del borde celular. De un N de al menos 200 células por condición, realizamos una inspección célula a célula con el objetivo de cuantificar la proporción de células con enriquecimiento de AKT en el borde celular, dentro de la población de células transfectadas. Este análisis cualitativo, mostró que efectivamente este enriquecimiento de las variantes E17K o E17K/2KR en la membrana celular no es algo que ocurre en toda la población de CME transfectadas, sino que se trata de aproximadamente el 47% y el 56% de las células, respectivamente (Figura R. 38).

Por otro lado, al realizar esta inspección célula a célula, nos llamó la atención que si bien las variantes wt y 2KR no mostraron dicho reclutamiento a toda la membrana (Figura R. 38), sí detectamos una pequeña población de células en las que ocurre un enriquecimiento de estas variantes en la zona de la membrana de algunos contactos célula-célula (Figura R. 37). En esta figura incluimos fotos representativas donde se observan dichos incrementos de intensidad locales e incluimos un perfil de intensidad representativo de esas regiones. Asimismo, también observamos este aumento en la intensidad local en dichas zonas con las mutantes AKT1 E17K y E17K/2KR. Estos resultados concuerdan con reportes previos que indican que AKT puede translocar a la membrana y ser activada por E-cadherina en las uniones célula-célula en otros modelos pluripotentes [256]–[258].

Con respecto a la fracción de células que mostraron este enriquecimiento, las variantes conteniendo la mutación E17K fue mucho mayor (73-77%) que la observada en las variantes AKT1 wt y 2KR (5-6%). Si bien la diferencia es considerable, en ambos casos, la proporción no parece ser afectada por la SUMOilación, dado que entre cada variante y su correspondiente mutante con SUMOilabilidad disminuida, el porcentaje es similar.

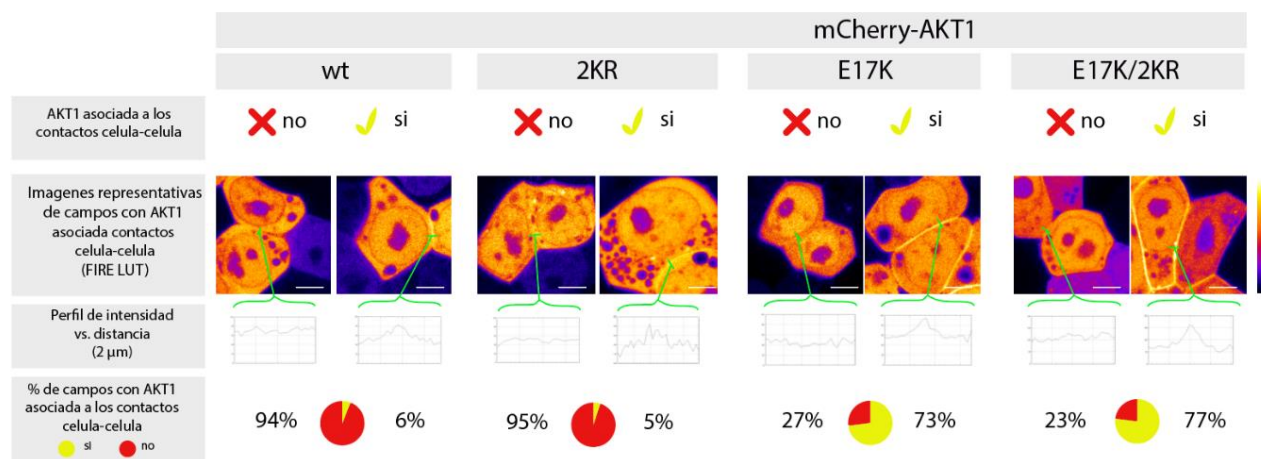


Figura R. 38. Variantes de AKT1 localizadas en los bordes celulares. Imágenes representativas de células con o sin mCherry-AKT1 identificada en el borde celular, mostradas utilizando pseudocolor "Fire LUT" para facilitar su visualización. Para ilustrar cómo AKT1 se encuentra asociada a los bordes de las células, se muestra un gráfico de perfil de intensidad debajo de cada variante. Se indica el porcentaje de células en las que AKT1 está asociada a todo el borde celular. Se analizaron entre 200 y 250 células por condición de al menos 6 réplicas biológicas. Barra de escala = 5 µm.

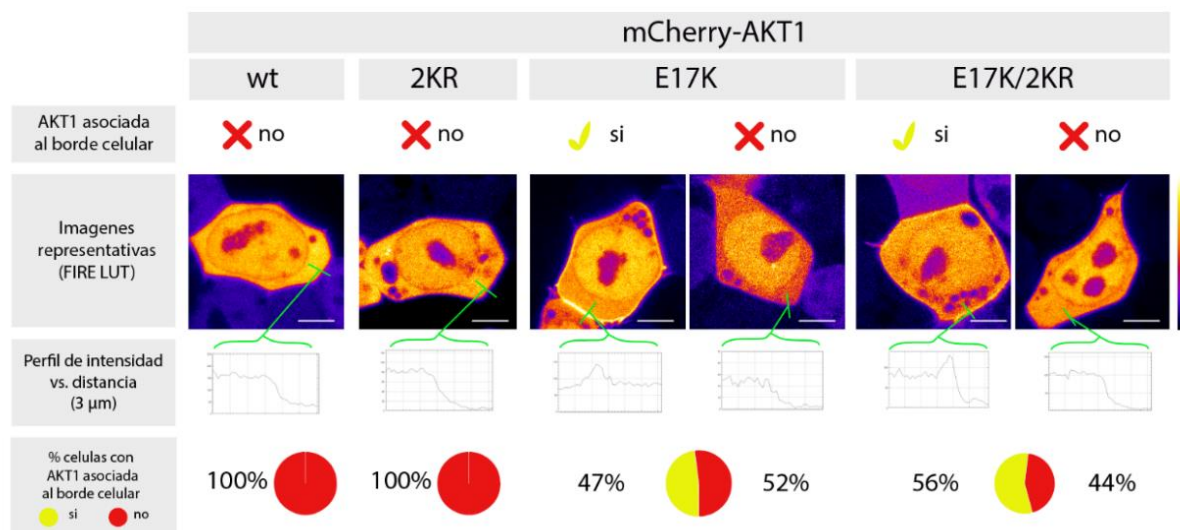


Figura R. 37. Variantes de AKT1 en los contactos célula-célula. Imágenes representativas de poblaciones de células con o sin mCherry-AKT1 asociada a los contactos célula-célula, mostradas utilizando pseudocolor "Fire LUT" para facilitar su visualización. Se muestra un gráfico de perfil de intensidad debajo de cada imagen. Se indica el porcentaje de células en las que AKT1 se encontró asociada a los contactos célula-célula. Se analizaron entre 200 y 250 células por condición de al menos 6 réplicas biológicas. Barra de escala = 5 µm.

Nuestros resultados demuestran que la SUMOilabilidad de AKT1 no interfiere ni con su reclutamiento a la membrana, ni a los contactos célula-célula. Sin embargo, de manera interesante, la presencia de AKT1 en estas regiones es mayor en los casos de las variantes que contienen la mutación E17K.

3.2.2.1 La SUMOilabilidad afecta la compartimentación subcelular de AKT1 mientras que la mutación E17K promueve su localización nuclear

Hasta ahora hemos demostrado que existe cierta falta de correlación entre lo que esperaríamos que ocurra con aquellas variantes con una traslocación a la membrana evidente y su efecto río abajo. Esto nos llevó a profundizar en el estudio de la dependencia de la SUMOilabilidad de la localización subcelular de AKT1, hipotetizando que pueden llegar a existir modificaciones adicionales en la distribución de esta quinasa, que exceden a su mera presencia en la membrana.

Como mencionamos anteriormente, la SUMOilación puede modular la localización y acumulación nuclear de algunas proteínas [148], [149] y también afecta ciertas interacciones proteína-proteína [150], por lo que su propia compartimentalización, podría afectar sus efectos con sus blancos putativos. En este contexto, analizamos si las mutaciones introducidas en AKT1 afectan la distribución entre el núcleo y el citoplasma evaluando cuantitativamente la distribución de intensidad de las diferentes variantes mCherry-AKT1 en ambos compartimentos. Para esto, como se encuentra esquematizado en la Figura R. 39A, sobre imágenes obtenidas de células vivas transfectadas con las distintas variantes de AKT1, realizamos la cuantificación de la intensidad de fluorescencia tanto nuclear como citoplásmica. Brevemente, generamos máscaras binarias tanto de la célula completa, como del núcleo y del citoplasma, denominadas regiones de interés (ROIs), y posteriormente mediante la programación de un *script* en el software *ImageJ*, se realizó la cuantificación automática de la fluorescencia en cada uno de estos compartimentos en aproximadamente 200 a 250 células para cada variante. Como se observa en la Figura R. 39B, realizamos la determinación de la relación núcleo/citoplasma ($I_{\text{núcleo}}/I_{\text{citoplasma}}$) para cada célula transfectada con cada una de las variantes y observamos que la relación no es homogénea entre las diferentes variantes de AKT1. Específicamente, la relación núcleo/citoplasma fue ligeramente menor para la mutante AKT1 2KR en comparación con la versión wt. Por otro lado, nos llamó la atención que la relación fue significativamente mayor para la mutante oncogénica AKT1 E17K, comparada con E17K/2KR y también con la wt. Estos resultados, en los que se observan diferencias significativas entre las variantes SUMOilables con respecto a sus correspondientes mutantes con SUMOilación disminuida, y en donde las primeras tienen un valor

mayor, indican que la SUMOilación de AKT1 promueve su presencia en el núcleo. De estos resultados concluimos además que la mutación E17K también promueve una mayor localización nuclear.

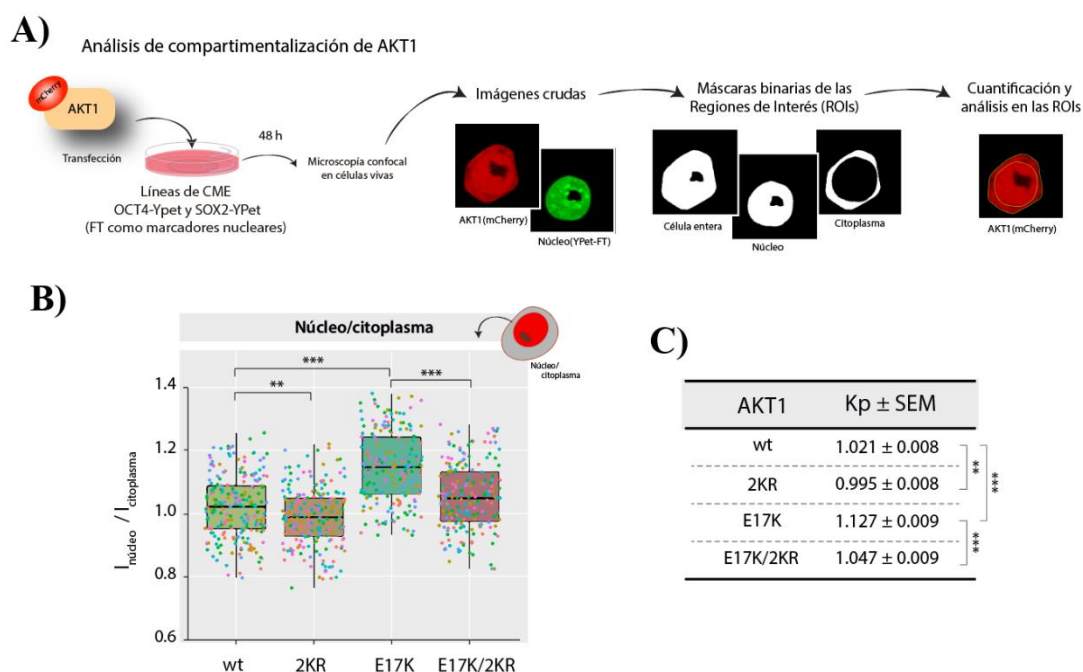


Figura R. 39. Compartimentalización núcleo/citoplasma de las variantes de AKT1. Las CME fueron transfectadas con las diferentes variantes de AKT1 fusionadas a mCherry, se tomaron imágenes de microscopía confocal, se segmentaron los distintos compartimentos y se determinó la intensidad media de fluorescencia de mCherry-AKT1 dentro de la célula completa, el citoplasma y el núcleo, como se describe en la sección Materiales y Métodos. A) Diagrama esquemático del diseño experimental y de la estrategia de análisis de imágenes. B) Boxplots de la relación núcleo/citoplasma ($I_{\text{núcleo}}/I_{\text{citoplasma}}$) para cada variante. En todos los casos, cada célula evaluada está representada por un punto, mientras que diferentes colores de puntos indican diferentes réplicas biológicas ($n=6$). Se analizaron entre 200 y 250 células por condición. C) Valores de la constante aparente de partición núcleo/citoplasma (K_p) para las diferentes variantes de AKT1, determinados a partir de los datos de la relación núcleo/citoplasma \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$).

A partir de estos resultados determinamos la constante de partición aparente núcleo-citoplasma (K_p) de las diferentes variantes de AKT1 que reflejan las diferencias encontradas (Figura R. 39C). El hecho de que la intensidad nuclear relativa fuera ≥ 1 en todos los casos es consistente con reportes previos que indican que AKT se observa con más frecuencia dentro del espacio nuclear que en el citoplasma [259]. Sin embargo, la mutante AKT1 E17K fue la que mostró una mayor localización nuclear con un valor de K_p de 1.127 (Figura R. 39C).

En conjunto, estos resultados indican que tanto la SUMOilabilidad como la mutación E17K afectan la compartimentalización de AKT1 y promueven su localización nuclear, posiblemente afectando la afinidad por sus objetivos en los diferentes compartimentos, agregando una capa adicional de regulación de su función y probablemente de especificidad de blancos.

3.2.2.2 La mutación E17K promueve una redistribución de AKT1 tanto en el núcleo como en el citoplasma y este efecto es dependiente de su SUMOilabilidad

En los últimos años se ha observado que la heterogeneidad en la distribución de distintas biomoléculas dentro de los diferentes compartimentos subcelulares podría tener un impacto en su función [103]. Debido a que encontramos que la SUMOilabilidad de AKT1 modula su compartimentalización subcelular, a continuación, nos preguntamos si esta MPT también afecta la distribución de la quinasa dentro del núcleo y del citoplasma.

Analizamos cuantitativamente la distribución nuclear y citoplasmática de las variantes de mCherry-AKT1 determinando el coeficiente de variación (CV), un parámetro que se ha utilizado previamente para cuantificar la distribución general de diferentes proteínas [106], [260], [261]. Brevemente, este parámetro se obtiene calculando el cociente entre el desvío estándar y la intensidad media de fluorescencia del compartimento estudiado, para cada célula. Un valor más elevado de CV sugiere una distribución más heterogénea de la proteína estudiada en ese compartimento. La Figura R. 40A muestra los valores de CV nuclear de las distintas variantes de AKT. En primer lugar, observamos que la distribución dentro del núcleo de la mutante AKT1 2KR fue similar a la obtenida con la versión wt. Sin embargo, la mutante AKT1 E17K mostró una distribución más homogénea dentro del núcleo en comparación con la wt, evidenciado por un valor de CV significativamente menor. Esta característica parece depender de la SUMOilación, ya que el valor de CV determinado para la mutante E17K/2KR de AKT1 no fue significativamente diferente al determinado para la quinasa wt y fue mayor al obtenido para la mutante E17K.

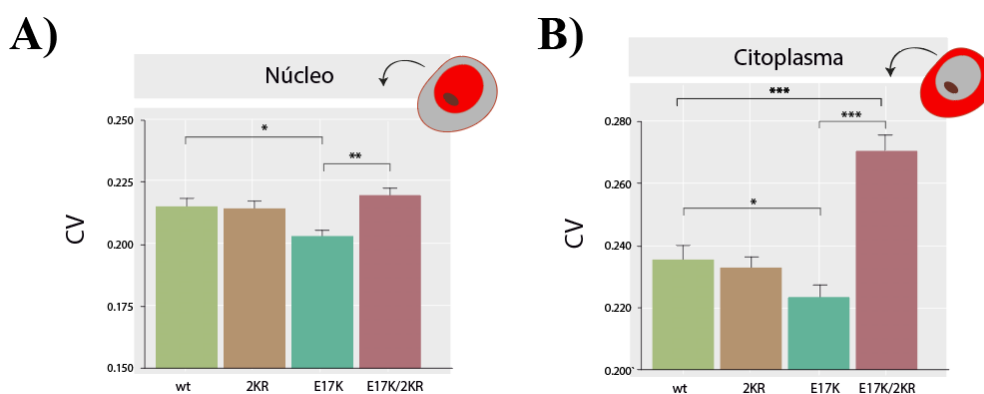


Figura R. 40. Coeficiente de variación de las diferentes variantes de AKT1 en el núcleo y citoplasma de CME. Análisis del coeficiente de variación (CV) de CME transfectadas con las variantes de mCherry-AKT1. Los valores de CV del núcleo (A) o del citoplasma (B) se muestran como media \pm SEM del análisis de entre 200 y 250 células para cada variante en todas las determinaciones con un n=6 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001).

Por otro lado, los valores de CV en el citoplasma celular (Figura R. 40B) siguieron un comportamiento similar al observado en el núcleo. En particular, los valores de CV de las variantes wt y 2KR de AKT1 no fueron significativamente diferentes mientras que la mutante E17K mostró una distribución más homogénea. Por último, debemos mencionar que el CV, específicamente dentro del compartimento citoplásmico, podría ser influenciado por ciertas zonas de exclusión específicas de AKT1 (Figura R. 36) y que discutiremos más adelante, lo que podría haber causado un valor más alto en el caso de la mutante E17K/2KR, el cual fue significativamente mayor al resto de las variantes.

En conjunto, estos resultados esquematizados en la Figura R. 41, demuestran que la SUMOilabilidad tiene un papel relevante en la compartimentalización y distribución subcelular de AKT1. Además, nuestros resultados revelan que la mutación oncogénica E17K en esta quinasa favorece su reclutamiento en el núcleo y una distribución más homogénea tanto en núcleo como en citoplasma. Este efecto sobre la localización podría afectar la interacción con sus blancos en los diferentes compartimentos, agregando así una capa adicional de regulación de su función y en última instancia, muy probablemente impactando en la expresión génica.

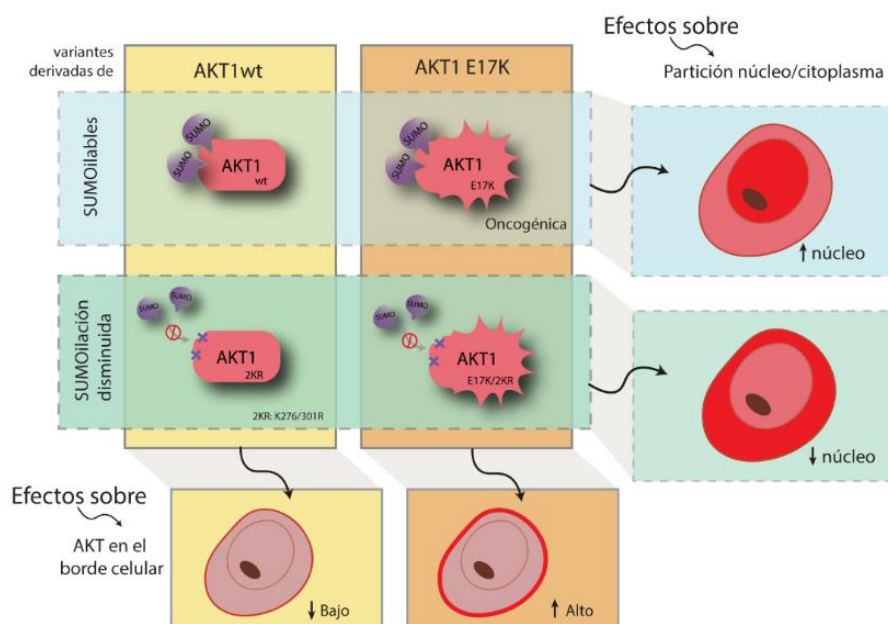


Figura R. 41. Resumen de los efectos más relevantes de las variantes de AKT1 en su distribución subcelular en CME.

4 DISCUSIÓN

Las capacidades intrínsecas de las células madre, auto-renovación y potencial de diferenciación, las posicionan como un excelente sistema para la investigación en biología del desarrollo, modelado de enfermedades, evaluación de fármacos y en particular, como una gran promesa en el área de la medicina regenerativa. En los últimos años, esta promesa está comenzando a materializarse gracias al esfuerzo de un gran número de científicos, que a partir de líneas de investigación básicas y aplicadas, han permitido el desarrollo de diferentes ensayos clínicos aplicando terapias celulares en múltiples tipos de patologías, algunos de los cuales se encuentran reclutando pacientes, otros en curso y cuyos lineamientos se encuentran en permanente revisión [291], [292]. A modo de ejemplo, mencionamos uno de los ensayos más elocuentes de los últimos tiempos y que ilustra, no sólo el avance en esta área de investigación, sino también su gran potencial de aplicación en diferentes patologías complejas. Se trata de un ensayo clínico en el que participa un grupo reducido de pacientes con la enfermedad de Parkinson e involucra un abordaje novedoso llevado a cabo por múltiples grupos de investigación de diferentes países [293]. Este estudio se basa en la diferenciación neuronal de CME humanas y posterior trasplante de las neuronas obtenidas en las regiones del cerebro dañadas por la enfermedad. El primer trasplante de este tipo en humanos se realizó en febrero de este año en Suecia (informado por la Universidad de Lund en: [294]). Si bien los resultados de este ensayo aún no han sido publicados y se esperan resultados para mediados de 2027, resultados de ensayos preclínicos indican una buena integración del tejido humano trasplantado a la red neuronal en modelos animales [295]. Todos los datos actualizados de este ensayo se encuentran en la base de datos ClinicalTrials.gov, dependiente del gobierno de los Estados Unidos, bajo el número de estudio NCT05635409.

Por otro lado, hay que destacar que tanto la eficiencia como la seguridad de estos tratamientos aún son tema de investigación. Creemos que todavía es necesario un gran esfuerzo de la comunidad por entender en profundidad los mecanismos moleculares que gobiernan las propiedades intrínsecas de las células madre y cuya comprensión profunda es indispensable para mejorar estos aspectos clave en los protocolos de diferenciación dirigidos.

En este marco, el objetivo de este trabajo en términos generales fue contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares relevantes para la pluripotencia, haciendo foco en el estudio de los efectos de AKT1 y la dependencia de su SUMOilación en células madre embrionarias.

Como fuimos describiendo a lo largo de este trabajo, la pluripotencia en CME es mantenida a través de una compleja red de FTs que regulan finamente la expresión de genes involucrados en la pluripotencia y la diferenciación celular. Particularmente, Oct4, Sox2 y Nanog componen el núcleo central de FTs de pluripotencia. Si bien se conoce un gran número de factores y vías involucradas, dada la complejidad de esta red regulatoria, los mecanismos moleculares que regulan el estado pluripotente en CME aún siguen siendo objeto de estudio.

La quinasa AKT está involucrada en la mediación de una gran variedad de estímulos, regulando así diversos procesos moleculares y celulares. En particular en CME, AKT1, como efector de la vía de PI3K, juega un papel fundamental en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de estas células, promoviendo su supervivencia e induciendo la expresión del FT de pluripotencia Nanog. La activación de AKT se produce como consecuencia de su fosforilación por PDK1 y mTORC2, y posteriormente, tanto su actividad quinasa como su especificidad de sustratos son regulados finamente por otras múltiples MPTs (detallado en la sección 1.4.1 de la introducción de esta Tesis), incluyendo la SUMOilación.

Específicamente, respecto a la MPT que fue foco de este trabajo, la SUMOilación modifica la actividad de una amplia variedad de proteínas con consecuencias en cáncer, enfermedades neuronales y diversos procesos biológicos como la senescencia, el daño al ADN, la replicación y la regulación génica a diferentes niveles. Además, la modificación por SUMO compite con la ubiquitinación que ocurre en residuos lisina en algunas proteínas, y también coopera con esta última MPT afectando la estabilidad de proteínas. Como fuimos mencionando a lo largo de este trabajo, existen múltiples ejemplos de factores de transcripción blanco de SUMOilación, incluyendo Oct4 y Sox2, y se ha visto que esta MPT tiene impacto tanto en su estabilidad, localización subcelular y unión al ADN, y por lo tanto, en sus capacidades de regulación de la expresión génica.

Los primeros reportes sobre la SUMOilación de AKT recién cumplen su primera década, y desde entonces solo unos pocos trabajos salieron a la luz describiendo los efectos de esta MPT en la función de esta quinasa. De manera similar a otras MPTs que influyen en la actividad de AKT, la SUMOilación también juega un papel relevante en su regulación con consecuencias en múltiples procesos celulares. En particular, como describimos en la Introducción, se ha encontrado que la SUMOilación de AKT tiene efectos sobre la supervivencia, la proliferación, el *splicing*, e incluso afecta el potencial oncogénico de ciertas líneas celulares. Sin embargo, los efectos de la SUMOilación de AKT en CME no se habían explorado previamente.

Por lo tanto, considerando la importancia de AKT1 en el mantenimiento del estado pluripotente y los efectos de la SUMOilación sobre diferentes proteínas, y en particular, sobre AKT, pero reportadas en otros contextos celulares, nos preguntamos si esta MPT podría impactar sobre el rol de AKT en CME.

En primer lugar, dada la relación directa entre AKT y Nanog, estudiamos los efectos de la SUMOilación de AKT1 sobre la expresión de este FT, a distintos niveles de regulación. Como mencionamos previamente, Nanog es un FT de la familia Homeobox, esencial para la adquisición de la pluripotencia en CMP. La regulación precisa de su expresión y actividad involucra múltiples mecanismos y garantiza un equilibrio adecuado entre la pluripotencia y la diferenciación celular; por

lo tanto, resulta de gran interés comprender los mecanismos moleculares que controlan la expresión de este FT.

A lo largo de este trabajo utilizamos diferentes abordajes experimentales. Una herramienta central fueron las mutantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas. Particularmente, la versión wt y la mutante 2KR, que posee mutadas dos lisinas (K276 y K301) las cuales normalmente son susceptibles a ser conjugadas al grupo SUMO, como describimos al inicio de la sección de Resultados. Asimismo, incluimos en nuestro análisis la mutante AKT1 E17K encontrada en varios tipos de cáncer y su correspondiente mutante de baja SUMOilabilidad, la AKT1 E17K/2KR, que combina las mutaciones anteriormente mencionadas. Además, interferimos con el proceso de SUMOilación mediante la transfección de las células con una mutante dominante negativa de la enzima UBC9, conjugadora del grupo SUMO y clave para el proceso de SUMOilación. Encontramos que AKT1, de manera dependiente de su SUMOilación, induce la expresión de Nanog. Específicamente, encontramos que las variantes de AKT susceptibles a ser SUMOiladas inducen la actividad del promotor de Nanog, evidenciado por el sistema reportero Nanog5P, y aumentan los niveles de la proteína Nanog endógena; mientras que las mutantes con SUMOilabilidad disminuida no tienen ningún efecto sobre estos parámetros. Además, la falta de inducción del reportero por una mutante AKT1 que conserva la K276 pero tiene alterada su secuencia consenso de SUMOilación, refuerza la evidencia de que esta MPT es requerida para este efecto y no la lisina 276 *per se*. Por último, la interferencia producida por la dominante negativa de UBC9, UBC9(C93S), sobre la inducción ejercida por las variantes de AKT1 susceptibles a la SUMOilación evidencia el requerimiento de esta MPT. En conjunto, estos abordajes demuestran el papel de la SUMOilación de AKT1 en la regulación de la expresión del factor de transcripción central de pluripotencia Nanog en CME.

Cabe mencionar que, si bien observamos que AKT de manera dependiente de su SUMOilación, induce la actividad del promotor de Nanog y produce un aumento de los niveles de esta proteína, no pudimos observar la misma correlación al evaluar los niveles del ARNm. Si bien ya lo mencionamos oportunamente en la sección de Resultados al discutir los resultados en el ARNm de Nanog, especulamos que no pudimos detectar este efecto por problemas técnicos, principalmente debido a la baja eficiencia de transfección y posterior selección de células transfectadas. Por este motivo, para intentar resolver esta dificultad, nos propusimos generar líneas estables que expresen de manera inducible las diferentes variantes de AKT1. Estas líneas, además, serían de utilidad para otros abordajes experimentales, por ejemplo, aquellos que requieran gran cantidad de células expresando estas variantes de AKT, o análisis en otra escala temporal, durante el proceso de diferenciación a largo plazo. Si bien no fue un tema abordado en esta tesis, intentamos generar estas líneas celulares, primero subclonando las variantes en vectores lentivirales y posteriormente produciendo las

partículas pseudovirales y transduciendo las CME. Sin embargo, diversas dificultades técnicas nos llevaron a desistir de este enfoque y concentrarnos en otros abordajes.

Durante el desarrollo de esta tesis surgió la oportunidad de utilizar una herramienta generada por el Dr. Ariel Waisman, la cual nos permitió evaluar el efecto de AKT1 y su dependencia de la SUMOilación en otros parámetros involucrados en la regulación a nivel de ARNm de este gen. En particular, esta herramienta permite evaluar el efecto sobre la región 3'UTR del ARNm de Nanog, que contiene secuencias reconocidas por miARNs que pueden afectar su estabilidad y traducibilidad. Como mencionamos en la Parte I del Capítulo 1 (secciones 3.1.1.2.2 y 3.1.1.4.1), existen miARNs, que se inducen ante señales de diferenciación y regulan negativamente la expresión de Nanog y otros genes importantes para la pluripotencia, de manera directa, al interactuar con la región 3'UTR de sus transcritos blanco [200]. Por lo tanto, exploramos si había un efecto de AKT que pudiésemos detectar a través del mencionado reportero. Los resultados que obtuvimos en condiciones de cultivo que mantienen el estado pluripotente no nos permitieron interpretar de manera directa el efecto de AKT sobre el 3'UTR de Nanog. Específicamente, no detectamos efecto de las variantes de AKT SUMOilables, sin embargo, las mutantes con SUMOilación disminuida AKT1 2KR y AKT1 E17K/2KR produjeron una disminución de la actividad del reportero, sugiriendo un efecto inesperado de regulación negativa sobre la región 3'UTR de Nanog. Sin embargo, cuando posteriormente estudiamos el efecto sobre este reportero en condiciones que promueven la diferenciación por 48 h, detectamos un efecto en el mismo sentido que el de las variantes de AKT sobre el promotor y el efecto observado a nivel de proteína. Específicamente, las variantes SUMOilables aumentaron la estabilidad y/o traducibilidad del reportero de la región regulatoria 3'UTR de Nanog. Por otra parte, las variantes no SUMOilables tuvieron un efecto negativo sobre el reportero del 3'UTR, regulación que no observamos a otro nivel y que estudiaremos en el futuro. En conjunto, estos resultados sugieren que las variantes de AKT1 con SUMOilabilidad disminuida producen un efecto similar a lo que sucede al inicio de la diferenciación: una disminución de la actividad del reportero, sugiriendo una disminución de estabilidad y/o traducibilidad del ARNm de Nanog. Por último, debemos mencionar que somos conscientes de las limitaciones de los sistemas reporteros que permiten estudiar la función de elementos aislados; es probable que este sistema reportero no represente exactamente lo que pasa con el ARNm endógeno de Nanog, aunque parece ser sensible a los cambios producidos en el contexto de diferenciación. También es posible que los efectos de AKT sobre Nanog sean diferentes en cada nivel de regulación que puede tener el gen desde su transcripción hasta su producto final, e incluso en su actividad y función, como lo discutiremos más adelante. Es por eso que creemos importante analizar todos estos efectos en conjunto y tener en cuenta que el balance entre los distintos parámetros es el que en última instancia termina proporcionando el efecto final sobre Nanog.

Por otra parte, no podemos descartar que, además de los efectos encontrados tanto en el reportero del promotor de Nanog, que coincide con los resultados del análisis a nivel de proteína, como sobre el reportero de su 3' UTR, AKT podría estar afectando también la estabilidad de la proteína Nanog, de manera dependiente de su SUMOilación, agregando un nivel adicional de complejidad en el control de la expresión génica. En este sentido, la fosforilación de AKT impacta en la estabilidad de múltiples proteínas[296]–[299], lo que enfatiza la relevancia de esta quinasa en diversos procesos celulares como la diferenciación celular, la oncogénesis, la respuesta al stress por proteínas mal plegadas, y la estabilidad de los telómeros. Curiosamente, se sabe que la estabilidad de NANOG está regulada por fosforilación por la acción de otras quinasas en CME [46], [85], [86] y cáncer [87], por lo que se requieren estudios adicionales para dilucidar si AKT también está involucrada y si su SUMOilación también influye en la estabilidad de este FT.

Por otro lado, cabe destacar que la inducción de la actividad del promotor de Nanog producida por AKT1 y dependiente de su SUMOilación observada en CME, también ocurre en CMPI (Figura R. 13) y en la salida del estado pluripotente de CME (Figura R. 19), sugiriendo un mecanismo conservado en estos diferentes contextos de pluripotencia. Sin embargo, la respuesta del reportero de Nanog fue diferente en los demás contextos celulares no pluripotentes, sugiriendo que no se trata de un mecanismo generalizado en respuesta a AKT1. Por un lado, encontramos que todas las variantes de AKT1 reprimieron el reportero de Nanog de manera independiente de su SUMOilación, tanto en fibroblastos embrionarios murinos (NIH/3T3, MEFs), un tipo celular terminalmente diferenciado, como en las U-2 Os, línea celular tumoral establecida a partir de osteosarcoma humano; contextos en los que no detectamos expresión de Nanog. Por otro lado, en la línea de células de riñón humano embrionario (HEK293T) también obtuvimos un efecto represor, pero interesantemente, este efecto resultó dependiente de la SUMOilación de AKT1. Estas diferencias en la respuesta del reportero en los diferentes contextos infieren la existencia de uno o más mediadores esenciales de este efecto dentro del contexto pluripotente que no se encuentran presentes en los contextos diferenciados. Incluso, haber encontrado contextos en los que el efecto de AKT1 no depende de la SUMOilación, pone en evidencia que la regulación encontrada no es únicamente consecuencia de un cambio en la actividad quinasa como resultado de esta MPT, sino que podría involucrar otro mecanismo, por ejemplo, una diferente capacidad de interacción con otros factores regulatorios.

Estos resultados, nos llevaron a preguntarnos sobre el mecanismo molecular subyacente a estos efectos. Como mencionamos anteriormente, la SUMOilación puede modificar no solo la actividad sino también las interacciones proteína-proteína e incluso la localización subcelular de las proteínas, lo que en AKT1, podría afectar en última instancia su actividad quinasa a partir de la combinación de múltiples efectos. Suponemos que el efecto de esta MPT de AKT1 sobre la expresión de Nanog debe

ser mediado por al menos un factor, que sea fosforilado por esta quinasa y que finalmente impacta en la expresión de Nanog.

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo no involucra a la vía trivial de señalización de AKT en CMP, que consiste en la fosforilación e inactivación de GSK3 β , una quinasa ubicua que es crucial para el mantenimiento de la pluripotencia de las CMP e importante en la expresión de Nanog. Dado que la mayoría de nuestros experimentos fueron realizados en presencia de CHIR99021, uno de los componentes del 2i que es inhibidor de GSK3 β , dedujimos que el efecto inductor de AKT1 sobre Nanog debería ser a través de otro mecanismo o mediador presente en el estado pluripotente. Para estudiar este proceso, utilizamos diferentes abordajes para explorar la participación de candidatos a ser mediadores del efecto. Especulamos que el mediador buscado podría ser blanco de AKT y/o algún factor involucrado en la regulación de la expresión de Nanog, por lo que exploramos algunos FTs y vías triviales. Dado que no encontramos pérdida del efecto de AKT sobre el reportero en ninguna de las condiciones en que inhibimos o interferimos con los candidatos analizados, nuestro análisis sugirió que ninguno de los factores estudiados es un mediador exclusivo o indispensable en la inducción de Nanog por AKT. Estas conclusiones involucran tanto a GSK3 β como a la vía río abajo de MEK/ERK, ambos inhibidos por el 2i, a los FTs del estado pluripotente OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 y TBX3 y a la proteína supresora de tumores p53. De manera inesperada, la perturbación de ninguno de estos factores y, en consecuencia, los factores río abajo en sus correspondientes vías de señalización o genes asociados, impidió la inducción del reportero ejercida por AKT, demostrando que son prescindibles para este efecto. Debemos mencionar que esperábamos que al menos uno de ellos fuera un mediador esencial de este efecto, en especial TBX3, que fue sugerido previamente como efector de la inducción de Nanog por AKT [170]. Sin embargo, si bien hasta este punto aún desconocemos la identidad del factor responsable de mediar este efecto, creemos que los experimentos y resultados obtenidos hasta este momento contribuyen a la caracterización de esta vía de señalización y nos condujeron a buscar nuevas estrategias para abordar este objetivo.

Por lo tanto, para intentar dilucidar el mecanismo subyacente a esta regulación, decidimos realizar un análisis de datos transcriptómicos y proteómicos que permitió identificar genes expresados en CMP, contexto en el que observamos el efecto de AKT1 (CME e CMPI), y no expresados en fibroblastos, donde esta quinasa no induce la expresión de Nanog. Si bien somos conscientes de que hubiera sido óptimo generar un *dataset* propio con datos ómicos de células tratadas con las distintas variantes de AKT, no fue posible realizarlo durante el transcurso de la tesis. Sin embargo, a partir de estos datos disponibles públicamente, surgieron resultados interesantes. En particular, mediante un cruce exploratorio de estos resultados de expresión diferencial con datos sobre blancos reportados de AKT1, identificamos posibles candidatos que podrían actuar como mediadores específicos en la regulación de Nanog por AKT1 en CME, entre ellos, nos llamó la atención la aparición del FT pionero

de la familia Forkhead box, FoxA2. Este FT se expresa particularmente durante el desarrollo temprano [300], [301], y tiene funciones importantes en la diferenciación celular de varios tipos celulares [300]–[304]. Además de mantenerse expresado en varios tejidos durante la vida adulta [305]. Su capacidad como FT pionero permite a FoxA2 unirse directamente a la cromatina condensada, incluso en presencia de nucleosomas, y abrir localmente la cromatina, facilitando la accesibilidad del ADN, promoviendo la expresión de genes clave involucrados en la diferenciación celular hacia linajes endodérmicos [306]–[310]. Si bien es conocido por su rol de activador transcripcional, en ciertos contextos, FoxA2 reprime la expresión génica [311] y es capaz de reclutar correpresores conduciendo a la compactación de la cromatina [312]. En particular, detectamos antecedentes de suma relevancia para nuestro objetivo; específicamente, se demostró que FoxA2 es fosforilado por AKT1 en el sitio T156. Esta MPT promueve la exclusión nuclear de este FT y la inhibición de su actividad transcripcional, tanto en hepatocitos en respuesta a insulina [313] como en contextos tumorales [314]. Por otra parte, en diferentes contextos patológicos se ha hallado una correlación negativa entre los niveles de FoxA2 y la expresión de Nanog [315]–[318]. Asimismo, en este mismo sentido, en la línea HepG2, derivada de hepatoblastoma y durante el proceso de diferenciación a hepatocitos de CMP humanas, la disminución de la expresión de FoxA2 produce un aumento de los niveles del ARNm de Nanog [319]. Sin embargo, no hay reportes sobre fosforilación de FoxA2 por AKT en CMP. Basándonos en estos antecedentes, especulamos que este mecanismo regulatorio podría tener una relevancia similar en el contexto de CMP en general y específicamente, en CME, desempeñando un papel crucial en la regulación de Nanog. Específicamente, nuestra hipótesis es que FoxA2 reprime Nanog y que AKT1 fosforila a FoxA2 promoviendo su salida del núcleo, interfiriendo de esta manera con la represión de Nanog por FoxA2 y produciendo así su efecto inductor. Para explorar esta idea, analizamos datos de experimentos de ChIP-seq disponibles públicamente [320]–[322] (Figura D. 1) y detectamos que FoxA2 es capaz de unirse al locus de Nanog. Estas observaciones abrieron una nueva línea de investigación en el laboratorio, en la que se está estudiando el posible rol de este TF en los efectos descriptos en esta tesis.

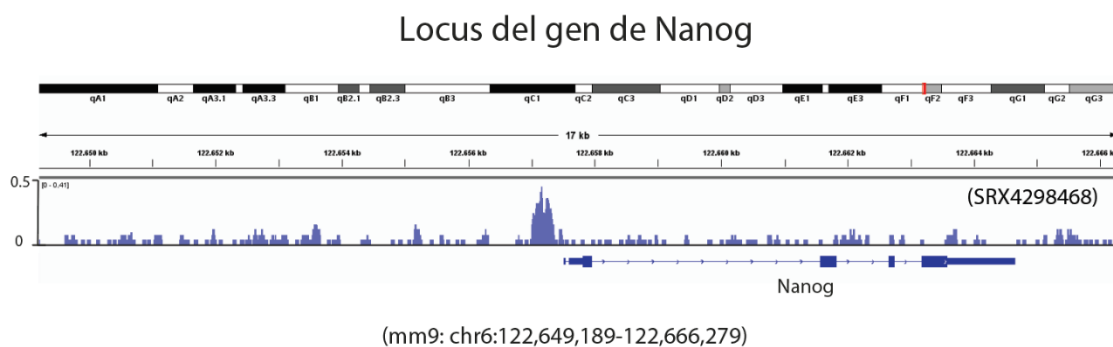


Figura D. 1. Sitios de unión de FOXA2 sobre el gen Nanog en CME. Visualización representativa del perfil de enriquecimiento (lecturas por millón) de FOXA2 en la región del locus genómico de Nanog. Estos resultados corresponden al análisis de datos de ChIP-seq de experimentos realizados en CME, obtenidos de la base de datos

publico ChIP Atlas (ID:SRX4298468). Los datos fueron visualizados usando el software Integrative Genomics Viewer (IGV).

Por otro lado, dado que la SUMOilación afecta la compartimentalización de diversas proteínas, hipotetizamos que esta MPT podría también afectar la distribución subcelular de AKT1, impactando por este mecanismo en su función y especificidad. Especulamos que explorar la distribución de las diferentes variantes de AKT1 podría proporcionar una pista no solo del mediador involucrado en el efecto descrito previamente, sino también sobre otros efectos que pueda tener esta MPT sobre la función de esta quinasa. Para poder estudiar la distribución subcelular en células vivas, evitando alteraciones que puedan producirse como consecuencia del proceso de fijación, generamos proteínas de fusión a la proteína fluorescente mCherry de las variantes de AKT1 con diferente capacidad de ser SUMOiladas, lo que nos permitió, no solo estudiar la distribución, sino además realizar nuevos abordajes utilizando microscopia confocal en células vivas.

En primer lugar, encontramos que la SUMOilación modula tanto la compartimentalización como la distribución intra-compartmentos de AKT1. Notoriamente, la SUMOilación no afectó la asociación a la membrana característica de la mutante AKT1 E17K, debido a que la E17K y E17K/2KR poseen distribución similar con respecto a esta asociación; sin embargo, detectamos que esta MPT promueve la traslocación al núcleo de esta quinasa. Para sintetizar y representar de manera más gráfica nuestros resultados, presentamos la Figura D. 2, observamos que en CME, las variantes SUMOilables de AKT1 presentan una proporción nuclear mayor que sus contrapartes de SUMOilación disminuida. Sobre este parámetro, la mutante E17K presentó la mayor relación núcleo/citoplasma, y mayor homogeneidad en su distribución nuclear, evidenciada por un menor CV. Estas características que modifican la distribución de AKT1, particularmente en el espacio nuclear, podrían tener efectos considerables tanto sobre el estado de la cromatina, como sobre la actividad de diferentes proteínas involucradas en la regulación de la transcripción. En ambos casos, este efecto sobre la distribución de AKT, podría impactar en la regulación de la expresión génica, lo que en última instancia repercute en la identidad celular.

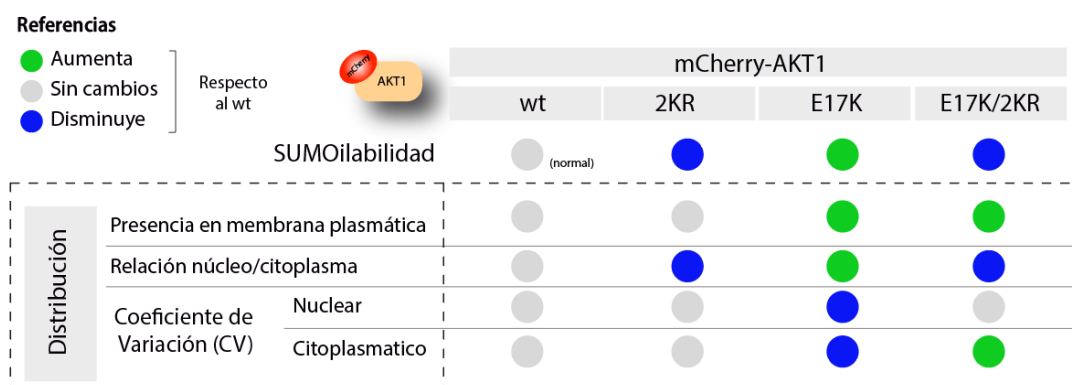


Figura D. 2. Resumen de efectos de la SUMOilación de AKT1 sobre su distribución.

Este efecto de la SUMOilación sobre la distribución subcelular nos lleva a especular sobre el mecanismo que podría estar involucrado. Debido a la falta de una señal de localización nuclear (NLS) y otras secuencias de transporte en AKT, se ha propuesto que el transporte citoplasma-núcleo de esta quinasa se logra a través de su asociación con una proteína aún desconocida [323], por lo tanto, el mecanismo molecular subyacente a esta translocación de AKT sigue siendo desconocido [324]. Especulamos que la SUMOilación de AKT podría favorecer la interacción entre AKT y esta proteína hipotética necesaria para su importación nuclear, promoviendo así su acumulación en el núcleo. Hay antecedentes que sugieren a ciertas proteínas como mediadoras en diferentes contextos. Particularmente, se ha sugerido que la proteína de unión a actina, Cofilina, que contiene una NLS funcional y que media el transporte de actina a través de la asociación con un receptor de importación nuclear [325], podría mediar el transporte nuclear de AKT en células de melanoma [323]. Por otro lado, existen reportes que involucran al protooncogén y coactivador de AKT, TCL1 (T cell leukemia 1), en la importación nuclear de AKT en diferentes tipos de células cancerosas [275]. TCL1 se une a AKT en el citoplasma y la ayudaría a migrar al núcleo, desde donde podría contribuir a la regulación la expresión de genes clave para la proliferación y la pluripotencia.

Otra posibilidad, no excluyente, es que la SUMOilación afecte la exportación de AKT del núcleo, al enmascarar o impedir el reconocimiento de la secuencia de exportación nuclear (NES) que todas las isoformas de AKT contienen [275]. Específicamente, se ha demostrado que esta señal es necesaria para la exportación de AKT, ya que mutantes de AKT1 con una NES no funcional presentan una localización nuclear persistente [326].

En este mismo sentido, la mayor proporción nuclear de AKT1 E17K observada podría estar relacionada con sus propiedades oncogénicas en otros tipos celulares. Por ejemplo, se ha reportado que la presencia de la mutante AKT1 E17K en células pulmón transforma dichas células, y produce un aumento de los niveles de los FTs de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG [327], cuya presencia en diferentes tumores en general está asociada con un pronóstico desfavorable para el paciente. Cabe destacar que varios reportes sugieren la expresión ectópica o la actividad anómala de Nanog como condición suficiente para la transformación oncogénica, por lo que la inducción del gen Nanog sumado a los cambios observados y los que discutiremos a continuación, también podrían ser parte de un mecanismo relacionado con las propiedades oncogénicas de la mutante AKT1 E17K.

Las propiedades oncogénicas y transformantes de esta mutante siempre fueron atribuidas a su asociación característica a la membrana plasmática, lo que contribuye a su hiperactivación por fosforilación. Sin embargo, durante el transcurso de este trabajo demostramos que la SUMOilación también juega un papel importante en los efectos de esta mutante y que su traslocación a la membrana no es condición suficiente para sus efectos río abajo, debido a que la mutante AKT1 E17K/2KR muestra una distribución similar aún con su SUMOilabilidad disminuida, sin embargo, tiene

efectos distintos en muchos de los parámetros estudiados en CME. En este sentido y como prueba de concepto, también estudiamos el efecto de otra variante diferente de AKT1 hiperfosforilada, hiperactiva, capaz de ser conjugada a SUMO y asociada a la membrana plasmática como consecuencia de una mutación diferente a la E17K (detallado en el Capítulo 1); la AKT1 MYR. En particular, demostramos que esta mutante también requiere de la SUMOilación para ejercer su efecto inductor sobre el promotor de Nanog (Figura R. 7) y no basta con poseer una señal que promueva su localización preferencial en la membrana para este efecto. En conjunto, estos resultados demuestran que la localización en la membrana de AKT1 no es condición suficiente para su función en CME.

Por último, con respecto a los análisis de distribución de AKT1, durante el desarrollo de estos experimentos, hubo otras observaciones que no fueron exploradas en detalle durante esta tesis. Por un lado, como puede observarse en la Figura R. 36, existen zonas dentro del citoplasma donde las variantes mCherry-AKT1 están completamente excluidas. En general, estas zonas parecen tener forma de una posible organela membranosa. Quedan como interrogante dilucidar la identidad de estas regiones y entender la relevancia del por qué AKT1 se encuentra excluida de estas estructuras en CME y si existen diferencias, por ejemplo, de tamaño o cantidad, en presencia de las diferentes variantes de AKT1. Por otro lado, observamos que existen zonas en regiones de la membrana de ciertos contactos célula-célula, en donde AKT1 tiende a concentrarse. Como comentamos en la sección correspondiente de este resultado, estas observaciones concuerdan con reportes previos que indican que esta quinasa puede translocar a la membrana y ser activada por E-cadherina en las uniones célula-célula [256]–[258]. Sin embargo, la relevancia de esta observación en CME y la dependencia con la SUMOilación de AKT todavía permanece como interrogante, planeamos explorarlo en el futuro.

Retomando los hallazgos sobre la mayor traslocación al núcleo de las variantes SUMOilables, nos preguntamos si AKT, de manera dependiente de su SUMOilación, podría estar teniendo efectos sobre parámetros nucleares involucrados en la regulación de la expresión génica. En primer lugar, nos enfocamos en explorar el estado global de la cromatina de CME mediante la evaluación de la distribución subnuclear de la proteína asociada a heterocromatina HP1 α . Esta proteína generalmente está asociada a regiones de alta compactación de heterocromatina, y su distribución dentro del núcleo es utilizada para revelar la organización global de la cromatina y su estado de compactación, como describimos en el Capítulo 2. Sin embargo, HP1 α también posee una función regulatoria en la eucromatina, generalmente actuando como represor de la expresión génica. Además de los antecedentes comentados previamente que vinculan AKT1 con remodeladores de la cromatina, una de las principales motivaciones por la que realizamos este experimento fue la posible relación entre una remodelación global de la cromatina y los cambios de expresión que observamos sobre el gen Nanog. Sin embargo, encontramos que la única variante que modificó considerablemente los parámetros de HP1 α analizados fue la mutante AKT1 E17K, y este efecto resultó dependiente de su

SUMOilación. Esta mutante hiperactiva y transformante, modificó la distribución global de esta proteína asociada a la heterocromatina, aumentando el espacio nuclear ocupado por las regiones de alta intensidad, sugiriendo un cambio global en la organización de la cromatina (resumido en la Figura D. 3). Todavía resta explorar si existen efectos adicionales que todavía no hemos podido detectar, como también el mecanismo por el cual se produce esta reorganización de HP1 α , y probablemente, de la heterocromatina dentro del núcleo. Una posibilidad es que el efecto observado sea consecuencia de una mayor proporción de la quinasa en el núcleo. Particularmente, la mutante E17K fue la que mostró mayor traslocación al núcleo. Especulamos que es posible que AKT1 modifique directamente a HP1 α y esto produzca una reorganización de su distribución. Sin embargo, no podemos descartar que se produzcan otras modificaciones, por ejemplo sobre histonas, que promuevan de manera directa o indirecta un cambio más general en la estructura de la cromatina. Con respecto a esto último, existen reportes que vinculan la fosforilación de la Histona 3 con cambios en la interacción de HP1 α con la cromatina [328]. Si bien el mecanismo subyacente todavía no fue dilucidado, nuestros resultados mostraron un efecto diferencial de esta mutante de AKT1 que podría tener implicancias en la regulación génica.

Dado que cambios en el estado de la cromatina pueden producir modificaciones en la interacción y accesibilidad de FTs con sus sitios blanco dentro del genoma, nos propusimos estudiar la organización subnuclear y la dinámica de interacción con la cromatina de los principales FTs de pluripotencia y su relación con la SUMOilación de AKT1. En conjunto, si se observaran cambios en presencia de las diferentes variantes de AKT en alguno de los parámetros evaluados de estos TFs, podría conducir a cambios en la función de los mismos. En primer lugar, observamos que las diferentes variantes de AKT1 tuvieron diferentes efectos (resumidos en la Figura D. 3) tanto sobre la distribución de estos FTs (estudiada para OCT4 y SOX2), como sobre su dinámica de interacción con la cromatina, analizado mediante la técnica de FCS (estudiada para OCT4, SOX2 y NANOG).

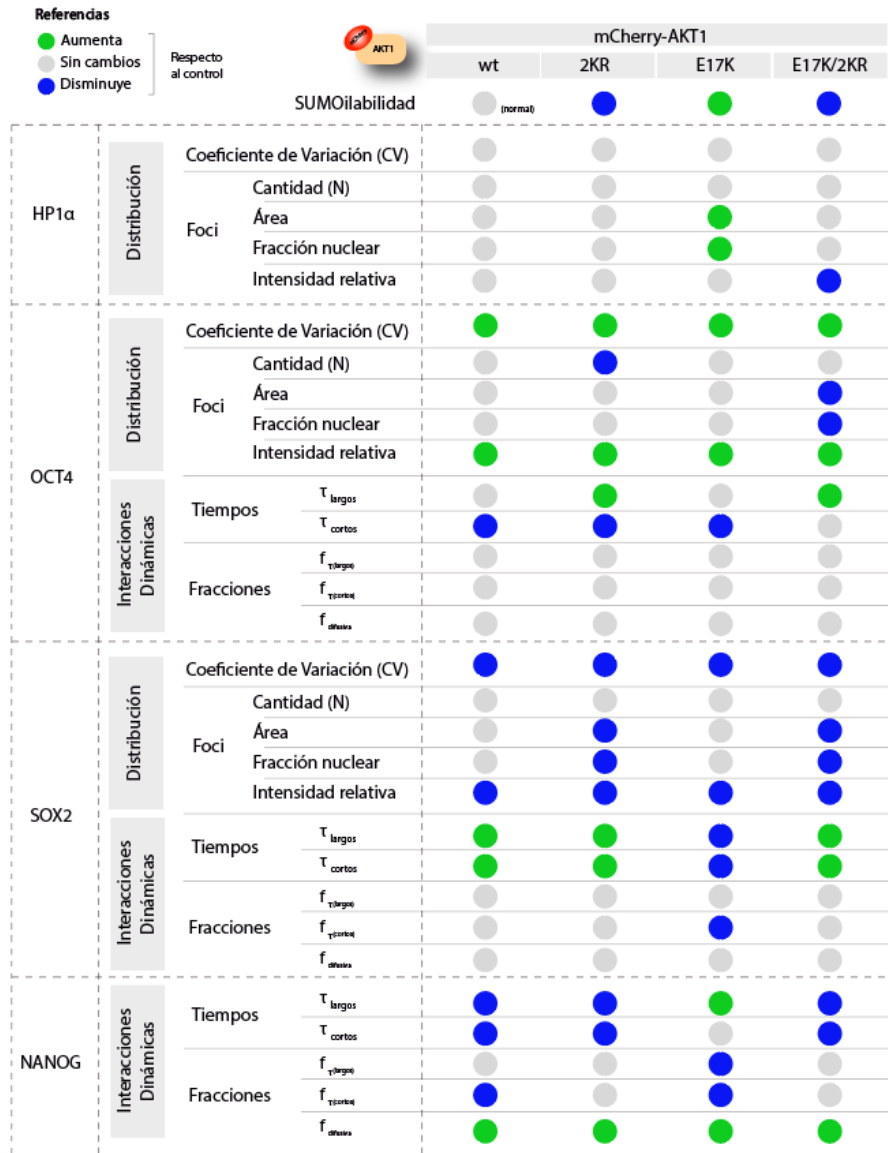


Figura D. 3 Resumen de efectos de la SUMOilación de AKT1 sobre la cromatina, distribución subnuclear e interacciones dinámicas de los FTs de pluripotencia con la cromatina.

Por otro lado, dado que los cambios observados con los FTs no correlacionan directamente con los efectos encontrados sobre HP1 α , donde la mutante E17K fue la única que tuvo efecto notorio, deducimos que las distintas variantes, en distinta medida, son capaces de modificar la función de estos FTs por un mecanismo diferente a la modificación del estado global de la cromatina, o al menos, mediante cambios no detectables evaluando la distribución de HP1 α . Si bien, los parámetros estudiados para cada FT fueron afectados de manera diferente por cada variante de AKT1; en líneas generales, **las variantes SUMOilables**, y en especial la AKT1 E17K, produjeron un efecto que mostró una tendencia a disminuir los tiempos de interacción. Esto podría estar reflejando un cambio en el paisaje de interacciones, probablemente consecuencia de una redistribución de los FTs entre sus sitios blanco, consistente con los cambios observados en su distribución. Para confirmar esta hipótesis se requieren experimentos adicionales, como por ejemplo análisis de ChIP-seq, el cual nos permitiría comparar el paisaje de interacciones a nivel global, en presencia de cada variante. Con respecto a

estos procesos de reorganización, la redistribución de estos dos TFs de pluripotencia a nuevos sitios blanco ya ha sido reportada; específicamente, se encontró que en una ventana temporal temprana en respuesta a señales de diferenciación. En la transición de pluripotencia naïve a *primed*, OCT4 se relocaliza pasando de estar unido junto a SOX2, a enhancers asociados a genes de pluripotencia, a interactuar junto con OTX2, cuya expresión se induce en la mencionada ventana temporal, con enhancers regulatorios de genes asociados a diferenciación [76]. Además, para el caso de NANOG, observamos que todas las variantes produjeron un aumento de la fracción difusiva, indicando una menor interacción global con la cromatina. Con respecto a **las variantes con SUMOilación disminuida**, en general, produjeron un efecto que tendió a disminuir la heterogeneidad en la distribución de los FTs evaluados, indicando un menor reclutamiento de estos FTs a los foci. Por otra parte, encontramos que estas variantes de AKT tienden a aumentar los tiempos de interacción con la cromatina de OCT4 y SOX2, y tuvieron el efecto opuesto sobre NANOG. Muchos de estos cambios fueron dependientes de la SUMOilación, aunque observamos efectos en los que esta MPT no parece intervenir. Como se puede advertir, no incluimos en este trabajo análisis de distribución de NANOG. Esto se debe a que, a diferencia de las líneas de CME que expresan de manera inducible a YPet-OCT4 o YPet-SOX2, la línea de CME generada en nuestro laboratorio que expresa eGFP-NANOG no nos permitió realizar dichos análisis, principalmente por los bajos niveles de expresión de esta proteína de fusión, que resultan en una muy baja intensidad de fluorescencia. Si bien para estos análisis se utiliza un microscopio confocal en donde la potencia del laser y el tiempo de muestreo pueden ser modificados para mejorar la obtención de estas imágenes, no pudimos encontrar una condición en la que la calidad de la imagen sea de utilidad, sin generar daños al fluoróforo por fotoblanqueo (*photobleaching*) o daño celular por stress, lo que podría invalidar los resultados obtenidos en estas condiciones por posibles artificios de la técnica. Por otro lado, en esta línea celular pudimos analizar la interacción dinámica de NANOG con la cromatina, ya que la técnica de FCS requiere una menor cantidad de moléculas fluorescentes difundiendo e interactuando con sus sitios blanco, y las mediciones puntuales no generan un daño considerable a los núcleos.

Especulamos que los cambios observados tanto en la distribución de los FTs como en la dinámica de interacción con la cromatina, pueden ser consecuencia de varios mecanismos; por un lado, las posibles MPTs que puedan ocurrir en los FTs y que puedan modificar su actividad, como consecuencia de la actividad y localización de las diferentes variantes de AKT; y por otra parte, AKT1 podría promover cambios en la accesibilidad de la cromatina o incluso, cambios de mayor jerarquía en la estructura nuclear. En este sentido, se ha reportado que AKT interviene en la regulación de diferentes proteínas del citoesqueleto [329]–[331]. En particular, AKT es capaz de promover la motilidad celular principalmente a través de la reorganización de actina en fibroblastos de mamífero y en células tumorales [332]–[334]. Por ejemplo, se reportó que la vía de PI3K/AKT es esencial en la modulación de los rearrreglos en el citoesqueleto necesarios para el cambio de fenotipo durante el remodelado

vascular en células de la arteria pulmonar [330] y en la reorganización del citoesqueleto de actina en células endoteliales [334].

Además, se sabe que la dinámica de los componentes del citoesqueleto tiene un rol fundamental en diferentes procesos celulares. Entre ellos, el citoesqueleto tiene un rol esencial en la transmisión de señales mecánicas de las células y participa en la integración de señales extracelulares e intracelulares [335]. Es importante destacar que a través de modificaciones del citoesqueleto las fuerzas externas aplicadas a las células pueden afectar la forma y posición del núcleo [336], [337] y modular de esta manera diversos aspectos de su función, incluida la organización de la cromatina y los programas de expresión génica [338]–[340]. Incluso, en un trabajo pionero [341], se demostró que estímulos mecánicos provenientes del microambiente, específicamente, la elasticidad y rigidez del sustrato, afectan el destino de células madre interviniendo en su viabilidad, proliferación y dirigiendo su diferenciación. Se ha reportado que el citoesqueleto es crucial durante la diferenciación, involucrada tanto en el desarrollo embrionario, como en diferentes modelos de diferenciación *in vitro* [342]–[344]. Por ejemplo, tanto la polimerización de actina como las interacciones actina-miosina modulan la diferenciación de CME [345].

Resultados previos de nuestro grupo muestran que tanto alteraciones en los filamentos de actina como en la red de vimentina impactan sobre la morfología nuclear y sobre las interacciones entre OCT4 y la cromatina [346]. Estos resultados destacan el papel de componentes específicos del citoesqueleto en la modulación de la forma del núcleo de las CME y su impacto en la organización dinámica de un FT de pluripotencia dentro del núcleo. En este sentido, análisis preliminares de imágenes 2D de microscopía confocal no mostraron efectos de las diferentes variantes de AKT sobre la morfología nuclear, sin embargo, creemos que podría haber algún efecto pero que se requiere un análisis más profundo que involucre reconstrucciones 3D como realizamos en otros trabajos del grupo [347]. Por lo tanto, nuevas líneas de investigación en el laboratorio harán foco en el rol SUMOilación de AKT en la regulación del citoesqueleto y un posible impacto en la estructura nuclear en el contexto pluripotente y en el proceso de diferenciación.

Finalmente, como resumen de la última parte de este trabajo, encontramos que las diferentes variantes de AKT1 tienen distinta distribución subcelular sugiriendo que la SUMOilación afecta este parámetro; asimismo, tanto esta MPT como la mutación E17K, afectan directa o indirectamente la organización y dinámica de interacción con la cromatina de los FTs de pluripotencia en CME. Extendiendo los hallazgos en este modelo celular, y considerando que estos FTs también se ven desregulados en patologías como el cáncer, especulamos que las modificaciones producidas por la mutante E17K, podrían estar involucradas tanto en sus propiedades oncogénicas como en otras patologías que produce esta mutante. Específicamente, en ratones está reportado que la presencia de la mutación E17K es letal embrionaria, por causa de graves alteraciones en el sistema vascular

[348]. Sin embargo, en humanos se ha visto la aparición de esta mutación en heterocigosis en diferentes etapas del desarrollo embrionario, causando una patología denominada Síndrome de Proteus (OMIM #176920) [349]. Esta patología es una enfermedad poco frecuente, desatendida y muchas veces incapacitante, caracterizada por un crecimiento desproporcionado y progresivo que puede ser grave y resultar en una muerte prematura de los individuos afectados [350], [351]. Las manifestaciones clínicas son heterogéneas e incluyen el crecimiento excesivo de casi cualquier órgano o tejido, y pueden generar una gran variedad de quistes, tumores y malformaciones vasculares. Estas malformaciones ocurren con frecuencia en una mitad del cuerpo, que resulta más grande que la otra, motivo por el cual en el pasado se diagnosticó erróneamente a estos pacientes como pacientes de elefantiasis o *elefantismo* [352]. En 1986, se propuso que el síndrome de Proteus debía ser causado por una variante génica en heterocigosis, la cual en homocigosis debía ser letal y solo viable en heterocigosis y en estado mosaico. Esto se confirmó recién en el año 2011, con el advenimiento de la secuenciación masiva, y se identificó la variante causal, AKT1 c.49G > A, es decir AKT1 p.(E17K) en estos pacientes [353]. En todos los casos, esta mutación en el gen de AKT1 estaba presente en estado heterocigota y solo en un subconjunto de células en cada individuo, indicando que esta mutación ocurriría espontáneamente durante el desarrollo temprano, afectando así a un conjunto, a veces, limitado de tejidos. Si bien no hay cifras oficiales de su incidencia en la Argentina, se sabe que la misma es muy baja en el mundo, estimándose una prevalencia menor a 1/1.000.000 recién nacidos vivos. En la Argentina hace aproximadamente una década se había reportado un caso, cuyo deceso sucedió en 2016 (nota periodística en [354]), y en la actualidad conocemos la existencia de al menos un caso más. Por lo tanto, esperamos que muchos de los resultados y conclusiones obtenidas en este trabajo de tesis, en especial con respecto a la mutante AKT1 E17K, puedan contribuir al entendimiento de la génesis y patogenicidad de este síndrome. Y por qué no, en algún momento contribuir a algún tratamiento o paliativo para portadores de esta mutación. En conclusión, este ejemplo de vinculación de nuestro trabajo con el campo de la salud destaca la vital importancia de la ciencia básica como punto de partida, en la que se forja una comprensión profunda de los fenómenos fundamentales que luego pueden guiar el futuro desarrollo de campos más aplicados, soluciones prácticas y tecnologías innovadoras.

Finalmente, hemos revisado y puesto en contexto los diversos resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis doctoral. Si bien muchos de éstos generaron discusiones robustas y concluyentes, otros, se convirtieron en el puntapié inicial de nuevas ideas y líneas de investigación del laboratorio, las cuales serán abordados en la siguiente sección. En síntesis, en este trabajo hemos demostrado como una modificación post traduccional de una quinasa, específicamente la SUMOilación de AKT1, impacta en diversos procesos celulares y moleculares, que en última instancia son relevantes para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las células madre pluripotentes.

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Desde la concepción de este trabajo de tesis, nos propusimos contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares que controlan el estado pluripotente en células madre. Su estudio es esencial para entender en profundidad los diferentes mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica que define la identidad celular, clave para la futura aplicación segura de estas células en el área de la medicina regenerativa.

Por lo tanto, debido al rol de la vía de AKT1 en el mantenimiento de la pluripotencia, y además, de la importancia de la SUMOilación en la regulación de la función de distintas proteínas, nos preguntamos si la SUMOilación de AKT1 podría estar añadiendo una capa adicional en la regulación de esta quinasa en CME, contexto en el cual no se había explorado el rol de esta MPT de AKT.

En este trabajo, encontramos que AKT1 afecta de manera dependiente de su SUMOilación, diferentes procesos relevantes para el mantenimiento del estado pluripotente en CME. En primer lugar, hallamos que la SUMOilación de AKT1 puede modificar la compartimentalización y distribución de esta quinasa, en particular promoviendo su presencia nuclear. A partir de estos análisis, observamos también que existen zonas en las que AKT1 tiende a concentrarse, como por ejemplo en regiones localizadas en los contactos célula a célula, y otras donde se observa una completa exclusión, dentro del citoplasma. Futuras líneas de investigación del laboratorio se enfocarán en estudiar este comportamiento de AKT1 y los efectos de su SUMOilación en CME.

Además, encontramos que esta MPT sobre AKT1 promueve la inducción de la expresión del factor de transcripción de pluripotencia Nanog a través de un mediador todavía elusivo, pero que no es un factor trivial. Si bien gran parte del tiempo invertido en este trabajo lo dedicamos a intentar develar la identidad del posible intermediario, sin poder dilucidarlo, encontramos que los candidatos triviales más importantes no serían esenciales en esta regulación. A su vez, a partir de estos estudios, surgieron nuevos posibles candidatos, entre ellos, el FT FoxA2 que se encuentra actualmente en estudio.

Por otro lado, hemos detectado que se producen cambios en el estado general de la cromatina, la organización y distribución subnuclear de los factores de transcripción de pluripotencia dentro del núcleo y la dinámica de interacción de éstos con la cromatina y estos cambios son diferentes dependiendo de la variante de AKT1 utilizada y su capacidad de ser SUMOilada. Cómo AKT1 llega a intervenir en todos estos procesos, y si estos efectos son producidos de manera directa por fosforilación de las proteínas mencionadas o a través de otro intermediario, será objeto de estudio en el futuro.

Por último, el mantenimiento del estado pluripotente involucra múltiples y complejos procesos interconectados y altamente regulados, tales como la dinámica del citoesqueleto y la integración

mecánica de señales extracelulares e intracelulares, los cuales repercuten en la dinámica de la cromatina y por ende en la expresión y organización dinámica de los factores de transcripción de pluripotencia. Actualmente, nuestro grupo está comenzando a estudiar el rol de AKT1 en estos procesos y si los efectos dependen de la SUMOilación de esta quinasa, como así también, si la presencia de la mutación oncogénica E17K los modula diferencialmente.

En síntesis, en este trabajo hemos encontrado múltiples efectos de una modificación post traduccional hasta el momento poco explorada en CMP, sobre una quinasa multifacética, que muy probablemente impacten en su función y por ende, en procesos relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia en CMP. Además, hemos generado valiosas herramientas y nuevas preguntas que abren la puerta a nuevas líneas de investigación que derivan de los hallazgos de esta tesis.

Con certeza, creemos que estos resultados aportan al entendimiento del funcionamiento de la intrincada red de elementos que regulan la pluripotencia y demuestran, una vez más, que aún queda mucho por ser descubierto.

Lic. Marcos Gabriel Francia

Dra. Alejandra Sonia Guberman

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Generalidades de cultivo celular

6.1.1 Cultivo de células madre pluripotentes (CMP)

La mayor parte de los experimentos de esta tesis fueron realizados sobre la línea establecida de células madre embrionarias de ratón (CME) W4/129S6 o simplemente "W4" (Cellosaurus ID CVCL_Y634), establecida por Auerbach et al [173] a fines de la década del 1990 en el laboratorio de la Dra. Alexandra Joyner, y gentilmente cedida por el Dr. Ali Brivanlou de la Universidad Rockefeller en los Estados Unidos, o sobre líneas derivadas de ésta. Además, ocasionalmente utilizamos la línea de células madre pluripotentes inducidas de ratón (CMPI) "iPS20", previamente generada en nuestro laboratorio [355]. La lista completa y breve descripción de las líneas utilizadas en esta tesis se encuentra en la (Tabla 1).

Para mantener las células en un estado indiferenciado, las CMP (CME y CMPI) fueron cultivadas en un medio de propagación compuesto por high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con Glutamax 2 mM, MEM aminoácidos no esenciales 100 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM y penicilina-estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) y 15% de suero fetal bovino (SFB). Este medio además contiene la citoquina LIF y los inhibidores de MEK y GSK3, en conjunto conocidos como 2i, PD0325901 (Tocris) 0,5 µM y CHIR99021 (Tocris) 3 µM. El LIF es obtenido en nuestro laboratorio a partir de una línea de células CHO (Chinese Hamster Ovary) genéticamente modificadas para producir LIF (CHO-LIF). Todos los reactivos, excepto los indicados, son marca Gibco (Thermo Fisher).

Dado que las CMP no se adhieren al plástico de las placas de cultivo debe realizarse previamente un tratamiento de las superficies ("*coating*") que consiste en la incubación con soluciones específicas que generan una superficie apropiada para el plaqueo. El *coating* requerido es diferente según el tratamiento que recibirán las células plaqueadas. Tanto la propagación de los *stocks* de CMP, como el plaqueo de las células requeridas para los experimentos que no involucran técnicas de microscopia, se realizó en placas previamente tratadas con gelatina de piel bovina (Sigma) 0,1% en PBS durante 15 minutos a 37°C. Para experimentos que involucran microscopia de células fijadas o vivas, se utilizaron otros tipos de *coating*, especificados según corresponda, como el tratamiento de vidrios con Geltrex (Gibco) durante 1 hora a 37°C, o con 100 µg/ml de Poli-D-Lisina (PDL, Sigma) durante 1 hora y luego con una solución de 20 µg/ml de laminina (Thermo Fisher) durante 2 horas a 37°C, a lo que llamamos "PDL-laminina".

Las placas con células fueron mantenidas en una estufa a 37°C con una concentración de CO₂ al 5% v/v. Los *stocks* de CMP se re-plaquearon cuando alcanzaban una confluencia de alrededor del 80%, generalmente cada 48-72 h, mediante un protocolo convencional de tripsinización pero que involucra

la remoción de la tripsina mediante centrifugación. Brevemente, esto implica descartar el medio de cultivo de cada placa, lavarlas con PBS pH 7.4, e incubar las células adheridas con una solución de Tripsina 0,25% y EDTA 0,5 mM (Gibco) a 37°C durante 3-5 minutos, agitando ocasionalmente las placas para favorecer la disgregación de las células. Luego, se completa la separación en forma mecánica con una pipeta para evitar la formación de agregados de células y se inactiva la tripsina agregando el mismo volumen de medio conteniendo SFB 10%. Esta solución de CME es centrifugada 5 min a 1100 rpm, con el objetivo de concentrar las células al fondo del tubo o “*pelletearlas*”, para poder retirar el sobrenadante conteniendo tripsina. Finalmente, se resuspende el *pellet* de células y en una nueva placa de cultivo cuyo *coating* se realiza previamente, se agrega medio de propagación correspondiente a la superficie de la placa y se siembra una cantidad adecuada de células de la suspensión de CMP. Los cultivos se controlaron diariamente para verificar el estado de las células, cambiando el medio de propagación en caso de ser necesario. Las particularidades de las condiciones de cultivo de cada experimento se encuentran detalladas en las secciones correspondientes a los mismos.

6.1.2 Cultivo de células no pluripotentes

Además de CMP, durante el desarrollo de esta tesis, empleamos las líneas celulares NIH 3T3 (ATCC CRL-1658), HEK 293T (ATCC CRL-3216) y U-2 Os (ATCC HTB-96) (ver Tabla 1). Los *stocks* células fueron mantenidos en medio de propagación base, conteniendo DMEM (Gibco), complementado con 10% SFB (Internegocios) y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml) (Gibco). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 5% v/v de CO₂. Cuando alcanzaban aproximadamente un 80% de confluencia, los cultivos fueron re-plaqueados utilizando el protocolo convencional de tripsinización previamente descrito. Las particularidades de cultivo de cada experimento se encuentran detalladas en las secciones correspondientes a los mismos.

Nombre	Tipo celular	Especie	Observaciones
W4	Células madre embrionarias (CME)	Ratón (Mus musculus)	Wild type
W4 Tbx3-KO			Knockout del gen Tbx3 (generada en este trabajo) [174]
W4 p53-KO			Knockout del gen Tp53 (generada por el Dr. Ariel Waisman) [114]
W4 YPet-SOX2			Expresa proteína de fusión YPet-SOX2 inducible por doxiciclina (generada por la Dra. Camila Vazquez Echegaray) [106]
W4 YPet-OCT4			Expresa proteína de fusión YPet-OCT4 inducible por doxiciclina (generada por la Dra. Camila Vazquez Echegaray) [106]
W4 eGFP-NANOG			Expresa proteína de fusión EGFP-NANOG (generada por la Lic. Camila Osés) [105]
IPS20	Células madre pluripotentes inducidas (CMPI)	Humano (Homo sapiens)	(generada por la Dra. Claudia Solari) [201]
NIH 3T3	Fibroblastos embrionarios		ATCC CRL-1658
HEK 293T	Células de riñón embrionario humano		ATCC CRL-3216
U-2 Os	Osteosarcoma humano		ATCC HTB-96

Tabla 1. Lista de líneas celulares utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

6.1.3 Congelamiento y descongelamiento de células

Los stocks fueron mantenidos a largo plazo conservando las distintas líneas celulares en nitrógeno (N_2) líquido. Para el congelamiento, las células se tripsinizan de manera habitual, como detallado anteriormente, y se centrifugan a 1100 rpm por 5 min. Se resuspenden en 700 μ L de medio de cultivo completo, se agregan 200 μ L de SFB y 100 μ L de DMSO. Finalmente, se coloca la suspensión de células en un criotubo dentro del contenedor Mr. Frosty Freezing Container (Nalgene), según las instrucciones del fabricante y se incuban a -80°C por un mínimo de 4 h antes de colocar los criotubos en un tanque con nitrógeno líquido, donde son mantenidos por tiempo indefinido.

Para el descongelamiento de células, los criotubos son retirados del tanque de nitrógeno líquido, y rápidamente se descongelan en un baño térmico a 37°C . Una vez descongelados, se diluye la suspensión de células con 4 ml de medio de propagación fresco, y se centrifugan 5 min a 1100 rpm. Posteriormente, se resuspenden las células en el medio correspondiente, se analiza la viabilidad celular mediante el método de exclusión con Azul de Tripán, y se plaquean en placas apropiadas según la cantidad de células presentes en el criotubo.

6.1.4 Detección de contaminación de cultivos celular por *Mycoplasma sp.*

Regularmente se realizó la extracción de ADN genómico de las líneas celulares a estudiar y se analizó por PCR a punto final la amplificación de ADN bacteriano utilizando primers específicos de una secuencia conservada en diferentes especies de estas bacterias intracelulares [356]. Los primers utilizados se detallan en la sección correspondiente.

6.2 Metodología Experimental

6.2.1 Ensayo de actividad de Luciferasa

Para las mediciones del ensayo de actividad de luciferasa, se utilizaron placas MW24, donde las células fueron plaqueadas en una densidad determinada. Se utilizaron CMP en una densidad de 36000 células por pocillo, mientras que las NIH/3T3, HEK293T y U-2 Os fueron plaqueadas en 16000 células por pocillo, cada línea celular en su medio de propagación correspondiente. 24 h luego del plaqueo de las células, se realizó la transfección con el agente de transfección Polietilenimina (PEI, Poliscience Inc.). La relación ADN:PEI utilizado depende del tipo celular a ser transfectado (1:3 para CMP y 1:5 para otros tipos celulares). En estos ensayos se realizó la cotransfección de cada una de las variantes de AKT1 con un vector reportero del sistema de luciferasa dependiendo del tipo de experimento (Nanog5P reporter, Addgene #16337, o pMIR-REPORT-Nanog-3'UTR, gentilmente cedido por el Dr. Ariel Waisman, FLENI). Estos vectores contienen el gen de la enzima Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) cuya expresión está regulada por la región promotora de Nanog (Nanog5P) o por la región 3'UTR del transcripto de este FT (pMIR-REPORT-Nanog-3'UTR), respectivamente. Según requerido en ciertos experimentos, se incluyeron vectores adicionales en la mezcla de transfección, como por ejemplo los correspondientes a la UBC9(C93S) o los shARN específicos. La masa de ADN necesaria para cada uno de los experimentos realizados, se encuentra detallada en la Tabla 2. El ADN se diluye en medio OPTIMEM (Gibco) sin suero ni antibióticos. Se homogeniza la solución de PEI durante 15 segundos utilizando un vortex, se agrega la cantidad necesaria de PEI a la mezcla de ADN ya diluida y se incuba a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos. Luego, se agrega la solución conteniendo los complejos ADN-PEI gota a gota sobre el medio en la placa correspondiente y se homogeniza. A las 24 h luego de la transfección, el medio es cambiado por el medio correspondiente, según el tipo celular y experimento. Generalmente, luego de las 48 a 72 h post transfección, se descarta el medio, se realiza un lavado con PBS y se prosigue a lisar las células utilizando 80 µl de buffer de lisis de luciferasa en frío. El lisado es colectado y centrifugado por 2 min a 14000 x g. Para realizar la medir la actividad de

Luciferasa se incuban 50 µl del sobrenadante con 55 µl de buffer de reacción de Luciferasa conteniendo el sustrato (luciferina) durante 3 min a temperatura ambiente y se realiza la lectura de la intensidad de luz de cada pocillo en un luminómetro. En este trabajo se utilizó el equipo Glomax Multi Detection System (Promega). Se realizaron triplicados de cada condición ensayada y al menos tres réplicas biológicas.

Como método de normalización de los niveles de Luciferasa, se determinó la cantidad de proteínas totales en cada pocillo, mediante el método de Bradford. Los valores de actividad de Luciferasa luego se expresan como la relación entre los valores medidos para la actividad de esta enzima y los obtenidos para la masa de proteínas totales en el volumen de reacción. A su vez, en general, se relativizaron los resultados de los tratamientos con los obtenidos en el vector vacío (pcDNA3), a menos que se indique lo contrario.

Masa ADN para MW24					
Experimentos/ Figura	Figuras correspondientes	Reportero de Luc.	AKT1/PCDNA3	Si corresponde	
				Ubc9(C93S)	OTRO
Experimentos base en líneas W4, IPS20 y W4 Tbx3-KO: AKTs con reportero Nanog5P	Figuras 3,4,5,6,11,17,19 y 27	450 ng	500 ng	500 ng	-
CME con AKTs y reportero Nanog 3'UTR	Figura 8	1000 ng	650 ng	-	-
NIH/3T3, HEK293T, U-2 Os con AKTs y reportero Nanog5P	Figuras 12 y 13	480 ng	520 ng	-	-
HEK293T con AKTs y reportero Nanog5P	(Figura 14)	400 ng	450 ng	400 ng	-
Short hairpin ARN con AKTs y reportero Nanog5P	Figuras 22 y 23	450 ng	500 ng	-	shARN de FTs: 600 ng
W4 p53-KO y rescate con AKTs y reportero Nanog5P	Figura 28	450 ng	500 ng	-	p53: 300 ng

Tabla 2. Masa de ADN utilizada para los distintos abordajes experimentos que involucraron la medición de actividad de Luciferasa.

6.2.2 Silenciamiento del gen de Tbx3 en CME

6.2.2.1 Estrategia I. Disminución de la expresión de Tbx3 mediante silenciamiento post-transcripcional mediado por shARN: Generación de vectores

Se generaron dos vectores conteniendo secuencias previamente publicadas y validadas [242] (detalladas en la en la Tabla 3), específicas para generar shARNs contra el gen Tbx3 en el sistema Tet-pLKO-puro (Addgene Plasmid #21915, Figura 3.26A). Este vector contiene los elementos necesarios para expresar pequeños ARN del tipo short hairpin, utilizados para el silenciamiento de genes, según la secuencia clonada. Se utilizaron secuencias guía contra la región 3'UTR del transcripto de Tbx3, las cuales se encuentran esquematizadas en la Figura 3.26B, conteniendo las secuencias compatibles con

sitios de corte de las enzimas de restricción correspondientes (AgeI y EcoRI) que también se encuentran en el vector. Los oligonucleótidos fueron hibridados para la formación del oligonucleótido doble cadena con los extremos protruyentes compatibles y clonados en el vector previamente digerido con las enzimas correspondientes y purificado de gel. El producto de ligación fue utilizado para transformar bacterias ultracompetentes. Luego de obtener clones, elegimos dos, los amplificamos y enviamos a secuenciar.

6.2.2.2 Estrategia II. CRISPR-Cas9: Generación de línea de CME Tbx3-KO

La línea de CME Tbx3-KO se generó utilizando vectores de la tecnología CRISPR-Cas9 (PSpCas9(BB)-2A-Puro), publicados por el laboratorio de la Dra. Judith Davie, los cuales habían sido previamente utilizados para generar una línea Tbx3-KO en CME [244]. Como se esquematiza en la Figura R. 29A, utilizamos dos ARN guía, uno con sitio blanco en el exón 1 del gen de Tbx3 y el otro en el exón 2 (las secuencias se encuentran en la Tabla 3). Tal como se realizó previamente en el laboratorio [114], [116], se plaquearon células de la línea de CME w4 de pasaje temprano y luego de 24 h se realizó la transfección con estos plásmidos, que además codifican para un gen de resistencia a puromicina, utilizando el agente de transfección PEI, en una relación ADN:PEI de 1:3. Al día siguiente de la transfección se realizó un cambio de medio, en el que se incluyó el antibiótico puromicina, y se incubaron por 48 h para realizar la selección de las células transfectadas por estos vectores. Posteriormente, se realizó la amplificación de las células resistentes en medio de propagación sin antibiótico por unos días. Una vez amplificados, con el objetivo de generar líneas clonales, se plaquearon células en muy baja densidad y luego de 72-96 h, y debido a la forma en la que crecen las CME en cultivo, obtuvimos colonias clonales separadas entre sí y lo suficientemente grandes para poder aislarlas manualmente. Bajo una lupa y con un *tip* estéril de punta fina, pasamos algunas colonias a pocillos individuales en una placa de MW24 para lograr su amplificación. Una vez que los clones fueron amplificados lo suficiente para poder analizarlos, se eligió uno de ellos y se evaluó la presencia de la proteína TBX3 con un anticuerpo específico tanto por IF como por WB, confirmando la ausencia de esta proteína en el clon elegido y por lo tanto la interrupción en ambos alelos de este gen (Figura R. 29C-D).

Estrategia	Oligo	Secuencia (5'-3')
shARN	shARN-Tbx3 F	CCGGTGAATTGTACATAGCTGGATTCAAGAGAATCCAGCTATGTACAATTCG
	shARN-Tbx3 R	AATTCGAATTGTACATAGCTGGATTCTTCAAATCCAGCTATGTACAATTCG
CRISPR-Cas9	sgTBX3m 1 F	CACCGCTTCGCCATGAGCGCGGTAC
	sgTBX3m 1 R	AAACGTACC GCGCTCATGGCGAAGC
	sgTBX3m 2 F	CCACGTCCATTGCTCCCCGTAGCG
	sgTBX3m 2 R	AAACCGCTACGGGGGAGCAATGGAC

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el silenciamiento del gen de Tbx3

6.2.3 Análisis de la expresión génica

6.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final

Para las reacciones de PCR a punto final se utilizó la enzima DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en una termocicladora Ivema T18 (Ivema). La temperatura de annealing se ajustó para cada par de *primers* utilizados, cuya lista completa se encuentra en la Tabla 4. Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 a 2%, según el tamaño de los productos.

6.2.3.2 Análisis de niveles de ARNm mediante RT-qPCR

Esta técnica de análisis de niveles de ARNm involucra 3 etapas: extracción de ARN total, retrotranscripción (RT) y análisis mediante PCR cuantitativa (qPCR).

I. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total a partir de células en cultivo, utilizamos el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, las células se cosecharon mediante tripsinización o por *scrapping* directo de la placa (previo descarte de medio y lavado con PBS) con 500 μ l de TRIzol (para un well de placa MW12 o el volumen adecuado para la cantidad de células utilizadas). Las muestras en TRIzol son congeladas a -20°C o utilizadas en el momento para la extracción del ARN. El protocolo de purificación de ARN se realizó según las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue cuantificado con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y conservado a -80°C .

II. Retro-transcripción (RT)

Se utilizó la enzima transcriptasa reversa MMLV (Thermo Fisher Scientific) para realizar la retro-transcripción del ARN obtenido previamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaron hexámeros al azar de ARN (*random primers*) como *primers* para la retro-transcripción. En general, se partió de 1 μ g de ARN total y las muestras de ADNc obtenidas fueron diluidas 1/3 - 1/5 en $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$ libre de nucleasas, conservándolas a -20°C hasta su utilización.

III. PCR en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación de la expresión de ARNm específicos en las distintas condiciones experimentales, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real (qPCR), a partir de ADNc utilizando *primers* específicos según el gen en estudio (Tabla 4) con el kit SYBR Green Master Mix (Roche) y la termocicladora LineGene 9600 (BioER), según las indicaciones del fabricante. Por cada muestra se realizaron dos réplicas técnicas, y por cada set de primers utilizados, un control negativo sin muestra. Los datos fueron analizados con el software LinRegPCR [357], con el que se obtuvieron las eficiencias correspondientes a cada par de *primers* en cada reacción de PCR y, se calcularon los niveles teóricos iniciales de ADNc (N_0) para cada condición estudiada. Se evaluaron dos genes normalizadores (*housekeeping*) en simultáneo: el gen GAPDH y el gen PGK1, ambos utilizados de rutina en CME de ratón [358]. A partir de los N_0 de ambos genes, se calculó la media geométrica, que posteriormente fue utilizada para normalizar los niveles de expresión de los genes en estudio [359]. Todos los experimentos fueron realizados con al menos tres réplicas biológicas.

Nombre	Orientación	Secuencia (5'-3')
Mycoplasma	Forward	ACACCATGGGAGYTGGAAT
	Reverse	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT
Oct4	Forward	TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG
	Reverse	TGACGGGAACAGAGGGAAG
Sox2	Forward	CACAACCTCGGAGATCAGCAA
	Reverse	CTCCGGAAGCGTGTACTTA
Nanog	Forward	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG
	Reverse	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
GAPDH	Forward	TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG
PGK1	Forward	TGGGCAAGGATGTTCTGTTC
	Reverse	TGCAGTCCCAAAGCATCAT
Klf4	Forward	TACCCTCCTTCTGCCAGA
	Reverse	TTTGCCACAGCCTGCATAGT
Tbx3	Forward	GTCTCCATCGTGGGACATC
	Reverse	GGCCGTAGTGGTGGAAATCT

Tabla 4. Primers utilizados.

6.2.4 Inmunofluorescencia

Para los análisis mediante la técnica de Inmunofluorescencia (IF), las células fueron cultivadas en placas *multiwell* conteniendo un vidrio cubreobjetos de 12, 15 o 18 mm, según necesidades específicas del experimento, los cuales son previamente esterilizados por calor (horno) y, para CMP, además

previamente revestidos o “coateados” con Geltrex (Thermo Fisher). Las células se fijaron con una solución paraformaldehído (PFA) 4 % m/v en PBS durante 15 min a TA. luego de 3 lavados de 5 min con PBS, se incubaron con una solución de Triton X-100 0.1% v/v en PBS para la permeabilización de las células. Luego de 3 lavados con una solución de Tween 0.1% v/v en PBS (PBS-T), se realiza el bloqueo de 30 min con una solución de suero normal de cabra, burro o BSA, según compatibilidades con anticuerpos, 1% en PBS-T. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución de bloqueo según detallado en la Tabla 5, y los vidrios fueron incubados 1 h a TA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-T para luego realizar la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 5), que se encuentra acoplado a un fluoróforo específico y depende de las necesidades del experimento. Los anticuerpos secundarios fueron incubados junto con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución de bloqueo por 1 h a TA. Luego de 3 lavados con PBS-T se montaron las muestras con solución de montaje Mowiol Reagent (Calbiochem) y se dejó secar ON al resguardo de la luz. Al día siguiente se sellaron los vidrios con esmalte de uñas transparente. Dependiendo de las necesidades experimentales, se obtuvieron imágenes de las muestras en un microscopio invertido de epi-fluorescencia Olympus IX71 equipado con una cámara EXi Aque Bio-Imaging (Qimaging) o en un microscopio confocal FV1000 (Olympus), según se indica en cada caso. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software Fiji Is Just ImageJ (FIJI), y el análisis de datos se realizó en RStudio.

6.2.5 Western blot

Las proteínas totales fueron obtenidas mediante el *scrapping* de las células, previo descarte de medio de cultivo y lavado con PBS, utilizando el buffer RIPA (150 mM NaCl, 1% v/v NP-40, 0,5 % m/v Desoxicolato de Sodio, 0,1% m/v SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas Complete Mini EDTA-free (Roche) en frío. Los extractos proteicos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS para resolver las proteínas presentes, las cuales luego fueron transferidas a membranas PVDF (Amersham), siguiendo protocolos convencionales [360]. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a TA con una solución de 1% m/v de leche en polvo descremada (Sancor) en PBS-T, para luego ser incubadas con los anticuerpos primarios específicos (Tabla 5) en la misma solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche (ON). Posteriormente, luego de realizar 3 lavados con PBS-T, se incubaron los anticuerpos secundarios acoplados a la enzima HRP en solución de bloqueo durante 1 h a TA. Las membranas fueron reveladas utilizando ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en un equipo Amersham imager 600 (GE Healthcare), en general utilizando tiempo de exposición automático.

Nombre	Empresa y catálogo	Dilución para WB	Dilución para IF
NANOG	500-P236 (Peprotech)	-	1:100
SOX2	sc-17320 (SCBT)	1:400	1:100
OCT4	sc-5279 (SCBT)	1:400	1:100
GAPDH	sc-32233 (SCBT)	1:500	-
Anti-goat AlexaFluor 555	A21432 (Thermo Fisher)	-	1:1500
Anti-rabbit AlexaFluor 488	A21206 (Thermo Fisher)	-	1:1500
Anti-mouse IgG-HRP	G-21040 (Invitrogen)	1:1500	-
Anti-goat IgG-HRP	sc-2020 (SCBT)	1:1500	-
Anti-rabbit IgG-HRP	sc-2357 (SCBT)	1:1500	-

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF).

6.2.6 Plásmidos

En la Tabla 6 se presenta una lista de los plásmidos utilizados en este trabajo de tesis.

Nombre	Descripción
pCDNA6	Vector vacío de expresión eucariota
pCDNA6-AKT1-WT	Vector de expresión de la proteína <i>wild type</i> de AKT1 (Cedido por la Dra. Anabella Srebrow)
pCDNA6-AKT1-2KR	Vector de expresión de la variante de AKT1 2KR con las lisinas blanco de SUMOilación sustituidas, (K276/301R) (Cedido por la Dra. Anabella Srebrow)
pCDNA6-AKT1-E17K	Vector de expresión de la mutante oncogénica, hiperactiva e hiperSUMOilada AKT1 E17K (Cedido por la Dra. Anabella Srebrow)
pCDNA6-AKT1-E17K/2KR	Vector de expresión de la mutante que combina la mutación E17K y sustitución de lisinas SUMOilables, AKT1 E17K/2KR (Cedido por la Dra. Anabella Srebrow)
pCDNA6-AKT1-D274N/E278Q	Vector de expresión de la variante de AKT1 con el consenso de SUMOilación de la K 276 mutado (Cedido por la Dra. Anabella Srebrow)
Nanog5P reporter	Reportero del sistema de Luciferasa de la actividad del promotor de Nanog. Contiene 2,5 kb de la región promotora 5' del gen Nanog de ratón. (Addgene #16337)
UBC9(C93S)	Vector de expresión de la enzima UBC9 con una mutación C93S (Cedido por el Dr. Eduardo Artz)
AKT1-MYR	Vector de expresión de la mutante de AKT1 MYR, hiperactiva por adición de señal de myristoilación y anclaje a la membrana (Cedido por el Dr. Martin Monte)
pLenti-PURO	Vector vacío lentiviral de tercera generación para la expresión inducible de proteínas por Doxiciclina y con resistencia a Puromicina.
pMIR-REPORT-Nanog-3'UTR	Vector de expresión de la enzima Luciferasa, cuyo transcripto posee la región 3'UTR del transcripto de Nanog, diseñado para la medición de actividad de posibles miARN reguladores. (Cedido por el Dr. Ariel Waisman)
pLKO.1-puro-shEGFP	Vector lentiviral de tercera generación para la expresión inducible de shARN, en este caso contra el transcripto de EGFP, y con selección de puromicina (Sigma SHC005)
pLKO.1-puro-shOCT4	Vector lentiviral de tercera generación para la expresión inducible de shARN, en este caso contra el transcripto de Oct4, y con selección de puromicina (Sigma SHCLND-NM_013633)
pLKO.1-puro-shSOX2	Vector lentiviral de tercera generación para la expresión inducible de shARN, en este caso contra el transcripto de Sox2, y con selección de puromicina (Sigma SHCLND-NM_003106)
pLKO.1-puro-shNANOG	Vector lentiviral de tercera generación para la expresión inducible de shARN, en este caso contra el transcripto de Nanog, y con selección de puromicina (SHCLND-XM_132755)
pLKO.1-puro-shKLF4	Vector lentiviral de tercera generación para la expresión inducible de shARN, en este caso contra el transcripto de Klf4, y con selección de puromicina (SHCLND-NM_010637)
Tet-pLKO-puro-shTbx3	Vector lentiviral de tercera generación para la expresión de shARN inducible por doxiciclina, en este caso contra el transcripto de Tbx3, y con selección de puromicina.
PSPCas9(BB)-2A-Puro-sgTbx3 (E1 y E2)	Vector del sistema CRISPR/Cas9 diseñado para expresar la nucleasa Cas9 y el sgARN contra los exones E1 y E2 del gen de Tbx3. (Cedido por la Dra. Judith Davie)
P53	Vector de expresión de la proteína supresora de tumores Tp53. (Cedido por el Dr. Martin Monte)
pmCherry-C1	Vector de expresión mamífero diseñado para expresar una proteína de interés fusionada al extremo C-terminal de la proteína fluorescente mCherry (Clontech, Cat. No. 632524)
pmCherry-C1-AKT-WT	Vector de expresión de la proteína de fusión mCherry-AKT1-WT. Generado en este trabajo.
pmCherry-C1-AKT-2KR	Vector de expresión de la proteína de fusión mCherry-AKT1-2KR. Generado en este trabajo.
pmCherry-C1-AKT-E17K	Vector de expresión de la proteína de fusión mCherry-AKT1- E17K. Generado en este trabajo.
pmCherry-C1-AKT-E17K/2KR	Vector de expresión de la proteína de fusión mCherry-AKT1-E17K/2KR. Generado en este trabajo.
HP1α-EGFP	Expresión de la proteína asociada a heterocromatina HP1α fusionada a la proteína fluorescente eGFP. (Cedido por el Dr. Platcha)

Tabla 6. Lista de plásmidos utilizados.

Para la preparación de los plásmidos utilizados, se llevaron a cabo las siguientes técnicas microbiológicas:

6.2.7 Transformación de bacterias ultracompetentes

Se realizó la transformación con el plásmido de interés de bacterias *E.coli* DH5 α ultracompetentes, previamente generadas, mediante el método de golpe de calor (*heat shock*). Luego, las bacterias fueron sembradas en placas con LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente a la resistencia presente en el plásmido a amplificar. Las placas se mantuvieron a 37 °C ON y al día siguiente se evaluó la presencia de colonias de bacterias transformadas.

6.2.8 Preparación de ADN plasmídico en pequeña y mediana escala

Para la preparación de ADN plasmídico a pequeña escala con fines analíticos, se utilizó el protocolo de miniprep, utilizando el método de lisis alcalina [361].

Para la preparación de ADN plasmídico para su posterior uso en cultivo en transfección de células, o para realizar clonados subsiguientes, se realizaron preparaciones a mediana escala (midiprep) utilizando el kit Wizard Plus Maxipreps ADN Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante o adaptando el protocolo de lisis alcalina pero incluyendo tratamiento con RNAsa y extracción con solventes orgánicos (una con fenol seguida de dos con cloroformo) para eliminar de la preparación ARN y proteínas, respectivamente. Luego, el ADN plasmídico fue cuantificado mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

6.2.9 Preparación, desarrollo y análisis de experimentos involucrando microscopia confocal

6.2.9.1 Generación de proteínas de fusión mCherry-AKT1

Las variantes de AKT1 fusionadas a mCherry se generaron a partir de los vectores de expresión de AKT1 wt, 2KR, E17K y E17K/2KR gentilmente proporcionados por el grupo de la Dra. Srebrow [123]. Cada variante de AKT1 fue aislada usando las enzimas de restricción HindIII (Promega) y EcoRI (Invitrogen) y ligada (con ligasa de Promega) al vector pmCherry-C1 (Clontech, Cat. No. 632524) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La correcta inserción de todas las construcciones en marco de lectura con la proteína mCherry y la ausencia de mutaciones adicionales fueron verificadas en todos los casos por secuenciación de Sanger de plásmido completo.

6.2.9.2 Preparación de las células para microscopía confocal

Para los experimentos de microscopía confocal en células vivas, análisis de distribución y FCS, se utilizaron las líneas de CME adecuadas y especificadas para cada tipo de experimento (Tabla 1). Las células se plaquearon en cubreobjetos de 18 mm de diámetro, con coating de PDL-laminina, como se describió en la sección de cultivo celular, a una densidad de 75.000 células/*well*. Al día siguiente se realizó la transfección con los plásmidos correspondientes (1.5 μg de ADN total) utilizando Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) en medio Opti-MEM (Thermo Fisher). En conjunto, si corresponde según la línea, se inició la inducción de la expresión de los FT-YPet, agregando doxiciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final en el medio de propagación. A las 24 h, se reemplazó el medio por medio fresco con doxiciclina, y 48 h post-transfección se realizaron las observaciones al microscopio. Para adquirir los datos, el cubreobjetos con células en cultivo se montó en una cámara especialmente diseñada para microscopía y se agregó 1 ml del medio de cultivo proveniente del mismo well del que fue extraído el vidrio.

6.2.9.3 Obtención de imágenes por microscopía confocal

Las imágenes de CME vivas fueron obtenidas en un microscopio confocal FV1000 (Olympus), con el objetivo de inmersión en aceite UPlanSApo 60X NA=1.35 (Olympus). Los fluoróforos YPet y eGFP se excitaron con un láser de Argón multi-línea sintonizado a 488 nm, mientras que para el fluoróforo mCherry se utilizó un láser de Helio-Neón de 543 nm. La potencia promedio de los láseres sobre las muestras fue de $\sim 1 \mu\text{W}$. La apertura confocal se mantuvo en 105 μm . La emisión de fluorescencia proveniente de los fluoróforos se separó con un espejo dicróico DM405/488/543/635. Se utilizaron bandas de detección espectrales divididos en dos canales programados, filtrados por SDM560, uno para coleccionar entre 505-525 nm (YPet/eGFP), y/u otro en 572-642nm (mCherry). La fluorescencia se detectó con fotomultiplicadores configurados en modo *pseudo photon-counting*. La adquisición de las imágenes se realizó en modo secuencial de cuadro. El tamaño de píxel se ajustó en 82 nm. Se obtuvieron imágenes con un tamaño de 256 x 256 píxeles, con un tiempo de barrido de 20 $\mu\text{s}/\text{píxel}$, y en *stack* temporal para obtener 5 imágenes consecutivas del mismo campo. Durante toda la adquisición de las imágenes, las células fueron mantenidas vivas en medio de cultivo, hasta un máximo de 2 h por vidrio.

6.2.9.4 Análisis de imágenes

6.2.9.4.1 Distribución subcelular

La intensidad media de fluorescencia y el desvío estándar (SD) se calcularon en imágenes sin procesar de cada célula utilizando el plugin "Analyze Particles" de ImageJ en los compartimentos del citoplasma y núcleo previamente segmentados. La segmentación de los núcleos se realizó mediante la creación de máscaras binarias a partir del canal YPet/eGFP (se utilizó al FT como marcador del núcleo por su localización mayoritaria). La segmentación del citoplasma y la célula completa se realizó mediante el recorte manual de cada célula y la creación de una máscara binaria que excluye (o no) los núcleos. La membrana se consideró dentro de una región de 250 nm de ancho de los bordes de células completas segmentadas.

El coeficiente de variación (CV) se calculó en cada célula, dentro del núcleo y/o citoplasma como la relación entre el desvío estándar (SD) de la intensidad de fluorescencia en cada compartimento y la intensidad media del compartimento correspondiente (I_{fluo}) (Ecuación 1). Los nucléolos no se consideraron en los cálculos.

$$CV = \frac{SD}{I_{fluo}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Los *foci* fueron identificados mediante imágenes binarias de los núcleos calculadas a partir de umbrales (*thresholds*) preestablecidos para cada imagen, definidos como $I_{fluo} + 2.SD$. El número, tamaño e intensidad media de los *foci* se calcularon utilizando el plugin de ImageJ "Analyze Particles". Solo se consideraron aquellas estructuras cuyos tamaños superaron la resolución óptica.

6.2.9.5 Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

6.2.9.5.1 Obtención de datos experimentales

Se obtuvieron mediciones de intensidad de fluorescencia de punto único (*single-point*) en función del tiempo, sobre CME en cultivo transfectadas. Se utilizó un microscopio confocal FV1000 (Olympus), utilizando la configuración óptica como se describió en la sección anterior para la adquisición de las imágenes. Se eligieron células con intensidad de fluorescencia baja o media. La adquisición de los datos de fluorescencia se realizó en regiones elegidas dentro del núcleo por ser homogéneas y evitando los nucleolos. El tiempo de muestreo fue de 20 μs (para YPet-OCT4 y YPet-SOX2) y 40 μs (para eGFP-NANOG), y la duración de cada medida fue de entre 3~5 min, dependiendo del fluoróforo. Se realizó una única medición por célula para minimizar el daño celular.

6.2.9.5.2 Análisis y ajuste de datos

Los datos experimentales de FCS de punto único, consisten en trazas temporales de intensidad de fluorescencia. Estos datos se analizaron con el programa SimFCS 2.0 (LFD, Irvine, CA, USA). Allí se calcularon las funciones de autocorrelación (ACF) (Ecuación 2). En donde $I(t)$ es la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, τ el tiempo de retardo y $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Las ACFs calculadas se analizaron utilizando una versión extendida del modelo de reacción dominante [362], que explica la función de correlación $G(\tau)$ y que incluye una población de moléculas en difusión libre y moléculas involucradas en la unión a dos poblaciones distintas de sitios fijos [363] (Ecuación 3).

$$G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[f_D \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} + f_R e^{-\tau/\tau_R} + f_L e^{-\tau/\tau_L} \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

En esta ecuación, N es el número promedio de moléculas móviles en el volumen de observación; D es el coeficiente de difusión; f_D es la fracción poblacional de moléculas involucradas en difusión libre; f_R y f_L son las fracciones poblacionales involucradas en interacciones rápidas y lentas con sitios fijos; τ_R y τ_L son sus respectivos tiempos de residencia en esos sitios. En este trabajo, para facilitar la interpretación de estos parámetros, los renombramos como $f_{\tau(\text{largos})}$, $f_{\tau(\text{cortos})}$, $\tau_{(\text{largos})}$ y $\tau_{(\text{cortos})}$, respectivamente. Las recíprocas de los tiempos de residencia corresponden a las constantes de disociación k_{off} de los sitios mencionados.

La Ecuación 3 se ajustó a los datos de ACF obtenidos usando una rutina de MATLAB (MathWorks) previamente utilizada [105], [106], [116], [255], [283]–[285], [347]. Esta rutina ajustó de manera global los datos provenientes de distintas medidas y una misma condición. Se asumieron entonces tiempos de residencia comunes (rápido y lento) para las distintas medidas de una misma condición, mientras que el resto de los parámetros (las dos fracciones poblacionales unidas, la fracción difusional y el tiempo característico difusional) se ajustaron individualmente para cada medida.

Finalmente, este modelo no considera la variabilidad intranuclear de afinidades que pueden existir en las poblaciones que interactúan con los sitios rápidos y lentos [364], sino que provee valores promedio para estos parámetros. Por otra parte, el modelo asume que las concentraciones de sitios

fijos son independientes entre sí, constantes y muy altas respecto a las concentraciones de sitios ocupados [362].

6.3 Análisis Estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como media \pm error estándar de la media (EE) de al menos tres réplicas biológicas ($n=3$). En general, la significancia estadística entre los tratamientos fue analizada utilizando Modelos Lineales Mixtos (MLM) con un diseño de ANOVA en bloques aleatorizado, a menos que se indique lo contrario y se especifique el test utilizado. La normalidad en las distribuciones de los residuos se analizó mediante el test de Shapiro-Wilks y a través de Q-Q Plots. En aquellos casos que no cumplían con el supuesto de normalidad, se realizó la transformación de los datos con la función \log_{10} . La homocedasticidad se analizó a través de gráficos de dispersión de residuos estandarizados versus predichos y mediante la prueba de Levene. En la mayoría de los casos, las comparaciones *post hoc* entre los grupos, se realizó mediante el test de Tukey para experimentos con tamaño de muestra igual, o la prueba DGC cuando los tratamientos presentaban tamaños de muestra desiguales. En general, se consideraron como estadísticamente significativas las diferencias entre los grupos cuando el p-valor resultante fue ≤ 0.05 , a menos que se indique otro valor. Utilizamos letras para indicar diferencias significativas cuando las comparaciones se realizaron entre múltiples tratamientos. En este caso, mientras que las letras diferentes indican diferencias significativas, las letras iguales corresponden a diferencias no significativas entre tratamientos. Por el contrario, cuando cada muestra solo se comparó con la condición de control correspondiente, en general utilizamos asterisco para indicar diferencia significativa respecto al control. La información específica sobre el análisis se presenta en la leyenda de cada figura. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software RStudio.

7 ABREVIATURAS

ACF	Función de Autocorrelación
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ANOVA	Análisis de la Varianza
ADNc	ADN Complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BMP4	Proteína Morfogénica del Hueso 4
BSA	Seroalbúmina Bovina
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
CM	Células Madre
CME	Células Madre Embrionarias (ESCs en inglés)
CMM	Células Madre Mesenquimales (MSCs en inglés)
CMP	Células Madre Pluripotentes
CMPI	Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSCs en inglés)
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CV	Coefficiente de Variación
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNMT	Metiltransferasa de ADN
dNTPS	desoxi-ribonucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EE	Error estandar
EpiLCs	<i>Epiblast-like Cells</i>
EpiSCs	<i>Epiblast Stem Cells</i>
FT	Factor de Transcripción
FCS	Espectroscopia de correlación de fluorescencia
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GP130	Glucoproteína 130
GSK3 β	Glucógeno sintasa quinasa-3 β
HA tag	Etiqueta de la hemaglutinina de gripe humana
HEK	Línea celular de riñón embrionario humano
HP1 α	Proteína Asociada a Heterocromatina 1 α
IF	Inmunofluorescencia
JAKs	Quinasas Janus o Jano
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia (IL-6)
LIFR	Receptor de LIF/IL-6
LUT	Tabla de consulta para mapear colores
miARN	Micro ARN
MCI	Macizo celular interno
MEF	Fibroblastos Embrionarios Murinos
MLM	Modelo lineal mixto
MPT	Modificación post-traducciona
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
ON	incubación durante toda la noche
PBS	buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la polimerasa
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1
PDL	Poli-D-Lisina

PEI	Polietilenimina
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PIAS3	Proteína inhibidora de STAT3 activado
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
qPCR	Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa
RT-qPCR	Retro transcripción seguida de qPCR
SD	Desvío estandar
SENP	Proteasa específica de sentrina
SFB	Suero Fetal Bovino
sgARN	ARN guías
shARN	<i>short hairpin</i> ARN
SOCS3	Supresor de la señalización de citoquinas 3
STAT3	FT transductor de la señal y activador de la transcripción 3
SUMO	Small Ubiquitin-Related Modifier
TBX3	FT T-box 3
TCL1	T cell leukemia 1
WB	Western blot
WT	Wild Type

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Haeckel, "Natürliche Schöpfungsgeschichte." Georg Reimer, Berlin, 1868.
- [2] E. Haeckel, "Anthropogenie." Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1874.
- [3] G. Kolios and Y. Moodley, "Introduction to stem cells and regenerative medicine," *Respiration*, vol. 85, no. 1, pp. 3–10, Dec. 2013, doi: 10.1159/000345615.
- [4] M. A. Goodell, H. Nguyen, and N. Shroyer, "Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 16, no. 5, p. 299, Apr. 2015, doi: 10.1038/NRM3980.
- [5] S. Yamanaka, "Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges," *Cell Stem Cell*, vol. 27, no. 4, pp. 523–531, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.STEM.2020.09.014.
- [6] A. Smith, "A glossary for stem-cell biology," *Nature 2006 441:7097*, vol. 441, no. 7097, pp. 1060–1060, Jun. 2006, doi: 10.1038/nature04954.
- [7] M. L. Condic, "Totipotency: what it is and what it is not.," *Stem Cells Dev*, vol. 23, no. 8, pp. 796–812, Apr. 2014, doi: 10.1089/scd.2013.0364.
- [8] S. Gilbert, "Developmental Biology," *Dev Biol*, vol. 311, no. 2, p. 691, 2007, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.08.033.
- [9] B. Oldak *et al.*, "Complete human day 14 post-implantation embryo models from naïve ES cells," *Nature 2023 622:7983*, vol. 622, no. 7983, pp. 562–573, Sep. 2023, doi: 10.1038/s41586-023-06604-5.
- [10] S. Viukov *et al.*, "Human primed and naïve PSCs are both able to differentiate into trophoblast stem cells," *Stem Cell Reports*, vol. 17, no. 11, pp. 2484–2500, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.STEMCR.2022.09.008.
- [11] G. Amadei *et al.*, "Embryo model completes gastrulation to neurulation and organogenesis," *Nature 2022 610:7930*, vol. 610, no. 7930, pp. 143–153, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-05246-3.
- [12] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.," *Nature*, vol. 292, no. 5819, pp. 154–6, Jul. 1981.
- [13] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [14] K. Takahashi *et al.*, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, Nov. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.11.019.
- [15] R. G. Rowe and G. Q. Daley, "Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery," *Nat Rev Genet*, vol. 20, no. 7, pp. 377–388, Jul. 2019, doi: 10.1038/S41576-019-0100-Z.
- [16] A. M. Wobus and K. R. Boheler, "Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy.," *Physiol Rev*, vol. 85, no. 2, pp. 635–78, Apr. 2005, doi: 10.1152/physrev.00054.2003.
- [17] J. B. GURDON, "The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles," *Development*, vol. 10, no. 4, pp. 622–640, Dec. 1962, doi: 10.1242/DEV.10.4.622.
- [18] J. Dulak, K. Szade, A. Szade, W. Nowak, and A. Józkwicz, "Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine," *Acta Biochim Pol*, vol. 62, no. 3, pp. 329–337, Jul. 2015, doi: 10.18388/abp.2015_1023.
- [19] A. Augello, T. B. Kurth, and C. de Bari, "Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches," *Eur Cell Mater*, vol. 20, pp. 121–133, 2010, doi: 10.22203/ECM.V020A11.
- [20] A. P. Ng and W. S. Alexander, "Haematopoietic stem cells: past, present and future," *Cell Death Discovery 2017 3:1*, vol. 3, no. 1, pp. 1–4, Feb. 2017, doi: 10.1038/cddiscovery.2017.2.
- [21] C. F. Bentzinger, Y. X. Wang, J. von Maltzahn, and M. A. Rudnicki, "The emerging biology of muscle stem cells: Implications for cell-based therapies," *BioEssays*, vol. 35, no. 3, pp. 231–241, Mar. 2013, doi: 10.1002/BIES.201200063.
- [22] J. Fares, M. Y. Fares, H. H. Khachfe, H. A. Salhab, and Y. Fares, "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited," *Signal Transduction and Targeted Therapy 2020 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1–17, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0134-x.
- [23] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.," *Nature*, vol. 292, no. 5819, pp. 154–6, Jul. 1981.
- [24] J. A. Thomson *et al.*, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.," *Science*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–7, Nov. 1998.
- [25] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature*, vol. 292, no. 5819, pp. 154–156, 1981, doi: 10.1038/292154A0.
- [26] G. R. Martin, "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 78, no. 12 II, pp. 7634–7638, 1981, doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- [27] A. Bradley, M. Evans, M. H. Kaufman, and E. Robertson, "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines," *Nature 1984 309:5965*, vol. 309, no. 5965, pp. 255–256, 1984, doi: 10.1038/309255a0.

- [28] R. L. Williams *et al.*, "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 684–687, Dec. 1988, doi: 10.1038/336684a0.
- [29] A. G. Smith *et al.*, "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 688–690, Dec. 1988, doi: 10.1038/336688a0.
- [30] A. G. Smith and M. L. Hooper, "Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells," *Dev Biol*, vol. 121, no. 1, pp. 1–9, May 1987, doi: 10.1016/0012-1606(87)90132-1.
- [31] Q. L. Ying, J. Nichols, I. Chambers, and A. Smith, "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3.," *Cell*, vol. 115, no. 3, pp. 281–92, Oct. 2003.
- [32] D. M. Kristensen, M. Kalisz, and J. H. Nielsen, "Cytokine signalling in embryonic stem cells," *APMIS*, vol. 113, no. 11–12, pp. 756–772, Nov. 2005, doi: 10.1111/J.1600-0463.2005.APM_391.X.
- [33] K. Yoshida *et al.*, "Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways," *Mech Dev*, vol. 45, no. 2, pp. 163–171, 1994, doi: 10.1016/0925-4773(94)90030-2.
- [34] H. Hirai, P. Karian, and N. Kikyo, "Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor," *Biochem J*, vol. 438, no. 1, pp. 11–23, 2011, doi: 10.1042/BJ20102152.
- [35] H. Niwa, T. Burdon, I. Chambers, and A. Smith, "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3," *Genes Dev*, vol. 12, no. 13, pp. 2048–2060, Jul. 1998, doi: 10.1101/GAD.12.13.2048.
- [36] N. Stahl *et al.*, "Association and Activation of Jak-Tyk Kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β Receptor Components," *Science (1979)*, vol. 263, no. 5143, pp. 92–95, 1994, doi: 10.1126/SCIENCE.8272873.
- [37] X. Chen *et al.*, "Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells," *Cell*, vol. 133, no. 6, pp. 1106–1117, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.04.043.
- [38] R. E. Davey, K. Onishi, A. Mahdavi, and P. W. Zandstra, "LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop," *The FASEB Journal*, vol. 21, no. 9, pp. 2020–2032, Jul. 2007, doi: 10.1096/FJ.06-7852COM.
- [39] A. Sasaki *et al.*, "Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain," *Genes to Cells*, vol. 4, no. 6, pp. 339–351, Jun. 1999, doi: 10.1046/J.1365-2443.1999.00263.X.
- [40] C. D. Chung *et al.*, "Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3," *Science (1979)*, vol. 278, no. 5344, pp. 1803–1805, Dec. 1997, doi: 10.1126/SCIENCE.278.5344.1803.
- [41] T. Burdon, C. Stracey, I. Chambers, J. Nichols, and A. Smith, "Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells," *Dev Biol*, vol. 210, no. 1, pp. 30–43, Jun. 1999, doi: 10.1006/DBIO.1999.9265.
- [42] W. P. Schiemann, J. L. Bartoe, and N. M. Nathanson, "Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras.," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 26, pp. 16631–6, Jun. 1997.
- [43] F. Witzel, L. Maddison, and N. Blüthgen, "How scaffolds shape MAPK signaling: What we know and opportunities for systems approaches," *Front Physiol*, vol. 3 DEC, p. 38000, Dec. 2012, doi: 10.3389/FPHYS.2012.00475/BIBTEX.
- [44] T. Hamazaki, S. M. Kehoe, T. Nakano, and N. Terada, "The Grb2/Mek Pathway Represses Nanog in Murine Embryonic Stem Cells," *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 20, pp. 7539–7549, Oct. 2006, doi: 10.1128/MCB.00508-06.
- [45] C. K. Qu and G. S. Feng, "Shp2 has a positive regulatory role in ES cell differentiation and proliferation," *Oncogene*, vol. 17, no. 4, pp. 433–439, Jul. 1998, doi: 10.1038/SJ.ONC.1201920.
- [46] S. H. Kim *et al.*, "ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal," *Stem Cell Res*, vol. 13, no. 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1016/J.SCR.2014.04.001.
- [47] H. Hirai, P. Karian, and N. Kikyo, "Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor," *Biochem J*, vol. 438, no. 1, pp. 11–23, 2011, doi: 10.1042/BJ20102152.
- [48] T. Boroviak, R. Loos, P. Bertone, A. Smith, and J. Nichols, "The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification," *Nat Cell Biol*, vol. 16, no. 6, pp. 513–525, 2014, doi: 10.1038/NCB2965.
- [49] B. Wu *et al.*, "DNMTs Play an Important Role in Maintaining the Pluripotency of Leukemia Inhibitory Factor-Dependent Embryonic Stem Cells," *Stem Cell Reports*, vol. 16, no. 3, pp. 582–596, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.STEMCR.2021.01.017.
- [50] N. R. D. Paling, H. Wheadon, H. K. Bone, and M. J. Welham, "Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 46, pp. 48063–48070, Nov. 2004, doi: 10.1074/jbc.M406467200.

- [51] M. Bechard and S. Dalton, "Subcellular Localization of Glycogen Synthase Kinase 3 Controls Embryonic Stem Cell Self-Renewal," *Mol Cell Biol*, vol. 29, no. 8, pp. 2092–2104, Apr. 2009, doi: 10.1128/MCB.01405-08.
- [52] B. W. Doble and J. R. Woodgett, "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase.," *J Cell Sci*, vol. 116, no. Pt 7, pp. 1175–86, Apr. 2003.
- [53] J. Franca-Koh, M. Yeo, E. Fraser, N. Young, and T. C. Dale, "The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 46, pp. 43844–43848, Nov. 2002, doi: 10.1074/jbc.M207265200.
- [54] J. Wray *et al.*, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation," *Nature Cell Biology* 2011 13:7, vol. 13, no. 7, pp. 838–845, Jun. 2011, doi: 10.1038/ncb2267.
- [55] C. Liu *et al.*, "Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism," *Cell*, vol. 108, no. 6, pp. 837–847, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00685-2.
- [56] M. P. Storm *et al.*, "Regulation of Nanog Expression by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling in Murine Embryonic Stem Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 9, pp. 6265–6273, Mar. 2007, doi: 10.1074/jbc.M610906200.
- [57] M. Zhang *et al.*, " β -Catenin safeguards the ground state of mouse pluripotency by strengthening the robustness of the transcriptional apparatus," *Sci Adv*, vol. 6, no. 29, Jul. 2020, doi: 10.1126/SCIADV.ABA1593/SUPPL_FILE/ABA1593_TABLE_S6.XLSX.
- [58] J. Braunstein, S. Brutsaert, R. Olson, and C. Schindler, "STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 36, pp. 34133–34140, Sep. 2003, doi: 10.1074/jbc.M304531200.
- [59] L. Chen and J. S. Khillan, "A Novel Signaling by Vitamin A/Retinol Promotes Self Renewal of Mouse ES Cells by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway Via IGF-1 Receptor," *Stem Cells*, vol. 28, no. 1, p. N/A-N/A, Jan. 2009, doi: 10.1002/stem.251.
- [60] A. Hollnagel, V. Oehlmann, J. Heymer, U. Rütger, and A. Nordheim, "Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells.," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 28, pp. 19838–45, Jul. 1999.
- [61] T. Burdon, C. Stracey, I. Chambers, J. Nichols, and A. Smith, "Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells," *Dev Biol*, vol. 210, no. 1, pp. 30–43, Jun. 1999, doi: 10.1006/dbio.1999.9265.
- [62] K. Okita and S. Yamanaka, "Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells," *Curr Stem Cell Res Ther*, vol. 1, no. 1, pp. 103–111, May 2006, doi: 10.2174/157488806775269061.
- [63] L. Boyer *et al.*, "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells," *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 947–956, 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.Core.
- [64] Y. H. Loh *et al.*, "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells," *Nat Genet*, vol. 38, no. 4, pp. 431–440, 2006, doi: 10.1038/ng1760.
- [65] Y.-H. Loh *et al.*, "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells," *Nat Genet*, vol. 38, no. 4, pp. 431–440, Apr. 2006, doi: 10.1038/ng1760.
- [66] S. Huang, "Non-genetic heterogeneity of cells in development: more than just noise," *Development*, vol. 136, no. 23, pp. 3853–3862, Dec. 2009, doi: 10.1242/DEV.035139.
- [67] Y. Hayashi, K. Ohnuma, and M. K. Furue, "Pluripotent Stem Cell Heterogeneity," *Adv Exp Med Biol*, vol. 1123, pp. 71–94, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-11096-3_6/COVER.
- [68] R. A. Young, "Control of the Embryonic Stem Cell State," *Cell*, vol. 144, no. 6, pp. 940–954, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.01.032.
- [69] M. H. Rosner *et al.*, "A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo," *Nature*, vol. 345, no. 6277, pp. 686–692, Jun. 1990, doi: 10.1038/345686a0.
- [70] J. Nichols *et al.*, "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.," *Cell*, vol. 95, no. 3, pp. 379–91, Oct. 1998.
- [71] H. Niwa, A. G. Smith, and J. Miyazaki, "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.," *Nat Genet*, vol. 24, no. 4, pp. 372–376, Apr. 2000, doi: 10.1038/74199.
- [72] C. S. Malarkey and M. E. A. Churchill, "The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell.," *Trends Biochem Sci*, vol. 37, no. 12, pp. 553–62, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.tibs.2012.09.003.
- [73] A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge, "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function," *Genes Dev*, vol. 17, no. 1, pp. 126–140, Jan. 2003, doi: 10.1101/gad.224503.
- [74] J.-L. Chew *et al.*, "Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells," *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 14, pp. 6031–6046, Jul. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005.

- [75] A. Rizzino, "Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells.," *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 1, no. 2, pp. 228–36, 2009, doi: 10.1002/wsbm.12.
- [76] C. Buecker *et al.*, "Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency," *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 838–853, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.04.003.
- [77] K. Mitsui *et al.*, "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.," *Cell*, vol. 113, no. 5, pp. 631–42, May 2003.
- [78] I. Chambers *et al.*, "Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development," *Nature*, vol. 450, no. 7173, pp. 1230–1234, Dec. 2007, doi: 10.1038/nature06403.
- [79] C. V. Echegaray and A. S. Guberman, "Nanog in iPSC cells and during reprogramming," *Molecular Players in iPSC Technology*, pp. 319–348, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-323-90059-1.00006-3.
- [80] D. J. Rodda *et al.*, "Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 24731–24737, 2005, doi: 10.1074/jbc.M502573200.
- [81] Y. M.-S. Tay *et al.*, "MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1," *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2008, doi: 10.1634/STEMCELLS.2007-0295.
- [82] S. Gong, Q. Li, C. R. Jeter, Q. Fan, D. G. Tang, and B. Liu, "Regulation of NANOG in cancer cells," *Mol Carcinog*, vol. 54, no. 9, p. 679, Sep. 2015, doi: 10.1002/MC.22340.
- [83] Y. C. Wang, S. E. Peterson, and J. F. Loring, "Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells," *Cell Research 2014 24:2*, vol. 24, no. 2, pp. 143–160, Nov. 2013, doi: 10.1038/cr.2013.151.
- [84] A. Saunders, F. Faiola, and J. Wang, "Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog.," *Stem Cells*, vol. 31, no. 7, pp. 1227–36, Jul. 2013, doi: 10.1002/stem.1384.
- [85] M. Moretto-Zita, H. Jin, Z. Shen, T. Zhao, S. P. Briggs, and Y. Xu, "Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, doi: 10.1073/pnas.1005847107.
- [86] S. Ramakrishna *et al.*, "PEST motif sequence regulating human NANOG for proteasomal degradation," *Stem Cells Dev*, 2011, doi: 10.1089/scd.2010.0410.
- [87] J. Zhang *et al.*, "SPOP Promotes Nanog Destruction to Suppress Stem Cell Traits and Prostate Cancer Progression," *Dev Cell*, 2019, doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.035.
- [88] C. R. Jeter, T. Yang, J. Wang, H. P. Chao, and D. G. Tang, "Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions," *Stem Cells*, vol. 33, no. 8, pp. 2381–2390, Aug. 2015, doi: 10.1002/STEM.2007.
- [89] G. Chen, S. Yin, H. Zeng, H. Li, and X. Wan, "Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal," *Life 2022, Vol. 12, Page 1151*, vol. 12, no. 8, p. 1151, Jul. 2022, doi: 10.3390/LIFE12081151.
- [90] D. Papatsenko, A. Waghray, and I. R. Lemischka, "Feedback control of pluripotency in embryonic stem cells: Signaling, transcription and epigenetics," *Stem Cell Res*, vol. 29, pp. 180–188, May 2018, doi: 10.1016/J.SCR.2018.02.012.
- [91] T. Yadav, J. P. Quivy, and G. Almouzni, "Chromatin plasticity: A versatile landscape that underlies cell fate and identity," *Science*. 2018. doi: 10.1126/science.aat8950.
- [92] M. Li, G. H. Liu, and J. C. I. Belmonte, "Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. doi: 10.1038/nrm3393.
- [93] Y. Shi *et al.*, "Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials," *Signal Transduction and Targeted Therapy 2022 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–28, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01055-2.
- [94] H. Niwa, "How is pluripotency determined and maintained?," *Development*, vol. 134, no. 4, pp. 635–646, 2007, doi: 10.1242/dev.02787.
- [95] E. Meshorer and T. Misteli, "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, no. 7, pp. 540–546, 2006, doi: 10.1038/nrm1938.
- [96] B. E. Bernstein *et al.*, "A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells," *Cell*, vol. 125, pp. 315–326, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041.
- [97] A. Harikumar and E. Meshorer, "Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells," *EMBO Rep*, vol. in press, no. 12, pp. 1609–1619, 2015, doi: 10.15252/embr.201541011.
- [98] H. Cedar and Y. Bergman, "Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms," *Nat Rev Genet*, vol. 10, no. 5, pp. 295–304, 2009, doi: 10.1038/nrg2540.
- [99] H. Wu and E. S. Yi, "Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation," *Pediatric Research 2006 59:4*, vol. 59, no. 4, pp. 21–25, Apr. 2006, doi: 10.1203/01.pdr.0000203565.76028.2a.
- [100] T. Ali, R. Renkawitz, and M. Bartkuhn, "Insulators and domains of gene expression," *Curr Opin Genet Dev*, vol. 37, pp. 17–26, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.GDE.2015.11.009.

- [101] M. A. Zabidi and A. Stark, "Regulatory Enhancer–Core–Promoter Communication via Transcription Factors and Cofactors," *Trends in Genetics*, vol. 32, no. 12, pp. 801–814, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.TIG.2016.10.003.
- [102] A. S. Lyon, W. B. Peeples, and M. K. Rosen, "A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:3, vol. 22, no. 3, pp. 215–235, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-00303-z.
- [103] C. Oses, M. Stortz, P. Verner, A. Guberman, and V. Levi, "Pluripotency transcription factors at the focus: the phase separation paradigm in stem cells," *Biochem Soc Trans*, vol. 49, no. 6, pp. 2871–2878, Dec. 2021, doi: 10.1042/BST20210856.
- [104] A. Klosin *et al.*, "Phase separation provides a mechanism to reduce noise in cells," *Science (1979)*, vol. 367, no. 6476, pp. 464–468, Jan. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.AAV6691/SUPPL_FILE/AAV6691S2.MOV.
- [105] C. Oses, M. G. Francia, P. Verner, C. Vazquez Echegaray, A. S. Guberman, and V. Levi, "The dynamical organization of the core pluripotency transcription factors responds to differentiation cues in early S-phase," *Front Cell Dev Biol*, vol. 11, p. 482, 2023, doi: 10.3389/FCELL.2023.1125015.
- [106] P. Verner *et al.*, "Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62235-0.
- [107] K. Hayashi, S. M. C. de S. Lopes, F. Tang, and M. A. Surani, "Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 391–401, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.STEM.2008.07.027.
- [108] A. M. Singh, T. Hamazaki, K. E. Hankowski, and N. Terada, "A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 25, no. 10, pp. 2534–2542, Oct. 2007, doi: 10.1634/STEMCELLS.2007-0126.
- [109] Y. Toyooka, D. Shimosato, K. Murakami, K. Takahashi, and H. Niwa, "Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture," *Development*, vol. 135, no. 5, pp. 909–918, Mar. 2008, doi: 10.1242/DEV.017400.
- [110] J.-C. Yeo and H.-H. Ng, "The transcriptional regulation of pluripotency," *Cell Res*, vol. 23, no. 1, pp. 20–32, 2013, doi: 10.1038/cr.2012.172.
- [111] Q.-L. Ying *et al.*, "The ground state of embryonic stem cell self-renewal," *Nature*, vol. 453, no. 7194, pp. 519–23, 2008, doi: 10.1038/nature06968.
- [112] J. A. Hackett and M. Azim Surani, "Regulatory Principles of Pluripotency: From the Ground State Up," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 416–430, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.STEM.2014.09.015.
- [113] S. Poliwoda *et al.*, "Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice," *Orthop Rev (Pavia)*, vol. 14, no. 3, p. 2022, 2022, doi: 10.52965/001C.37498.
- [114] A. Waisman *et al.*, "Inhibition of Cell Division and DNA Replication Impair Mouse-Naïve Pluripotency Exit," *J Mol Biol*, vol. 429, no. 18, pp. 2802–2815, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.020.
- [115] T. Kalkan *et al.*, "Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency," *Development*, vol. 144, no. 7, pp. 1221–1234, Apr. 2017, doi: 10.1242/DEV.142711.
- [116] M. S. Cosentino *et al.*, "Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation," *J Mol Biol*, vol. 431, no. 6, pp. 1148–1159, 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.02.012.
- [117] D. M. Hoang *et al.*, "Stem cell-based therapy for human diseases," *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–41, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01134-4.
- [118] B. D. Manning and A. Toker, "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network," *Cell*, vol. 169, no. 3, pp. 381–405, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.04.001.
- [119] I. Hers, E. E. Vincent, and J. M. Tavaré, "Akt signalling in health and disease," *Cell Signal*, vol. 23, no. 10, pp. 1515–1527, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2011.05.004.
- [120] R. Li *et al.*, "Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis," *Cancer Res*, vol. 73, no. 18, pp. 5742–5753, Sep. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0538.
- [121] D. A. Altomare and J. R. Testa, "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer," *Oncogene*, vol. 24, no. 50, pp. 7455–7464, Nov. 2005, doi: 10.1038/SJ.ONC.1209085.
- [122] A. Brunet *et al.*, "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor," *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 857–868, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.
- [123] G. Risso *et al.*, "Modification of Akt by SUMO conjugation regulates alternative splicing and cell cycle," *Cell Cycle*, vol. 12, no. 19, pp. 3165–3174, 2013, doi: 10.4161/cc.26183.
- [124] B. Dummler and B. A. Hemmings, "Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease," *Biochem Soc Trans*, vol. 35, no. Pt 2, pp. 231–235, Apr. 2007, doi: 10.1042/BST0350231.
- [125] I. Hers, E. E. Vincent, and J. M. Tavaré, "Akt signalling in health and disease," *Cell Signal*, vol. 23, no. 10, pp. 1515–1527, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004.

- [126] Y. Suzuki *et al.*, "Higher pakt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas," *J Radiat Res*, vol. 51, no. 3, pp. 343–348, 2010, doi: 10.1269/JRR.09109.
- [127] G. M. Nitulescu *et al.*, "Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review)," *Int J Oncol*, vol. 48, no. 3, pp. 869–885, Mar. 2016, doi: 10.3892/IJO.2015.3306.
- [128] B. D. Manning and L. C. Cantley, "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream," *Cell*, vol. 129, no. 7, pp. 1261–1274, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.06.009.
- [129] L. Elghazi, N. Balcazar, and E. Bernal-Mizrachi, "Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic β -cell mass and function," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 38, no. 2, pp. 157–163, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2005.08.017.
- [130] E. Gonzalez and T. E. McGraw, "The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer.," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 16, pp. 2502–8, Aug. 2009, doi: 10.4161/cc.8.16.9335.
- [131] D. R. Alessi *et al.*, "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.," *EMBO J*, vol. 15, no. 23, pp. 6541–6551, Dec. 1996, doi: 10.1002/J.1460-2075.1996.TB01045.X.
- [132] K. M. Nicholson and N. G. Anderson, "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy," *Cell Signal*, vol. 14, no. 5, pp. 381–395, May 2002, doi: 10.1016/S0898-6568(01)00271-6.
- [133] B. D. Manning and L. C. Cantley, "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream," *Cell*, vol. 129, no. 7, pp. 1261–1274, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- [134] J. Brognard, E. Sierrecki, T. Gao, and A. C. Newton, "PHLPP and a Second Isoform, PHLPP2, Differentially Attenuate the Amplitude of Akt Signaling by Regulating Distinct Akt Isoforms," *Mol Cell*, vol. 25, no. 6, pp. 917–931, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.02.017.
- [135] S. Watanabe, H. Umehara, K. Murayama, M. Okabe, T. Kimura, and T. Nakano, "Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells.," *Oncogene*, vol. 25, no. 19, pp. 2697–2707, 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209307.
- [136] T. Kimura and T. Nakano, "Regulation of Stem Cell Systems by PI3K/Akt Signaling," *Regulatory Networks in Stem Cells*, pp. 309–318, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-227-8_26.
- [137] S. Watanabe, H. Umehara, K. Murayama, M. Okabe, T. Kimura, and T. Nakano, "Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells," *Oncogene 2006 25:19*, vol. 25, no. 19, pp. 2697–2707, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209307.
- [138] L. Fang *et al.*, "A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation," *Mol Cell*, vol. 55, no. 4, pp. 537–551, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.018.
- [139] C. H. Jeong *et al.*, "Phosphorylation of Sox2 Cooperates in Reprogramming to Pluripotent Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 28, no. 12, pp. 2141–2150, Dec. 2010, doi: 10.1002/STEM.540.
- [140] G. Risso, M. Blaustein, B. Pozzi, P. Mammi, and A. Srebrow, "Akt/PKB: one kinase, many modifications," *Biochemical Journal*, vol. 468, no. 2, pp. 203–214, Jun. 2015, doi: 10.1042/BJ20150041.
- [141] M. Blaustein *et al.*, "Akt Is S-Palmitoylated: A New Layer of Regulation for Akt," *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 229, Feb. 2021, doi: 10.3389/FCCELL.2021.626404/BIBTEX.
- [142] N. Balasuriya *et al.*, "Phosphorylation-dependent substrate selectivity of protein kinase B (AKT1)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, no. 24, pp. 8120–8134, Jun. 2020, doi: 10.1074/JBC.RA119.012425/ATTACHMENT/AC236DFC-B945-4110-B366-E69FCD7D8395/MMC1.ZIP.
- [143] T. Hosoi, K. Hyoda, Y. Okuma, Y. Nomura, and K. Ozawa, "Akt up- and down-regulation in response to endoplasmic reticulum stress," *Brain Res*, vol. 1152, no. 1, pp. 27–31, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2007.03.052.
- [144] E. Arias, H. Koga, A. Diaz, E. Mocholi, B. Patel, and A. M. Cuervo, "Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy," *Mol Cell*, vol. 59, no. 2, pp. 270–284, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2015.05.030.
- [145] Y. Merbl, P. Refour, H. Patel, M. Springer, and M. W. Kirschner, "Profiling of ubiquitin-like modifications reveals features of mitotic control," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1160–1172, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.007.
- [146] C. F. De La Cruz-Herrera *et al.*, "SUMOylation regulates AKT1 activity," *Oncogene*, vol. 34, no. 11, pp. 1442–1450, 2015, doi: 10.1038/onc.2014.48.
- [147] R. Li *et al.*, "Akt SUMOylation Regulates Cell Proliferation and Tumorigenesis," *Cancer Res*, vol. 73, no. 18, pp. 5742–5753, Sep. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0538.
- [148] N. Lara-Ureña, V. Jafari, and M. García-Domínguez, "Cancer-Associated Dysregulation of Sumo Regulators: Proteases and Ligases," *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 8012*, vol. 23, no. 14, p. 8012, Jul. 2022, doi: 10.3390/IJMS23148012.
- [149] A. M. Knittle, M. Helkkula, M. S. Johnson, M. Sundvall, and K. Elenius, "SUMOylation regulates nuclear accumulation and signaling activity of the soluble intracellular domain of the ErbB4 receptor tyrosine kinase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 48, pp. 19890–19904, Dec. 2017, doi: 10.1074/JBC.M117.794271.

- [150] Z.-J. Han *et al.*, "The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review)," *Int J Oncol*, vol. 52, no. 4, pp. 1081–1094, Feb. 2018, doi: 10.3892/ijo.2018.4280.
- [151] C. H. Lin, S. Y. Liu, and E. H. Y. Lee, "SUMO modification of Akt regulates global SUMOylation and substrate SUMOylation specificity through Akt phosphorylation of Ubc9 and SUMO1.," *Oncogene*, vol. 35, no. 5, pp. 595–607, 2016, doi: 10.1038/onc.2015.115.
- [152] A. Pichler, C. Fatouros, H. Lee, and N. Eisenhardt, "SUMO conjugation – a mechanistic view," *Biomol Concepts*, vol. 8, no. 1, pp. 13–36, Jan. 2017, doi: 10.1515/bmc-2016-0030.
- [153] N. Varejão, J. Lascorz, Y. Li, and D. Reverter, "Molecular mechanisms in SUMO conjugation," *Biochem Soc Trans*, vol. 48, no. 1, pp. 123–135, Feb. 2020, doi: 10.1042/BST20190357.
- [154] A. Flotho and F. Melchior, "Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease," *Annu Rev Biochem*, vol. 82, no. 1, pp. 357–385, Jun. 2013, doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311.
- [155] Z.-J. Han *et al.*, "The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review)," *Int J Oncol*, vol. 52, no. 4, pp. 1081–1094, Feb. 2018, doi: 10.3892/ijo.2018.4280.
- [156] X.-J. Yang and C.-M. Chiang, "Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action.," *F1000Prime Rep*, vol. 5, no. November, p. 45, 2013, doi: 10.12703/P5-45.
- [157] J. S. Kroonen and A. C. O. Vertegaal, "Targeting SUMO Signaling to Wrestle Cancer," *Trends Cancer*, vol. 7, no. 6, pp. 496–510, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.TRECAN.2020.11.009.
- [158] O. F. Cox and P. W. Huber, "Developing Practical Therapeutic Strategies that Target Protein SUMOylation," *Curr Drug Targets*, vol. 20, no. 9, pp. 960–969, Oct. 2018, doi: 10.2174/1389450119666181026151802.
- [159] I. Matic *et al.*, "In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 7, no. 1, pp. 132–144, Jan. 2008, doi: 10.1074/MCP.M700173-MCP200.
- [160] C. M. Hickey, N. R. Wilson, and M. Hochstrasser, "Function and regulation of SUMO proteases," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 13, no. 12, pp. 755–766, Dec. 2012, doi: 10.1038/NRM3478.
- [161] Y. Zhao, J. Tan, L. Zhuang, X. Jiang, E. T. Liu, and Q. Yu, "Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 44, pp. 16090–16095, Nov. 2005, doi: 10.1073/PNAS.0505585102.
- [162] S. Vidal, Y. H. Bouzaher, A. El Motiam, R. Seoane, and C. Rivas, "Overview of the regulation of the class IA PI3K/AKT pathway by SUMO," *Semin Cell Dev Biol*, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2021.10.012.
- [163] N. Losino *et al.*, "EDA-containing fibronectin increases proliferation of embryonic stem cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, pp. 1–12, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0080681.
- [164] Y. Yang *et al.*, "SAE1 promotes human glioma progression through activating AKT SUMOylation-mediated signaling pathways," *Cell Communication and Signaling*, vol. 17, no. 1, Jul. 2019, doi: 10.1186/s12964-019-0392-9.
- [165] J. A. Thomson *et al.*, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," *Science (1979)*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, Nov. 1998, doi: 10.1126/SCIENCE.282.5391.1145.
- [166] L. A. Boyer *et al.*, "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells," *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 947–956, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- [167] Y.-H. Loh *et al.*, "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells," *Nat Genet*, vol. 38, no. 4, pp. 431–440, Apr. 2006, doi: 10.1038/ng1760.
- [168] M. McKenna, N. Balasuriya, S. Zhong, S. S. C. Li, and P. O'Donoghue, "Phospho-Form Specific Substrates of Protein Kinase B (AKT1)," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, p. 619252, Feb. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2020.619252/BIBTEX.
- [169] N. R. D. Paling, H. Wheadon, H. K. Bone, and M. J. Welham, "Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 46, pp. 48063–48070, Nov. 2004, doi: 10.1074/JBC.M406467200.
- [170] H. Niwa, K. Ogawa, D. Shimosato, and K. Adachi, "A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells," *Nature*, vol. 460, no. 7251, pp. 118–22, 2009, doi: 10.1038/nature08113.
- [171] J. D. Carpten *et al.*, "A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer," *Nature*, vol. 448, no. 7152, pp. 439–444, Jul. 2007, doi: 10.1038/nature05933.
- [172] Y. Chen *et al.*, "Effect of AKT1 (p. E17K) Hotspot Mutation on Malignant Tumorigenesis and Prognosis," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.573599.
- [173] W. Auerbach *et al.*, "Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines," <https://doi.org/10.2144/00295st04>, vol. 29, no. 5, pp. 1024–1032, Aug. 2018, doi: 10.2144/00295ST04.
- [174] M. Francia *et al.*, "SUMO conjugation susceptibility of Akt/protein kinase B affects the expression of the pluripotency transcription factor Nanog in embryonic stem cells," *PLoS One*, vol. 16, no. 7, p. e0254447, Jul. 2021, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0254447.

- [175] J. D. Carpten *et al.*, "A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.," *Nature*, vol. 448, no. 7152, pp. 439–44, Jul. 2007, doi: 10.1038/nature05933.
- [176] P. Gu, D. LeMenuet, A. C.-K. Chung, M. Mancini, D. A. Wheeler, and A. J. Cooney, "Orphan Nuclear Receptor GCNF Is Required for the Repression of Pluripotency Genes during Retinoic Acid-Induced Embryonic Stem Cell Differentiation," *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 19, pp. 8507–8519, 2005, doi: 10.1128/MCB.25.19.8507-8519.2005.
- [177] T. T. H. Dinh *et al.*, "Cables2 is a novel Smad2-regulatory factor essential for early embryonic development in mice," *bioRxiv*, p. 14, Aug. 2019, doi: 10.1101/744128.
- [178] A. Po *et al.*, "Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog," *EMBO J*, vol. 29, no. 15, pp. 2646–2658, Aug. 2010, doi: 10.1038/emboj.2010.131.
- [179] Q. Wang *et al.*, "Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells," *Cell Res*, vol. 21, no. 10, pp. 1424–1435, Oct. 2011, doi: 10.1038/cr.2011.108.
- [180] A. S. Knaupp *et al.*, "TINC— A Method to Dissect Regulatory Complexes at Single-Locus Resolution— Reveals an Extensive Protein Complex at the Nanog Promoter," *Stem Cell Reports*, vol. 15, no. 6, pp. 1246–1259, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.STEMCR.2020.11.005.
- [181] L. Gong, T. Kamitani, K. Fujise, L. S. Caskey, and E. T. H. Yeh, "Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 45, pp. 28198–28201, Nov. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.45.28198.
- [182] F. Giorgino *et al.*, "The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 3, pp. 1125–1130, Feb. 2000, doi: 10.1073/PNAS.97.3.1125/ASSET/75A3AFFC-2F59-42FE-942D-6C8AFC8579BC/ASSETS/GRAPHIC/PQ0305236005.JPEG.
- [183] A. Carbia-Nagashima *et al.*, "RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1 α during Hypoxia," *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 309–323, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.07.044.
- [184] M. Andjelković *et al.*, "Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B *," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 50, pp. 31515–31524, Dec. 1997, doi: 10.1074/JBC.272.50.31515.
- [185] A. D. Kohn, F. Takeuchi, and R. A. Roth, "Akt, a Pleckstrin Homology Domain Containing Kinase, Is Activated Primarily by Phosphorylation *," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 36, pp. 21920–21926, Sep. 1996, doi: 10.1074/JBC.271.36.21920.
- [186] P. Zlatkine, B. Mehul, and A. I. Magee, "Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif," *J Cell Sci*, vol. 110 (Pt 5), no. 5, pp. 673–679, Mar. 1997, doi: 10.1242/JCS.110.5.673.
- [187] M. D. Resh, "Myristylation and palmitoylation of Src family members: The fats of the matter," *Cell*, vol. 76, no. 3, pp. 411–413, Feb. 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90104-X.
- [188] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, and C. Peng, "Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, no. AUG, p. 388354, Aug. 2018, doi: 10.3389/FENDO.2018.00402/BIBTEX.
- [189] Y. S. Lee, H. K. Kim, S. Chung, K. S. Kim, and A. Dutta, "Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation," *J Biol Chem*, vol. 280, no. 17, pp. 16635–16641, Apr. 2005, doi: 10.1074/JBC.M412247200.
- [190] S. D. Hatfield, H. R. Shcherbata, K. A. Fischer, K. Nakahara, R. W. Carthew, and H. Ruohola-Baker, "Stem cell division is regulated by the microRNA pathway," *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 974–978, Jun. 2005, doi: 10.1038/NATURE03816.
- [191] A. V. Sirotkin, M. Lauková, D. Ovcharenko, P. Brenaut, and M. Mlynček, "Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis," *J Cell Physiol*, vol. 223, no. 1, pp. 49–56, Apr. 2010, doi: 10.1002/JCP.21999.
- [192] C.-Z. Chen, "MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors," *N Engl J Med*, vol. 353, no. 17, pp. 1768–1771, Oct. 2005, doi: 10.1056/NEJMP058190.
- [193] T. Fujii, K. Shimada, Y. Tatsumi, K. Fujimoto, and N. Konishi, "Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 456, no. 1, pp. 183–189, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.BBRC.2014.11.056.
- [194] M. Jin *et al.*, "miRNA-128 suppresses prostate cancer by inhibiting BMI-1 to inhibit tumor-initiating cells," *Cancer Res*, vol. 74, no. 15, pp. 4183–4195, Aug. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0404.
- [195] A. Marson *et al.*, "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells," *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 521–533, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.CELL.2008.07.020.
- [196] W. K. Chu, L. M. Hung, C. W. Hou, and J. K. Chen, "MicroRNA 630 represses NANOG expression through transcriptional and post-transcriptional regulation in human embryonal carcinoma cells," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/IJMS23010046/S1.

- [197] C. S. Niu, Y. Yang, and C. D. Cheng, "MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression," *Int J Oncol*, vol. 42, no. 5, p. 1533, May 2013, doi: 10.3892/IJO.2013.1844.
- [198] F. Rahmani, G. A. Ferns, S. Talebian, M. Nourbakhsh, A. Avan, and S. Shahidsales, "Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT signaling pathway in the pathogenesis of breast cancer," *Gene*, vol. 737, p. 144459, May 2020, doi: 10.1016/J.GENE.2020.144459.
- [199] M. Xu and Y. Y. Mo, "The Akt-associated microRNAs," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 21, pp. 3601–3612, Nov. 2012, doi: 10.1007/S00018-012-1129-8/FIGURES/3.
- [200] Y. M-S Tay *et al.*, "MicroRNA-134 Modulates the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, Where It Causes Post-Transcriptional Attenuation of Nanog and LRH1," *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2008, doi: 10.1634/STEMCELLS.2007-0295.
- [201] C. Solari *et al.*, "Induced pluripotent stem cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 410, no. 2, pp. 252–257, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.BBRC.2011.05.126.
- [202] S. M. I. Hussein *et al.*, "Genome-wide characterization of the routes to pluripotency," *Nature 2014 516:7530*, vol. 516, no. 7530, pp. 198–206, Dec. 2014, doi: 10.1038/nature14046.
- [203] M. Benevento *et al.*, "Proteome adaptation in cell reprogramming proceeds via distinct transcriptional networks," *Nature Communications 2014 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2014, doi: 10.1038/ncomms6613.
- [204] M. G. Francia *et al.*, "AKT1 induces Nanog promoter in a SUMOylation-dependent manner in different pluripotent contexts," *BMC Res Notes*, vol. 16, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2023, doi: 10.1186/S13104-023-06598-3/FIGURES/3.
- [205] C. Solari *et al.*, "Manganese superoxide dismutase gene expression is induced by Nanog and Oct4, essential pluripotent stem cells' transcription factors," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, p. e0144336, Jan. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0144336.
- [206] C. Solari *et al.*, "Protein arginine Methyltransferase 8 gene is expressed in pluripotent stem cells and its expression is modulated by the transcription factor Sox2," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 473, no. 1, 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.077.
- [207] C. Solari *et al.*, "Superoxide dismutase 1 expression is modulated by the core pluripotency transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog in embryonic stem cells," *Mech Dev*, vol. 154, pp. 116–121, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.mod.2018.06.004.
- [208] Y. L. Lin *et al.*, "Malignant transformation of 293 cells induced by ectopic expression of human Nanog," *Molecular and Cellular Biochemistry 2011 351:1*, vol. 351, no. 1, pp. 109–116, Jan. 2011, doi: 10.1007/S11010-011-0717-5.
- [209] N. Wang, Y. Wang, Y. Xie, and H. Wang, "OTX2 impedes self-renewal of porcine iPS cells through downregulation of NANOG expression," *Cell Death Discovery 2016 2:1*, vol. 2, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2016, doi: 10.1038/cddiscovery.2016.90.
- [210] Y. H. Lee *et al.*, "DHFR and MDR1 upregulation is associated with chemoresistance in osteosarcoma stem-like cells," *Oncol Lett*, vol. 14, no. 1, pp. 171–179, Jul. 2017, doi: 10.3892/OL.2017.6132/HTML.
- [211] Q. Zhou, H. Chipperfield, D. A. Melton, and W. H. Wong, "A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 42, pp. 16438–43, Oct. 2007, doi: 10.1073/pnas.0701014104.
- [212] V. Heurtier *et al.*, "The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 1109, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09041-z.
- [213] P. Navarro *et al.*, "OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells," *EMBO J*, vol. 31, no. 24, pp. 4547–4562, Dec. 2012, doi: 10.1038/emboj.2012.321.
- [214] T. Samanta and S. Kar, "Fine-tuning Nanog expression heterogeneity in embryonic stem cells by regulating a Nanog transcript-specific microRNA," *FEBS Lett*, vol. 594, no. 24, pp. 4292–4306, Dec. 2020, doi: 10.1002/1873-3468.13936.
- [215] C. V. Echegaray and A. S. Guberman, "Nanog in iPS cells and during reprogramming," *Molecular Players in iPSC Technology*, pp. 319–348, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-90059-1.00006-3.
- [216] M. P. Storm *et al.*, "Regulation of nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 9, pp. 6265–6273, Mar. 2007, doi: 10.1074/jbc.M610906200.
- [217] M. P. Storm *et al.*, "Regulation of Nanog Expression by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling in Murine Embryonic Stem Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 9, pp. 6265–6273, Mar. 2007, doi: 10.1074/jbc.M610906200.

- [218] Y. Sanchez-Ripoll *et al.*, "Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition Enhances Translation of Pluripotency-Associated Transcription Factors to Contribute to Maintenance of Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e60148, Apr. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0060148.
- [219] Q. Wu *et al.*, "Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells.," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 34, pp. 24090–4, Aug. 2006, doi: 10.1074/jbc.C600122200.
- [220] Y. Loh *et al.*, "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells," vol. 38, no. 4, pp. 431–440, 2006, doi: 10.1038/ng1760.
- [221] T. Kuroda *et al.*, "Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression," *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 6, pp. 2475–2485, Mar. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.6.2475-2485.2005.
- [222] R. Fernandez-Alonso, F. Bustos, C. A. C. Williams, and G. M. Findlay, "Protein Kinases in Pluripotency—Beyond the Usual Suspects," *J Mol Biol*, vol. 429, no. 10, pp. 1504–1520, May 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.04.013.
- [223] B. D. Ormsbee Golden, E. L. Wuebben, and A. Rizzino, "Sox2 Expression Is Regulated by a Negative Feedback Loop in Embryonic Stem Cells That Involves AKT Signaling and FoxO1," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76345, Oct. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0076345.
- [224] Y. Lin *et al.*, "Reciprocal Regulation of Akt and Oct4 Promotes the Self-Renewal and Survival of Embryonal Carcinoma Cells," *Mol Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 627–640, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.08.030.
- [225] C. H. Jeong *et al.*, "Phosphorylation of Sox2 Cooperates in Reprogramming to Pluripotent Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 28, no. 12, pp. 2141–2150, Dec. 2010, doi: 10.1002/STEM.540.
- [226] P. A. Campbell and M. A. Rudnicki, "Oct4 interaction with Hmgb2 regulates Akt signaling and pluripotency," *Stem Cells*, vol. 31, no. 6, pp. 1107–1120, 2013, doi: 10.1002/stem.1365.
- [227] B. Chen *et al.*, "Akt-Signal Integration Is Involved in the Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0064877.
- [228] S. Oki *et al.*, "Ch IP -Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public Ch IP -seq data ," *EMBO Rep*, vol. 19, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.15252/embr.201846255.
- [229] P. P. Das *et al.*, "Distinct and combinatorial functions of Jmjd2b/Kdm4b and Jmjd2c/Kdm4c in mouse embryonic stem cells identity," *Mol Cell*, vol. 53, no. 1, p. 32, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2013.11.011.
- [230] N. Festuccia *et al.*, "Transcription factor activity and nucleosome organization in mitosis," *Genome Res*, vol. 29, no. 2, pp. 250–260, Feb. 2019, doi: 10.1101/GR.243048.118/-/DC1.
- [231] A. Boija *et al.*, "Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains," *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1842–1855.e16, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.10.042/ATTACHMENT/68CE0BA4-C182-48E4-8C46-2789DCD0A57A/MMC4.XLSX.
- [232] E. S. Villodre *et al.*, "Silencing of the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog has different effect on teratoma growth," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 517, no. 2, pp. 324–329, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.07.064.
- [233] C. Solari *et al.*, "The pluripotency transcription factor Nanog represses glutathione reductase gene expression in mouse embryonic stem cells," *BMC Res Notes*, vol. 12, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1186/s13104-019-4411-0.
- [234] M. V. Petrone *et al.*, "The pluripotency transcription factor OCT4 represses heme oxygenase-1 gene expression," *FEBS Lett*, vol. 595, no. 14, pp. 1949–1961, Jul. 2021, doi: 10.1002/1873-3468.14138.
- [235] C. Solari *et al.*, "Manganese Superoxide Dismutase Gene Expression Is Induced by Nanog and Oct4, Essential Pluripotent Stem Cells' Transcription Factors.," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, p. e0144336, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0144336.
- [236] P. Zhang, R. Andrianakos, Y. Yang, C. Liu, and W. Lu, "Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression.," *J Biol Chem*, vol. 285, no. 12, pp. 9180–9, Mar. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.077958.
- [237] N. Ivanova *et al.*, "Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference," *Nature*, vol. 442, no. 7102, pp. 533–538, 2006, doi: 10.1038/nature04915.
- [238] H. Niwa, K. Ogawa, D. Shimosato, and K. Adachi, "A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells.," *Nature*, vol. 460, no. 7251, pp. 118–22, 2009, doi: 10.1038/nature08113.
- [239] B. Chen *et al.*, "Akt-Signal Integration Is Involved in the Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0064877.
- [240] Y. Lin *et al.*, "Reciprocal Regulation of Akt and Oct4 Promotes the Self-Renewal and Survival of Embryonal Carcinoma Cells," *Mol Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 627–640, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.030.
- [241] R. Lu, A. Yang, and Y. Jin, "Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 10, pp. 8425–8436, Mar. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.202150.

- [242] A. E. R. Kartikasari *et al.*, “The histone demethylase Jmjd3 sequentially associates with the transcription factors Tbx3 and Eomes to drive endoderm differentiation,” *EMBO Journal*, 2013, doi: 10.1038/emboj.2013.78.
- [243] A. Waisman *et al.*, “Inhibition of Cell Division and DNA Replication Impair Mouse-Naïve Pluripotency Exit,” *J Mol Biol*, vol. 429, no. 18, pp. 2802–2815, 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.020.
- [244] T. J. Oh, A. Adhikari, T. Mohamad, A. Althobaiti, and J. Davie, “TBX3 represses TBX2 under the control of the PRC2 complex in skeletal muscle and rhabdomyosarcoma,” *Oncogenesis*, vol. 8, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41389-019-0137-z.
- [245] T. Lin *et al.*, “p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression,” *Nat Cell Biol*, vol. 7, no. 2, pp. 165–171, Feb. 2005, doi: 10.1038/ncb1211.
- [246] P. V. Hornbeck, B. Zhang, B. Murray, J. M. Kornhauser, V. Latham, and E. Skrzypek, “PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations,” *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. D1, pp. D512–D520, Jan. 2015, doi: 10.1093/NAR/GKU1267.
- [247] P. Yang *et al.*, “Multi-Omic Profiling Reveals Dynamics of the Phased Progression of Pluripotency,” *Cell Syst*, vol. 8, no. 5, p. 427, May 2019, doi: 10.1016/J.CELS.2019.03.012.
- [248] Y. Zhang *et al.*, “The role of WT1 in breast cancer: clinical implications, biological effects and molecular mechanism,” *Int J Biol Sci*, vol. 16, no. 8, pp. 1474–1480, 2020, doi: 10.7150/IJBS.39958.
- [249] K. M. Kirschner and H. Scholz, “WT1 in Adipose Tissue: From Development to Adult Physiology,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, p. 579, Mar. 2022, doi: 10.3389/FCELL.2022.854120/BIBTEX.
- [250] M. Iwafuchi-Doi and K. S. Zaret, “Pioneer transcription factors in cell reprogramming,” *Genes Dev*, vol. 28, no. 24, pp. 2679–2692, Dec. 2014, doi: 10.1101/GAD.253443.114.
- [251] Z. Li *et al.*, “Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation,” *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1608–1616, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.CELL.2012.11.018.
- [252] C. Wolfrum, D. Besser, E. Luca, and M. Stoffel, “Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3 β /Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 20, pp. 11624–11629, Sep. 2003, doi: 10.1073/PNAS.1931483100/SUPPL_FILE/1483FIG6.PDF.
- [253] A. Vadhan *et al.*, “CD44 Promotes Breast Cancer Metastasis through AKT-Mediated Downregulation of Nuclear FOXA2,” *Biomedicines*, vol. 10, no. 10, p. 2488, Oct. 2022, doi: 10.3390/BIOMEDICINES10102488/S1.
- [254] T. Sekiya and K. S. Zaret, “Repression by Groucho/TLE/Grg Proteins: Genomic Site Recruitment Generates Compacted Chromatin In Vitro and Impairs Activator Binding In Vivo,” *Mol Cell*, vol. 28, no. 2, pp. 291–303, Oct. 2007, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.10.002.
- [255] M. G. Francia *et al.*, “Sumoylation and the oncogenic E17K mutation affect AKT1 subcellular distribution and impact on Nanog-binding dynamics to chromatin in embryonic stem cells,” *J Struct Biol*, vol. 215, no. 2, p. 107961, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.JSB.2023.107961.
- [256] P. Samart, Y. Rojanasakul, S. Issaragrisil, and S. Luanpitpong, “A novel E-cadherin/SOX9 axis regulates cancer stem cells in multiple myeloma by activating Akt and MAPK pathways,” *Exp Hematol Oncol*, vol. 11, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S40164-022-00294-X.
- [257] S. Pece, M. Chiariello, C. Murga, and J. S. Gutkind, “Activation of the Protein Kinase Akt/PKB by the Formation of E-cadherin-mediated Cell-Cell Junctions,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 27, pp. 19347–19351, Jul. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.27.19347.
- [258] T. S. Huang *et al.*, “A Regulatory Network Involving β -Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling,” *Stem Cells*, vol. 33, no. 5, pp. 1419–1433, May 2015, doi: 10.1002/STEM.1944.
- [259] R. Wang and M. G. Brattain, “AKT can be activated in the nucleus,” *Cell Signal*, vol. 18, no. 10, pp. 1722–1731, Oct. 2006, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2006.01.020.
- [260] D. M. Presman *et al.*, “Insights on glucocorticoid receptor activity modulation through the binding of rigid steroids,” *PLoS One*, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013279.
- [261] H. Htun, L. T. Holth, D. Walker, J. R. Davie, and G. L. Hager, “Direct visualization of the human estrogen receptor reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor,” *Mol Biol Cell*, 1999, doi: 10.1091/mbc.10.2.471.
- [262] Q. Yang, W. Jiang, and P. Hou, “Emerging role of PI3K/AKT in tumor-related epigenetic regulation,” *Semin Cancer Biol*, vol. 59, pp. 112–124, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.04.001.
- [263] W.-C. Huang and C.-C. Chen, “Akt Phosphorylation of p300 at Ser-1834 Is Essential for Its Histone Acetyltransferase and Transcriptional Activity,” *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 15, pp. 6592–6602, Aug. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.15.6592-6602.2005/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_FIGURE.DOC.
- [264] K. S. J. Foster, W. J. McCrary, J. S. Ross, and C. F. Wright, “Members of the hSWI/SNF chromatin remodeling complex associate with and are phosphorylated by protein kinase B/Akt,” *Oncogene*, vol. 25, no. 33, pp. 4605–12, Aug. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209496.

- [265] T. Zuo *et al.*, “Epigenetic silencing mediated through activated PI3K/AKT signaling in breast cancer,” *Cancer Res*, vol. 71, no. 5, pp. 1752–1762, Mar. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3573.
- [266] D. S. Griffiths *et al.*, “LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease,” *Nat Cell Biol*, 2011, doi: 10.1038/ncb2135.
- [267] D. S. Griffiths *et al.*, “LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease,” *Nature Cell Biology* 2010 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 13–21, Dec. 2010, doi: 10.1038/ncb2135.
- [268] S. I. S. Grewal and S. Jia, “Heterochromatin revisited,” *Nat Rev Genet*, vol. 8, no. January, pp. 35–46, 2007, doi: 10.1038/nrg2008.
- [269] A. Meissner, “Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells,” *Nat Biotechnol*, vol. 28, no. 10, pp. 1079–1088, doi: nbt.1684 [pii] 10.1038/nbt.1684.
- [270] S. H. Kwon *et al.*, “Heterochromatin protein 1 (HP1) connects the FACT histone chaperone complex to the phosphorylated CTD of RNA polymerase II,” *Genes Dev*, vol. 24, pp. 2133–2145, 2010, doi: 10.1101/gad.1959110.
- [271] S. H. Kwon and J. L. Workman, “The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression,” *BioEssays*, vol. 33, no. 4, pp. 280–289, Apr. 2011, doi: 10.1002/bies.201000138.
- [272] M. S. Cosentino *et al.*, “Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation,” *J Mol Biol*, vol. 431, no. 6, pp. 1148–1159, 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.02.012.
- [273] N. Blom, S. Gammeltoft, and S. Brunak, “Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites,” *J Mol Biol*, vol. 294, no. 5, pp. 1351–1362, Dec. 1999, doi: 10.1006/JMBI.1999.3310.
- [274] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak, “Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence,” *Proteomics*, vol. 4, no. 6, pp. 1633–1649, Jun. 2004, doi: 10.1002/PMIC.200300771.
- [275] A. M. Martelli *et al.*, “The emerging multiple roles of nuclear Akt,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1823, no. 12, pp. 2168–2178, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2012.08.017.
- [276] G. Tzivion, M. Dobson, and G. Ramakrishnan, “FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 11, pp. 1938–1945, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2011.06.002.
- [277] D. E. A. Kloet and B. M. T. Burgering, “The PKB/FOXO switch in aging and cancer,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 11, pp. 1926–1937, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2011.04.003.
- [278] S. Oeck *et al.*, “Activating Akt1 mutations alter DNA double strand break repair and radiosensitivity,” *Sci Rep*, vol. 7, Feb. 2017, doi: 10.1038/SREP42700.
- [279] R. Fernandez-Alonso, F. Bustos, C. A. C. Williams, and G. M. Findlay, “Protein Kinases in Pluripotency—Beyond the Usual Suspects,” *J Mol Biol*, vol. 429, no. 10, pp. 1504–1520, May 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.04.013.
- [280] B. D. Ormsbee Golden, E. L. Wuebben, and A. Rizzino, “Sox2 Expression Is Regulated by a Negative Feedback Loop in Embryonic Stem Cells That Involves AKT Signaling and FoxO1,” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76345, Oct. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0076345.
- [281] C.-H. Jeong *et al.*, “Phosphorylation of Sox2 Cooperates in Reprogramming to Pluripotent Stem Cells,” *Stem Cells*, vol. 28, no. 12, pp. 2141–2150, Dec. 2010, doi: 10.1002/stem.540.
- [282] P. A. Campbell and M. A. Rudnicki, “Oct4 interaction with Hmgb2 regulates Akt signaling and pluripotency,” *Stem Cells*, vol. 31, no. 6, pp. 1107–1120, 2013, doi: 10.1002/stem.1365.
- [283] M. D. White *et al.*, “Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo,” *Cell*, vol. 165, no. 1, pp. 75–87, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.02.032.
- [284] M. Stortz *et al.*, “SOX2 Modulates the Nuclear Organization and Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor,” *J Mol Biol*, vol. 434, no. 24, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.JMB.2022.167869.
- [285] M. Stortz *et al.*, “Mapping the Dynamics of the Glucocorticoid Receptor within the Nuclear Landscape,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 6219, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06676-0.
- [286] C. Buecker *et al.*, “Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency,” *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 6, 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.04.003.
- [287] J. C. de Vicente *et al.*, “The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders,” *J Clin Med*, vol. 8, no. 9, p. 1376, Sep. 2019, doi: 10.3390/jcm8091376.

- [288] A. Rasti, M. Mehrazma, Z. Madjid, M. Abolhasani, L. Saeednejad Zanjani, and M. Asgari, "Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 11739, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30168-4.
- [289] W. Luo, S. Li, B. Peng, Y. Ye, X. Deng, and K. Yao, "Embryonic Stem Cells Markers SOX2, OCT4 and Nanog Expression and Their Correlations with Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56324, Feb. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0056324.
- [290] J. P. Rodrigo *et al.*, "A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 11110, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11709-9.
- [291] T. E. Ludwig *et al.*, "ISSCR standards for the use of human stem cells in basic research," *Stem Cell Reports*, vol. 18, no. 9, pp. 1744–1752, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.stemcr.2023.08.003.
- [292] L. Turner, "ISSCR's Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: Supporting development of safe and efficacious stem cell-based interventions," *Stem Cell Reports*, vol. 16, no. 6, pp. 1394–1397, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.stemcr.2021.05.011.
- [293] A. Kirkeby *et al.*, "Preclinical quality, safety, and efficacy of a human embryonic stem cell-derived product for the treatment of Parkinson's disease, STEM-PD," *Cell Stem Cell*, vol. 30, no. 10, pp. 1299-1314.e9, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.stem.2023.08.014.
- [294] A. F. Adler *et al.*, "hESC-Derived Dopaminergic Transplants Integrate into Basal Ganglia Circuitry in a Preclinical Model of Parkinson's Disease," *Cell Rep*, vol. 28, no. 13, pp. 3462-3473.e5, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.058.
- [295] "First patient receives milestone stem cell-based transplant for Parkinson's Disease | Lund University." Accessed: Oct. 17, 2023. [Online]. Available: <https://www.lunduniversity.lu.se/article/first-patient-receives-milestone-stem-cell-based-transplant-parkinsons-disease>
- [296] Y. H. Choi, Y.-J. Kim, H. M. Jeong, Y.-H. Jin, C.-Y. Yeo, and K. Y. Lee, "Akt enhances Runx2 protein stability by regulating Smurf2 function during osteoblast differentiation," *FEBS Journal*, vol. 281, no. 16, pp. 3656–3666, Aug. 2014, doi: 10.1111/febs.12887.
- [297] Y. Wang *et al.*, "The IL-15–AKT–XBP1s signaling pathway contributes to effector functions and survival in human NK cells," *Nat Immunol*, vol. 20, no. 1, pp. 10–17, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41590-018-0265-1.
- [298] V. Y.-F. Wang *et al.*, "Bcl3 Phosphorylation by Akt, Erk2, and IKK Is Required for Its Transcriptional Activity," *Mol Cell*, vol. 67, no. 3, pp. 484-497.e5, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.011.
- [299] M. Méndez-Pertuz *et al.*, "Modulation of telomere protection by the PI3K/AKT pathway," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 1278, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01329-2.
- [300] M. L. Golson and K. H. Kaestner, "Fox transcription factors: from development to disease," *Development*, vol. 143, no. 24, pp. 4558–4570, Dec. 2016, doi: 10.1242/dev.112672.
- [301] S.-L. Ang *et al.*, "The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins," *Development*, vol. 119, no. 4, pp. 1301–1315, Dec. 1993, doi: 10.1242/dev.119.4.1301.
- [302] K. Lee *et al.*, "FOXA2 Is Required for Enhancer Priming during Pancreatic Differentiation," *Cell Rep*, vol. 28, no. 2, pp. 382-393.e7, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.034.
- [303] M. Iwafuchi-Doi and K. S. Zaret, "Pioneer transcription factors in cell reprogramming," *Genes and Development*, vol. 28, no. 24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 2679–2692, Dec. 15, 2014. doi: 10.1101/gad.253443.114.
- [304] C. S. Lee, J. R. Friedman, J. T. Fulmer, and K. H. Kaestner, "The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors," *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 944–947, Jun. 2005, doi: 10.1038/nature03649.
- [305] J. R. Friedman and K. H. Kaestner, "The Foxa family of transcription factors in development and metabolism," *Cell Mol Life Sci*, vol. 63, no. 19, pp. 2317–2328, 2006, doi: 10.1007/s00018-006-6095-6.
- [306] Z. Li *et al.*, "Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation," *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1608–1616, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.018.
- [307] J. Li *et al.*, "TET1 dioxygenase is required for FOXA2-associated chromatin remodeling in pancreatic beta-cell differentiation," *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-31611-x.
- [308] F. M. Cernilogar *et al.*, "Pre-marked chromatin and transcription factor co-binding shape the pioneering activity of Foxa2," *Nucleic Acids Res*, vol. 47, no. 17, pp. 9069–9086, Sep. 2019, doi: 10.1093/NAR/GKZ627.
- [309] M. Iwafuchi *et al.*, "Gene network transitions in embryos depend upon interactions between a pioneer transcription factor and core histones," *Nat Genet*, vol. 52, no. 4, pp. 418–427, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41588-020-0591-8.
- [310] L. A. Cirillo, F. R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik, and K. S. Zaret, "Opening of Compacted Chromatin by Early Developmental Transcription Factors HNF3 (FoxA) and GATA-4," *Mol Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 279–289, Feb. 2002, doi: 10.1016/S1097-2765(02)00459-8.

- [311] O. Alder *et al.*, "Hippo Signaling Influences HNF4A and FOXA2 Enhancer Switching during Hepatocyte Differentiation," *Cell Rep*, vol. 9, no. 1, pp. 261–271, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.046.
- [312] T. Sekiya and K. S. Zaret, "Repression by Groucho/TLE/Grg Proteins: Genomic Site Recruitment Generates Compacted Chromatin In Vitro and Impairs Activator Binding In Vivo," *Mol Cell*, vol. 28, no. 2, pp. 291–303, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.002.
- [313] C. Wolfrum, D. Besser, E. Luca, and M. Stoffel, "Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclearcytosolic localization," 2003. [Online]. Available: www.pnas.org
- [314] A. Vadhan *et al.*, "CD44 Promotes Breast Cancer Metastasis through AKT-Mediated Downregulation of Nuclear FOXA2," *Biomedicines*, vol. 10, no. 10, Oct. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10102488.
- [315] S. Mora-Castilla *et al.*, "Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation," *Cell Death Differ*, vol. 17, no. 6, pp. 1025–1033, Jun. 2010, doi: 10.1038/cdd.2009.204.
- [316] W. Wruck *et al.*, "The pioneer and differentiation factor FOXA2 is a key driver of yolk-sac tumour formation and a new biomarker for paediatric and adult yolk-sac tumours," *J Cell Mol Med*, vol. 25, no. 3, pp. 1394–1405, Feb. 2021, doi: 10.1111/jcmm.16222.
- [317] M. Matsuo *et al.*, "Targeted depletion of uterine glandular Foxa2 induces embryonic diapause in mice," vol. 11, p. 78277, 2022, doi: 10.7554/eLife.
- [318] S. Mora-Castilla *et al.*, "Transient downregulation of nanog and oct4 induced by DETA/NO exposure in mouse embryonic stem cells leads to mesodermal/endodermal lineage differentiation," *Stem Cells Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/379678.
- [319] I. Warren *et al.*, "FOXA1/2 depletion drives global reprogramming of differentiation state and metabolism in a human liver cell line and inhibits differentiation of human stem cell-derived hepatic progenitor cells," *The FASEB Journal*, vol. 37, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1096/fj.202101506RRR.
- [320] M. S. Cosentino *et al.*, "Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation," *J Mol Biol*, vol. 431, no. 6, pp. 1148–1159, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.02.012.
- [321] A. Waisman *et al.*, "Inhibition of Cell Division and DNA Replication Impair Mouse-Naïve Pluripotency Exit," *J Mol Biol*, vol. 429, no. 18, pp. 2802–2815, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.020.
- [322] M. Francia *et al.*, "SUMO conjugation susceptibility of Akt/ protein kinase B affects the expression of the pluripotency transcription factor Nanog in embryonic stem cells," *PLoS One*, vol. 16, no. 7 July, Jul. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0254447.
- [323] L. L. Coa *et al.*, "AKT/protein kinase B associates with β -actin in the nucleus of melanoma cells," *Biosci Rep*, vol. 39, no. 1, p. 20181312, Jan. 2019, doi: 10.1042/BSR20181312.
- [324] E. Wainstein, G. Maik-Rachline, J. Blenis, and R. Seger, "AKTs do not translocate to the nucleus upon stimulation but AKT3 can constitutively signal from the nuclear envelope," *Cell Rep*, vol. 41, no. 10, p. 111733, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.CELREP.2022.111733.
- [325] J. Dopie, K. P. Skarp, E. K. Rajakylä, K. Tanhuanpää, and M. K. Vartiainen, "Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 9, pp. E544–E552, Feb. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1118880109/SUPPL_FILE/PNAS.1118880109_SI.PDF.
- [326] M. Saji, V. Vasko, F. Kada, E. H. Allbritton, K. D. Burman, and M. D. Ringel, "Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 332, no. 1, pp. 167–173, Jun. 2005, doi: 10.1016/J.BBRC.2005.04.109.
- [327] D. Malanga *et al.*, "The Akt1/IL-6/STAT3 pathway regulates growth of lung tumor initiating cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 40, pp. 42667–86, Dec. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5626.
- [328] W. Fischle *et al.*, "Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation," *Nature* 2006 438:7071, vol. 438, no. 7071, pp. 1116–1122, Oct. 2005, doi: 10.1038/nature04219.
- [329] A. Enomoto *et al.*, "Akt/PKB Regulates Actin Organization and Cell Motility via Girdin/APE," *Dev Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 389–402, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.devcel.2005.08.001.
- [330] Z. Fan *et al.*, "Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells," *DNA Cell Biol*, vol. 33, no. 1, pp. 12–9, Jan. 2014, doi: 10.1089/dna.2013.2022.
- [331] G. Xue and B. A. Hemmings, "PKB/Akt-Dependent Regulation of Cell Motility," *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 105, no. 6, pp. 393–404, Mar. 2013, doi: 10.1093/jnci/djs648.
- [332] M. Higuchi, N. Masuyama, Y. Fukui, A. Suzuki, and Y. Gotoh, "Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells," *Current Biology*, vol. 11, no. 24, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0960-9822(01)00599-1.
- [333] D. Kim *et al.*, "Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 11, Sep. 2001, doi: 10.1096/fj.01-0198com.

- [334] M. Morales-Ruiz *et al.*, "Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt.," *Circ Res*, vol. 86, no. 8, pp. 892–6, Apr. 2000.
- [335] L. C. Boraas, J. B. Guidry, E. T. Pineda, and T. Ahsan, "Cytoskeletal expression and remodeling in pluripotent stem cells," *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0145084.
- [336] G. G. Gundersen and H. J. Worman, "Nuclear positioning," *Cell*, vol. 152, no. 6, pp. 1376–1389, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.031.
- [337] F. Martino, A. R. Perestrelo, V. Vinarský, S. Pagliari, and G. Forte, "Cellular mechanotransduction: From tension to function," *Frontiers in Physiology*, vol. 9, no. JUL. Frontiers Media S.A., Jul. 05, 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00824.
- [338] M. C. Keeling, L. R. Flores, A. H. Dodhy, E. R. Murray, and N. Gavara, "Actomyosin and vimentin cytoskeletal networks regulate nuclear shape, mechanics and chromatin organization," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05467-x.
- [339] S. Pongkitwitoon, G. Uzer, J. Rubin, and S. Judex, "Cytoskeletal Configuration Modulates Mechanically Induced Changes in Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis, Morphology, and Stiffness," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep34791.
- [340] S. Biedzinski *et al.*, "Microtubules control nuclear shape and gene expression during early stages of hematopoietic differentiation," *EMBO J*, vol. 39, no. 23, Dec. 2020, doi: 10.15252/embj.2019103957.
- [341] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- [342] J.-W. Shin, J. Swift, I. Ivanovska, K. R. Spinler, A. Buxboim, and D. E. Discher, "Mechanobiology of bone marrow stem cells: From myosin-II forces to compliance of matrix and nucleus in cell forms and fates," *Differentiation*, vol. 86, no. 3, pp. 77–86, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.diff.2013.05.001.
- [343] G. Gangatharan, S. Schneider-Maunoury, and M. A. Brea, "Role of mechanical cues in shaping neuronal morphology and connectivity," *Biol Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 125–136, Jun. 2018, doi: 10.1111/boc.201800003.
- [344] M. Lasser, J. Tiber, and L. A. Lowery, "The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders," *Front Cell Neurosci*, vol. 12, p. 165, Jun. 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00165.
- [345] L. C. Boraas, E. T. Pineda, and T. Ahsan, "Actin and myosin II modulate differentiation of pluripotent stem cells," *PLoS One*, vol. 13, no. 4, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195588.
- [346] J. J. Romero *et al.*, "Nucleus-cytoskeleton communication impacts on OCT4-chromatin interactions in embryonic stem cells," *BMC Biol*, vol. 20, no. 1, p. 6, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12915-021-01207-W.
- [347] J. J. Romero *et al.*, "Nucleus-cytoskeleton communication impacts on OCT4-chromatin interactions in embryonic stem cells," *BMC Biology 2021 20:1*, vol. 20, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2022, doi: 10.1186/S12915-021-01207-W.
- [348] M. J. Lindhurst *et al.*, "Ubiquitous expression of Akt1 p.(E17K) results in vascular defects and embryonic lethality in mice," *Hum Mol Genet*, vol. 29, no. 20, p. 3350, Oct. 2020, doi: 10.1093/HMG/DDAA216.
- [349] "Entry - #176920 - PROTEUS SYNDROME - OMIM." Accessed: Nov. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.omim.org/entry/176920>
- [350] L. G. Biesecker and J. C. Sapp, "Proteus Syndrome," *GeneReviews*®, May 2023, Accessed: Nov. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK99495/>
- [351] L. Biesecker, "The challenges of Proteus syndrome: diagnosis and management," *European Journal of Human Genetics 2006 14:11*, vol. 14, no. 11, pp. 1151–1157, Aug. 2006, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201638.
- [352] J. A. R. Tibbles and M. M. Cohen, "The Proteus syndrome: the Elephant Man diagnosed.," *Br Med J (Clin Res Ed)*, vol. 293, no. 6548, pp. 683–685, Sep. 1986, doi: 10.1136/BMJ.293.6548.683.
- [353] M. J. Lindhurst *et al.*, "A Mosaic Activating Mutation in AKT1 Associated with the Proteus Syndrome," *New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 7, pp. 611–619, Aug. 2011, doi: 10.1056/NEJMOA1104017/SUPPL_FILE/NEJMOA1104017_DISCLOSURES.PDF.
- [354] "Emotiva despedida del joven que sufría la enfermedad 'del hombre elefante.'" Accessed: Nov. 19, 2023. [Online]. Available: https://www.clarin.com/sociedad/emotiva-despedida-enfermedad-hombre-elefante_0_4kmtLhHie.html
- [355] C. Solari *et al.*, "Biochemical and Biophysical Research Communications Induced pluripotent stem cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 410, no. 2, pp. 252–257, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.126.
- [356] C. C. Uphoff and H. G. Drexler, "Detecting Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction," *Cancer Cell Culture*, vol. 731, pp. 93–103, 2011.
- [357] J. M. Ruijter *et al.*, "Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data," *Nucleic Acids Res*, 2009, doi: 10.1093/nar/gkp045.

- [358] E. Willems, I. Mateizel, C. Kemp, G. Cauffman, K. Sermon, and L. Leyns, "Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells," *International Journal of Developmental Biology*, 2006, doi: 10.1387/ijdb.052130ew.
- [359] J. Vandesompele *et al.*, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.," *Genome Biol*, vol. 3, p. RESEARCH0034, 2002, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- [360] T. Mahmood and P. C. Yang, "Western blot: Technique, theory, and trouble shooting," *N Am J Med Sci*, 2012, doi: 10.4103/1947-2714.100998.
- [361] H. C. Birnboim and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.," *Nucleic Acids Res*, vol. 7, no. 6, pp. 1513–23, Nov. 1979, Accessed: Sep. 03, 2017. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388356>
- [362] A. Michelman-Ribeiro *et al.*, "Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy," *Biophys J*, 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.04.027.
- [363] M. D. White *et al.*, "Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo," *Cell*, vol. 165, no. 1, pp. 75–87, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.02.032.
- [364] D. Normanno *et al.*, "Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher," *Nat Commun*, 2015, doi: 10.1038/ncomms8357.