



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

# Relevancia de la acetiltransferasa de histonas Myst4 sobre el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación de células madre embrionarias

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

**Lic. María Soledad Cosentino**

Directora: Dra. Alejandra Guberman  
Consejero de estudios: Dra. Elba Vázquez  
Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica,  
IQUIBICEN, FCEN, UBA  
Buenos Aires, 2018  
Fecha de defensa: 22/03/2018

## Relevancia de la acetiltransferasa de histonas *Myst4* sobre el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación de células madre embrionarias

La pluripotencia y autorrenovación, propiedades fundamentales de las células madre embrionarias (CME), son mantenidas por factores de transcripción (FT) específicos, siendo los más importantes Oct4, Sox2 y Nanog. Estos factores ocupan al mismo tiempo las regiones promotoras de diversos genes a lo largo de todo el genoma, actuando como el núcleo de una red regulatoria que modula la expresión de genes de pluripotencia y de diferenciación celular. Esta regulación de la transcripción está relacionada con cambios en la estructura de la cromatina, generados por distintas proteínas remodeladoras que modifican las colas de las histonas o el DNA, mediante metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, etc. Estas enzimas mantienen la cromatina del estado pluripotente y realizan las modificaciones epigenéticas necesarias para comenzar la diferenciación de células madre pluripotentes (CMP).

Se ha reportado que la acetiltransferasa de histonas *Myst4* posee en su región promotora un elemento regulatorio altamente ocupado por estos FT en CME de ratón. Nuestra hipótesis postula que FT clave de células madre regulan la expresión de *Myst4*, y que esta expresión es necesaria para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de CME. Para estudiarla, nos propusimos como primer objetivo analizar la unión de los FT en la región promotora de *Myst4* mediante estudios de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-seq) disponibles en bases de datos. Luego, analizamos el patrón de expresión de *Myst4* en CME de ratón indiferenciadas y en diferentes etapas de distintos protocolos de diferenciación, tanto en ensayos generados en nuestro laboratorio como en datos de diferenciaciones disponibles de forma abierta. Posteriormente, estudiamos la regulación de *Myst4* por los FT esenciales mediante un abordaje de silenciamiento de estos factores en CME. En este trabajo de tesis, observamos que *Myst4* se expresa en CME de ratón y que es reprimido durante la diferenciación hacia cualquier tipo celular.

Además, nuestros resultados sugieren que su expresión podría estar regulada por Nanog y Oct4, tanto por su posicionamiento en la región regulatoria de *Myst4* como por su represión cuando cualquiera de estos dos factores es silenciado.

Para estudiar la relevancia de *Myst4* sobre el mantenimiento de las propiedades de células madre, utilizamos en primer lugar la estrategia de silenciamiento por shRNA. Sin embargo, ninguno de los tres shRNA ensayados logró un silenciamiento consistente en la expresión de este remodelador. Posteriormente, decidimos utilizar la estrategia de CRISPR/Cas9 para generar líneas celulares de CME *knockout* para *Myst4* (W4 M4<sup>-/-</sup>). Esta línea no presentó diferencias significativas con respecto a la línea *wild type* en los niveles de marcadores de pluripotencia y diferenciación temprana. Sin embargo, observamos un cambio en la morfología de las colonias formadas por las células en estado indiferenciado, siendo las mutantes menos refringentes y más planas que las *wild type*. Por otro lado, las células W4 M4<sup>-/-</sup> mostraron un mayor número de células cuando se diferenciaron hacia progenitores neurales. Además, este aumento se vio acompañado por una disminución del marcador de progenitor neural Sox1 y el aumento del marcador de mesodermo Brachyury. Estos resultados sugieren que la línea con ausencia de *Myst4* presenta una disminución en la eficiencia de diferenciación neural.

Los resultados encontrados en este trabajo de tesis sugieren que *Myst4* cumple una función en la diferenciación de CME. Nos encontramos analizando la relevancia de *Myst4* en la proliferación y la apoptosis de CME en la diferenciación hacia progenitores neurales y neuronas. Consideramos que entender los procesos involucrados en la regulación de la estructura de la cromatina en CME es fundamental para su futura aplicación.

**Palabras clave:** Células madre embrionarias, diferenciación, pluripotencia, regulación génica, remodelado de la cromatina, acetiltransferasa de histonas, *Myst4*

## Relevance of Histone acetyltransferase *Myst4* on pluripotency maintenance and differentiation of embryonic stem cells

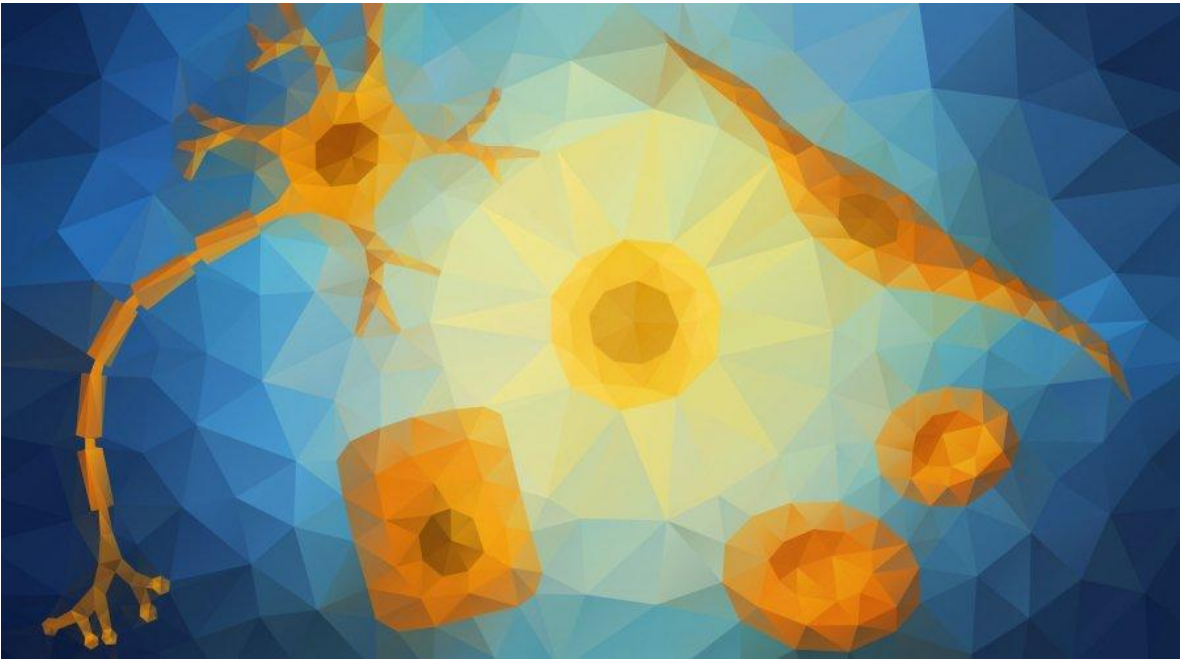
Pluripotency and self-renewal, fundamental properties of embryonic stem cells (ESC), are maintained by specific transcription factors (TF), the most important being Oct4, Sox2 and Nanog. These factors occupy at the same time the promoter regions of diverse genes throughout the genome, acting as the nucleus of a regulatory network that modulates the expression of pluripotency and cell differentiation genes. This regulation of transcription is related to changes in the structure of chromatin, generated by different remodeling proteins that modify the tails of histones or DNA, by methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, etc. These enzymes maintain the chromatin of the pluripotent state and perform the epigenetic modifications necessary to begin the differentiation of pluripotent stem cells (CMP).

It has been reported that histone acetyltransferase *Myst4* possesses in its promoter region a regulatory element highly occupied by these TFs in mouse ESC. Our hypothesis postulates that the key stem cells TF regulate the expression of *Myst4*, and that this expression is necessary for the maintenance of the fundamental properties of ESC. To study it, we proposed, as a first objective, to analyze the binding of the TF in the promoter region of *Myst4* through chromatin immunoprecipitation studies (ChIP-seq) available in databases. Then, we analyzed the expression pattern of *Myst4* in undifferentiated mouse ESC and in different stages of different differentiation protocols, both in assays generated in our laboratory and in open databases. Subsequently, we studied the regulation of *Myst4* by the essential TF by means of a silencing approach of these factors in ESC. In this thesis work, we observed that *Myst4* is expressed in mouse ESC and that it is repressed during differentiation towards any cell type. In addition, our results suggest that its expression could be regulated by Nanog and Oct4, both by its positioning in the regulatory region of *Myst4* and by its repression when any of these two factors is silenced.

To study the relevance of *Myst4* on the maintenance of stem cell properties, we first used a silencing strategy by shRNA. However, none of the three shRNA tested achieved consistent silencing of the expression of this remodeler. Subsequently, we decided to use the CRISPR/Cas9 strategy to generate ESC knockout cell lines for *Myst4* (W4 M4 -/-). This line did not show significant differences to the wild type line with respect to levels of pluripotency and early differentiation markers. However, we observed a change in the morphology of the colonies formed by the cells in the undifferentiated state, the mutants being less refractile and flatter than the wild type. On the other hand, W4 M4 -/- cells showed a greater number of cells when they differentiated towards neural progenitors. In addition, this increase was accompanied by a decrease in the neural progenitor marker *Sox1* and the increase in the mesoderm marker *Brachyury*. These results suggest that the line with absence of *Myst4* shows a decrease in the efficiency of neural differentiation.

The results found in this thesis suggest that *Myst4* plays a role in the differentiation of ESC. We are analyzing the relevance of *Myst4* in the proliferation and apoptosis of ESC in the differentiation towards neural progenitors and neurons. We believe that understanding the processes involved in regulating the structure of chromatin in ESC is fundamental for its future application.

**Keywords:** Embryonic stem cells, differentiation, pluripotency, gene regulation, chromatin remodeling, histone acetyltransferase, *Myst4*.



# AGRADECIMIENTOS

Situaciones que te pueden suceder en el laboratorio de Ale Guberman.

- Lunes, *lab meeting*, cada uno comienza contando qué hizo el fin de semana. Luego, se genera un ambiente de trabajo donde se discute algún proyecto, o alguna decisión a tomar, siendo igual de importante la opinión o los comentarios de un investigador, becario o estudiante. En el medio puede ocurrir el recuerdo de alguna serie o película.
- Fin del almuerzo, los que trajeron fruta la ponen sobre la mesa. Se cuenta rigurosamente la cantidad de personas presentes y se corta la fruta en partes iguales, aunque haya que cortar una naranja en 5. Si alguien está realizando un experimento y no puede estar presente, se le guarda su parte. Si hay una persona externa que desconoce este funcionamiento, se le informa, y eventualmente acepta su porción de fruta.
- Trabajo en cultivo celular. Está por terminar tu turno y te das cuenta que no vas a llegar a terminar a tiempo. En ese momento entra un compañero y pregunta si necesitas ayuda, como si te hubiera leído la mente.
- 18hs, hora mágica (donde se refleja la luz del sol en los edificios que se ven por la ventana). Se genera espontáneamente un *brainstorming* en compañía de unos mates. Te dan ganas de que no termine el día laboral.

Gracias Ale, porque vos generas todo esto. Y gracias Clau, Ari, Cami, Vicky y Mark por su increíble amistad y compañerismo.

Gracias a Gonza, que compartimos este proceso, sintiendo las alegrías y las tristezas, acompañándonos con profundo amor. Gracias a la Universidad pública, que me permitió realizar mis estudios de grado y posgrado de manera libre y gratuita. Gracias a la ciencia de acceso abierto y a la gente que la fomenta, sin la cual no podría haber realizado esta tesis.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1-1
1.1. Desarrollo embrionario de ratón	1-1
1.2. Características de Células Madre Pluripotentes	1-4
1.3. Remodelado de la cromatina en CMP	1-11
1.4. La acetiltransferasa de histonas Myst4	1-17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	2-1
3. RESULTADOS I: Regulación de la expresión de Myst4 por los factores de transcripción clave de células madre pluripotentes	3-1
3.1. Análisis de reportes de interacción de FT clave de CMP con la región regulatoria de Myst4	3-1
3.2. Análisis del patrón de expresión de Myst4 en CME de ratón indiferenciadas y en distintos estadios de diferenciación	3-5
3.3. Regulación de la expresión de Myst4 por Oct4 y Nanog	3-14
3.4. Conclusiones	3-16
4. RESULTADOS II: Relevancia de Myst4 en células madre embrionarias	4-1



4.1.	Generación de construcciones conteniendo diferentes sgRNA para la obtención de líneas estables <i>knockout</i> para el gen <i>Myst4</i> utilizando CRISPR/Cas9	4-3
4.2.	Establecimiento de líneas estables de CME en base a las construcciones obtenidas	4-6
4.3.	Efecto de la ausencia de <i>Myst4</i> sobre el mantenimiento del estado indiferenciado de CME	4-11
4.4.	Efecto de la ausencia de <i>Myst4</i> sobre la pluripotencia de CME	4-14
4.5.	Efecto de la ausencia de <i>Myst4</i> sobre la proliferación de CME en estado indiferenciado y en diferenciación	4-26
4.6.	Generación de líneas para la modulación inducible de la expresión de <i>Myst4</i>	4-31
4.7.	Conclusiones	4-34
5.	DISCUSIÓN	5-1
5.1.	Perspectivas	5-14
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	6-1
6.1.	Cultivo celular	6-1
6.2.	Técnicas microbiológicas	6-7
6.3.	Generación de líneas estables de CME	6-9
6.4.	Análisis de expresión de mRNA	6-15
6.5.	Análisis de niveles proteicos	6-17
6.6.	Análisis de Proliferación y Ciclo Celular	6-20
6.7.	Análisis estadísticos	6-21
7.	BIBLIOGRAFÍA	7-1



# ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
PTM	Modificaciones post-traduccionales
BSA	Seroalbúmina Bovina
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina
ChIP-seq	ChIP seguido de secuenciación
CME	Células Madre Embrionarias
CMP	Células Madre Pluripotentes
CMPI	Células Madre Pluripotentes Inducidas
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dNTPS	desoxi-ribonucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EpiLCs	<i>Epiblast-like Cells</i>
EpiSCs	<i>Epiblast Stem Cells</i>
GSK3	Glucógeno-Sintetasa Quinasa 3
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
MCI	Macizo Celular Interno

MEF	Fibroblastos Embrionarios Murinos
pb	pares de bases
qPCR	Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
shRNA	RNA Cortos en Horquilla
siRNA	RNA pequeños interferentes
UTR	Región No Traducible
HAT	Acetiltransferasa de Histonas
TSS	Sitio de inicio de la transcripción

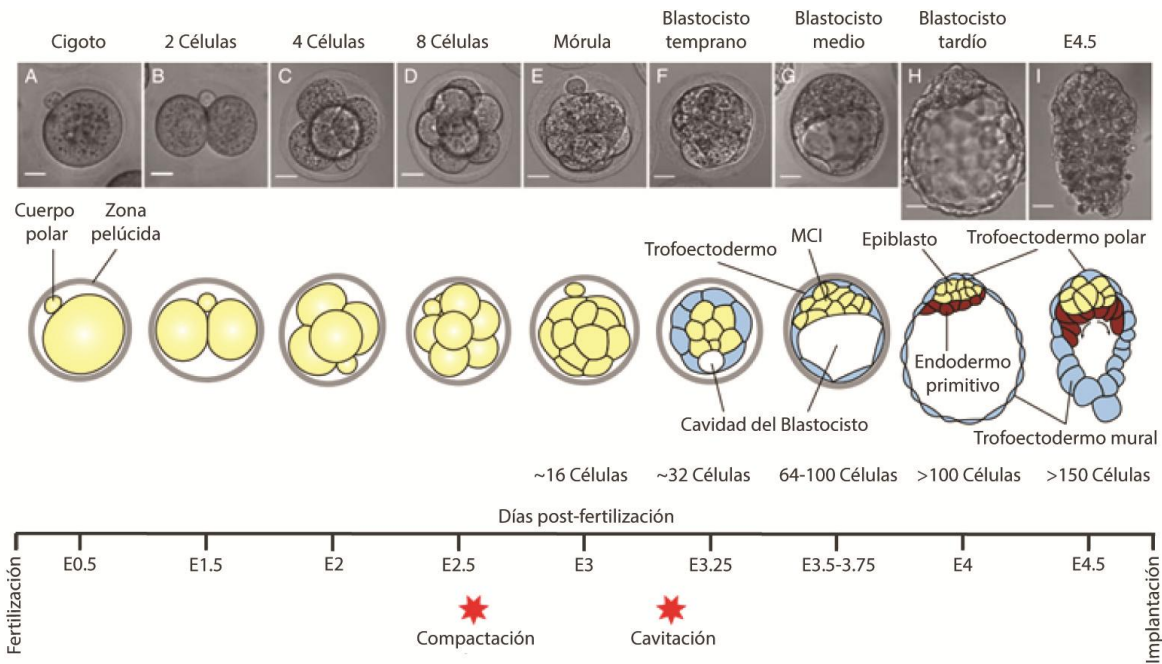
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Desarrollo embrionario de ratón

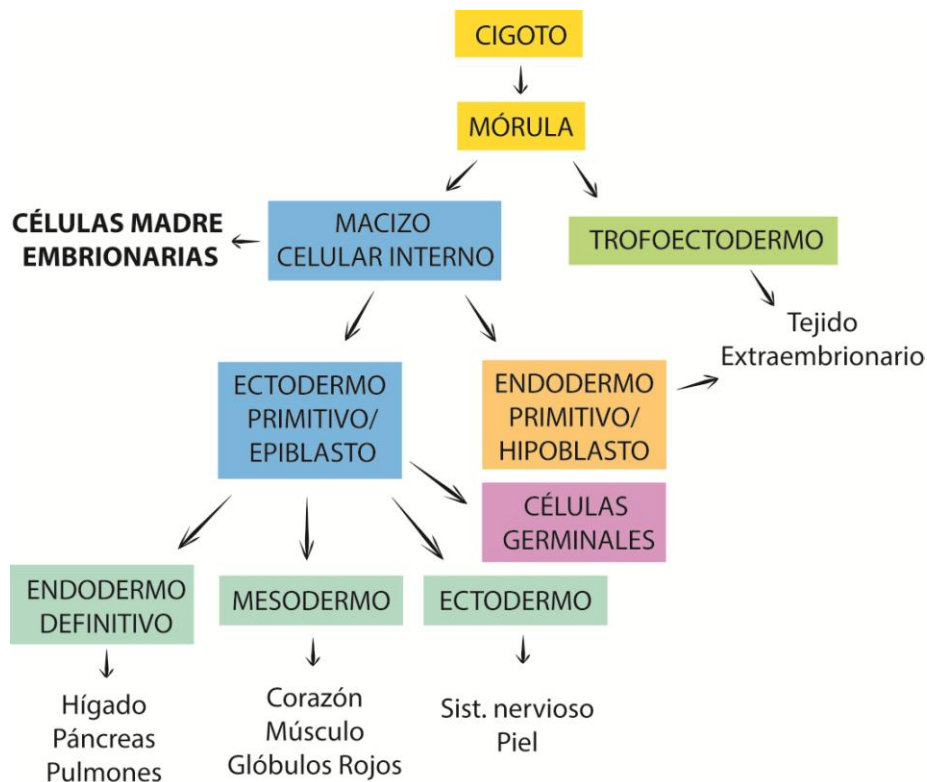
La diferenciación celular da como resultado una pérdida concomitante de potencial de desarrollo. El cigoto es totipotente por definición, ya que es la madre de todas las células del cuerpo y los tejidos extraembrionarios. Sin embargo, para generar un organismo, la totipotencia debe ser abandonada, y este potencial de desarrollo debe transformarse en tejidos especializados con funciones definidas (Saiz y Plusa, 2013).

### 1.1.1. Desarrollo embrionario temprano

Durante el desarrollo embrionario de mamíferos, el óvulo fertilizado (cigoto) sufre divisiones sucesivas y una posterior compactación da lugar al estadio de mórula. A través de la cavitación alrededor de la etapa de 30 células (Smith y McLaren, 1977), la mórula se convierte en el blastocisto (Figura 1-1). Las células localizadas en el interior de la mórula luego de divisiones celulares posteriores se convierten en el macizo celular interno del blastocisto (MCI), mientras que las células situadas en la superficie se convierten en el trofoectodermo (TE) (Tarkowski y Wróblewska, 1967). El trofoectodermo es responsable de la implantación del embrión en el útero y contribuye a la formación de la placenta (Fleming *et al.*, 1984). El MCI, por su parte, prolifera rápidamente para dar lugar al ectodermo primitivo o epiblasto y al endodermo primitivo o hipoblasto. El endodermo primitivo se desarrolla en el endodermo visceral y el endodermo parietal luego de la implantación, los cuales forman la mayor parte del saco vitelino (Nichols y Gardner, 1984). El epiblasto responde a señales extrínsecas y da lugar a las capas germinales primarias (Gardner y Rossant, 1979), así como a las células germinales (Ginsburg *et al.* 1990). La figura 1-2 muestra esquemáticamente los tipos celulares generados en el desarrollo embrionario.



**Figura 1-1. Desarrollo embrionario de ratón desde la fertilización hasta la implantación.** En la parte superior se muestran imágenes de microscopía de campo claro de distintas etapas del desarrollo embrionario temprano de ratón. Debajo se muestra una representación de dichas imágenes, identificando los distintos tipos celulares y los días desde la fertilización. La escala en las imágenes representa 20  $\mu$ m. Figura adaptada de Saiz, N. y colaboradores (Saiz y Plusa, 2013).

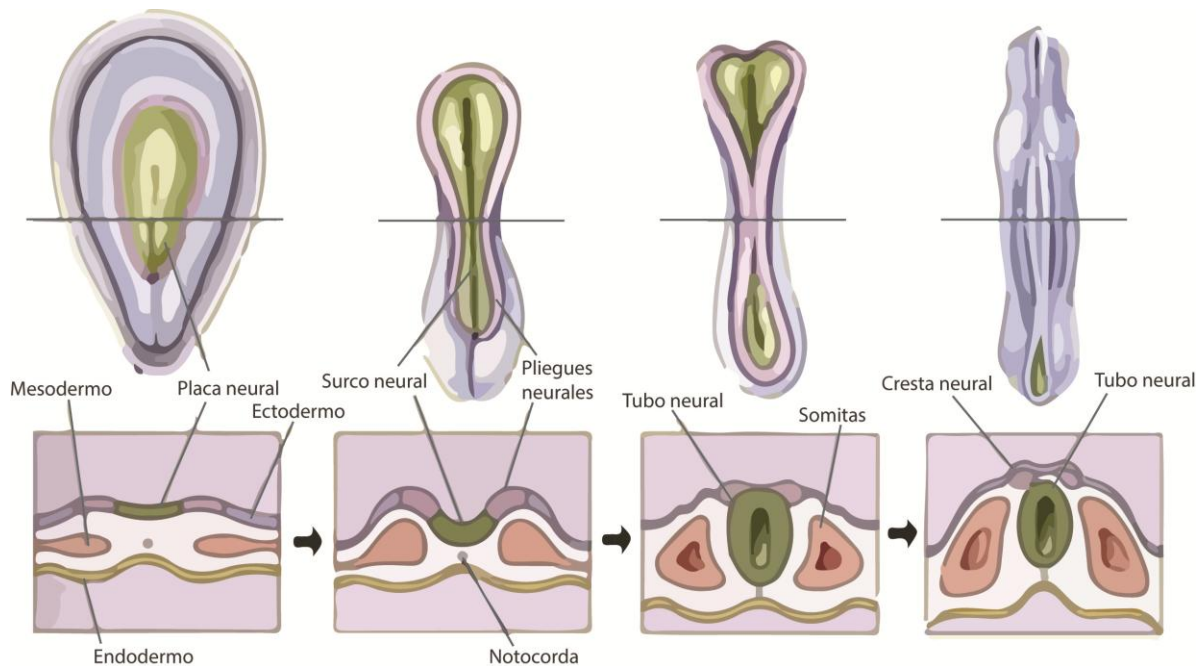


**Figura 1-2. Esquema de los distintos tipos celulares generados durante el desarrollo embrionario de mamíferos.** Luego de la fertilización, el cigoto comienza una serie de divisiones hasta el estadio de mórula, donde comienza la especialización de células hacia el macizo celular interno, de donde se obtienen las células madre embrionarias (CME), y el trofotodermo, que contribuirá a la implantación y a tejidos extraembrionarios. El MCI dará lugar al endodermo primitivo y al epiblasto, que a su vez se diferencia hacia células de las tres capas germinales.

### 1.1.2. Desarrollo embrionario neural

Las capas germinales primarias del embrión se forman durante el proceso de gastrulación, que comienza luego de la implantación, aproximadamente a día 6.5 embrionario (E6.5) en ratones (Tam y Behringer, 1997). Al inicio de la gastrulación, las células del epiblasto en la región que va a definir la parte posterior del embrión se engrosan y forman una estructura transitoria conocida como línea primitiva (*primitive streak*). Durante la gastrulación, las células del epiblasto atraviesan la línea primitiva dando lugar al mesodermo y al endodermo definitivo. Las células en la región más anterior del epiblasto que no se desplazan a través de la línea primitiva formarán el ectodermo (Keller, 2005).

El desarrollo del sistema nervioso comienza cuando un área del ectodermo se vuelve más gruesa y forma lo que se conoce como la placa neural. Esta placa comienza a plegarse hacia adentro, formando un surco llamado surco neural. Las regiones continuas al surco neural, conocidas como pliegues neurales, comienzan a unirse. Aproximadamente en el día E9.5, los pliegues se fusionaron completamente para formar el tubo neural, que eventualmente se convertirá en el cerebro y la médula espinal (Semple *et al.*, 2013) (Figura 1-3).



**Figura 1-3. Esquema del desarrollo del sistema nervioso.** Alrededor de la tercera semana del desarrollo embrionario, la placa neural (verde) comienza a plegarse hacia adentro, formando un surco llamado surco neural. Las regiones continuas al surco neural, conocidas como pliegues neurales, comienzan a fusionarse generando el tubo neural. Adaptado de “the brain from top to bottom” (<http://thebrain.mcgill.ca>).

## 1.2. Características de Células Madre Pluripotentes

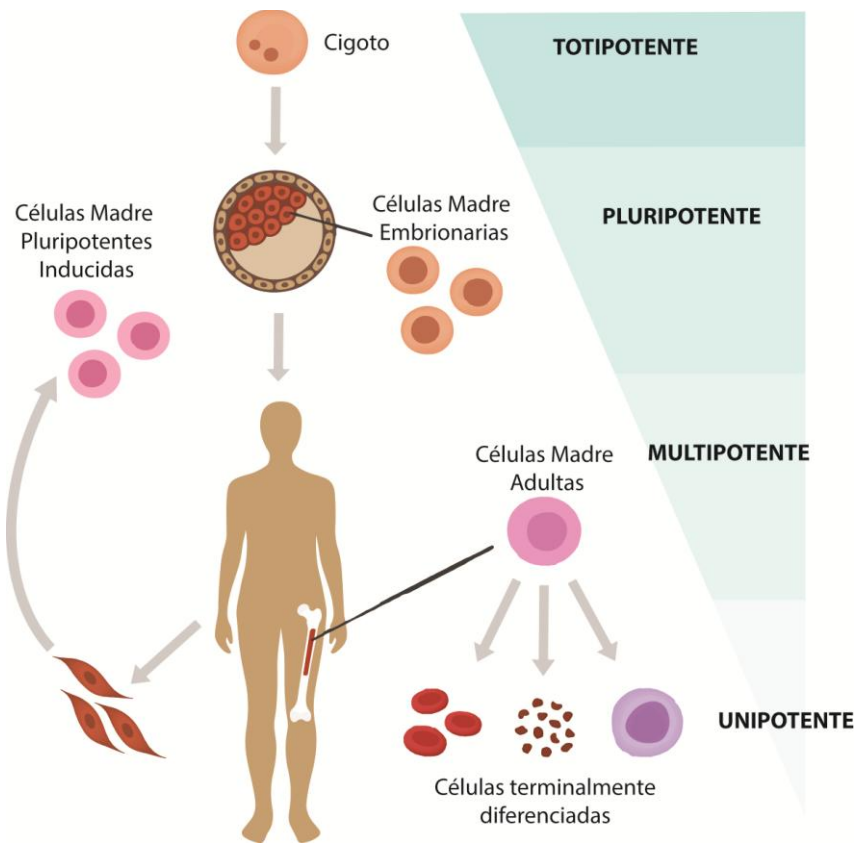
### 1.2.1. Propiedades Fundamentales y tipos de Células Madre

Las células madre poseen dos propiedades fundamentales. La primera es la auto-renovación, la cual es la capacidad de dividirse generando células hijas idénticas entre sí e iguales a la que les dio origen, y la segunda es la capacidad de diferenciación, es decir, de producir un cambio fenotípico con un grado de especialización mayor para cumplir una función específica.

Existen distintos tipos de células madre que pueden clasificarse según su potencial de diferenciación. Como mencionamos anteriormente, el cigoto junto con los primeros blastómeros son totipotentes, es decir, pueden dar origen a un organismo entero y a



todos los tejidos extraembrionarios. En el MCI del blastocisto se encuentran las células madre embrionarias (CME), las cuales pueden diferenciarse hacia todos los tipos celulares que conforman el individuo, capacidad conocida como pluripotencia, pero no pueden generar el linaje extraembrionario. En el individuo adulto, se encuentran las células madre multipotentes, que regeneran las poblaciones de células terminalmente diferenciadas presentes en los tejidos adultos, como las células madre hematopoyéticas que dan origen a células sanguíneas (Figura 1-4).



**Figura 1-4. Tipos de células madre y su potencial de diferenciación.** A medida que avanza el desarrollo de un individuo, disminuye el potencial de diferenciación. El cigoto tiene la capacidad de generar un organismo entero, y por lo tanto es totipotente. Las células madre embrionarias son pluripotentes dado que pueden generar todos los tejidos del organismo, y las células madre adultas multipotentes pueden diferenciarse a tipos celulares acotados. Por otro lado, las células madre pluripotentes inducidas son células pluripotentes generadas a partir de la reprogramación de células terminalmente diferenciadas del individuo adulto.

En el año 2006 se generaron otro tipo de células pluripotentes, las denominadas células madre pluripotentes inducidas (CMPI), mediante la reprogramación de células somáticas terminalmente diferenciadas de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006). Esta reprogramación se logró mediante la introducción en las células de los factores de transcripción (FT) Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, los cuales son clave para el mantenimiento de la pluripotencia. Estos descubrimientos le merecieron el Premio Nobel de Medicina en el año 2012 a Yamanaka, junto con Gurdon, por su aporte revolucionario en el campo de la Biología. A partir de estos trabajos, el área de investigación en CMPI creció de manera vertiginosa, y en poco tiempo se reportaron trabajos donde han sido reprogramadas células provenientes de diferentes especies, incluidas células humanas (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2009), y a partir de distintos tipos de células somáticas (Hanna *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Stadtfeld, Brennand y Hochedlinger, 2008). Este campo resulta altamente prometedor en el área de la medicina regenerativa, dado que es potencialmente posible generar células pluripotentes a partir de células somáticas de un paciente (por ejemplo, células de la piel) y luego diferenciarlas hacia un tipo celular de interés y utilizarlas para regenerar un tejido dañado del paciente. Este procedimiento eliminaría el problema de la histocompatibilidad ya que las células provienen de su propio cuerpo con su propio DNA. Sin embargo, aún es necesario continuar investigando en el campo de las CMPI para lograr una aplicación segura y accesible a toda la comunidad.

### **1.2.2. Mantenimiento CMP en cultivo celular**

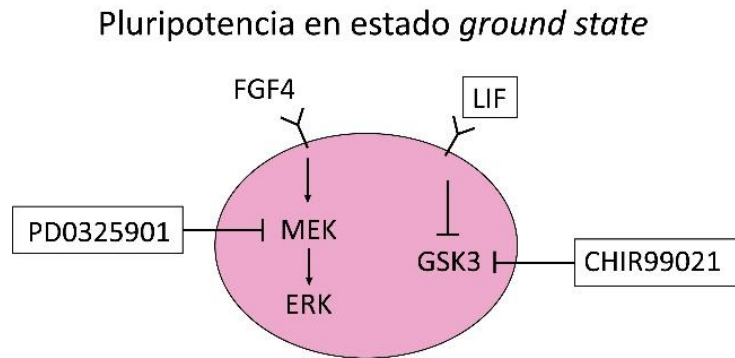
En 1981 se derivaron por primera vez CME a partir del MCI de blastocistos de ratón y pudo mantenerse la pluripotencia en cultivo celular (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estas células retienen la identidad del epiblasto pre-implantatorio y pueden ser totalmente reincorporadas al desarrollo normal si se introducen nuevamente en blastocistos (Bradley *et al.*, 1984). Sin embargo, las CME ya no se pueden derivar del

epiblasto post-implantatorio (Boroviak *et al.*, 2014). En cambio, se puede establecer un tipo alternativo de línea de células pluripotentes, denominadas células madre derivadas del epiblasto post-implantatorio (EpiSC) (Brons *et al.*, 2007; Najm *et al.*, 2011), las cuales ya no son capaces de reincorporarse al desarrollo mediante la inyección de un blastocisto. Los diferentes caracteres pluripotentes de las CME y EpiSC y, en consecuencia, del epiblasto anterior y posterior a la implantación, se distinguen por los términos "naïve" y "primed" (Nichols y Smith, 2009).

Las primeras CME fueron mantenidas en cultivo sobre fibroblastos (*feeder layer*), sin tener una definición de los factores que secretaban estas células y las mantenían en estado indiferenciado. Luego, se descubrió que la citoquina leukemia inhibitory factor (LIF) podía reemplazar a las *feeder layer*, manteniendo las CME en presencia de suero fetal bovino (SFB) en placas pre-tratadas con gelatina (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). LIF mantiene el estado indiferenciado en parte al inactivar a la enzima *glycogen synthase kinase-3* (GSK3), la cual normalmente reprime la expresión de los FT Nanog y c-Myc, necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado. Por otra parte, se vio que el SFB contenía otra citoquina clave para el mantenimiento de la pluripotencia, el BMP4. Este factor inhibe la vía de ERK, la cual se activa autócrinamente por FGF4 y provoca diferenciación hacia linajes neurales (Hirai, Karian y Kikyo, 2011). La condición SFB/LIF logró que el cultivo de CME sea más simple y, lo que es más importante, mantuvo la pluripotencia de las células. Sin embargo, las células en estos cultivos son una población heterogénea en términos de expresión de ciertos genes de pluripotencia como Nanog, Stella, Rex1, Esrrb y Klf4 (Chambers *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008).

Distintas investigaciones sobre el efecto de suprimir genética o químicamente la señalización de FGF/ERK llevó al descubrimiento de que el bloqueo directo de esta vía combinado con la inhibición parcial de GSK3 permitía la propagación de CME en ausencia de BMP4 o incluso LIF (Burdon *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2008). La versión ahora ampliamente adoptada de este sistema, llamada 2i, comprende dos inhibidores selectivos de moléculas pequeñas que se dirigen a MEK (PD0325921) y GSK3 (CHIR99021) (Figura

1-5). Las CME cultivadas en 2i son en gran medida homogéneas en términos de expresión génica y morfología, especialmente si también se proporciona LIF (Wray *et al.*, 2011). De esta manera, las CMP cultivadas en estas condiciones permanecen en un estado *ground state* de pluripotencia, y representan la inmortalización *in vitro* del epiblasto *naïve* del embrión de ratón (Nichols y Smith, 2009).



**Figura 1-5. Mantenimiento de la pluripotencia en estado *ground state* en cultivo celular.** FGF4 activa de manera autócrina la diferenciación por medio de la vía ERK. El cultivo de CMP en presencia de LIF y los dos inhibidores 2i (PD0325901 y CHIR99021) mantiene la pluripotencia en estado *ground state* al inhibir las vías de diferenciación de ERK y GSK3. Modificado de Hirai y colaboradores (Hirai, Karian y Kikyo, 2011).

Las CME en cultivo, ya sea en condiciones de SFB/LIF o con el agregado de 2i, son capaces de mantenerse en estado indiferenciado de manera indefinida, conservando la pluripotencia por largos períodos de tiempo. Para lograr esto, una de las particularidades de CME es la expresión del gen de la subunidad catalítica de la telomerasa (Hiyama y Hiyama, 2007), la cual evita el acortamiento de los telómeros y la consecuente inducción de la senescencia. Además, presentan una alta tasa de proliferación, con un ciclo celular corto de aproximadamente 15 horas (Abdelalim, 2013), mientras que células diferenciadas en cultivo poseen un ciclo de aproximadamente 24 horas. Esto se debe a que las CME poseen una fase G1 notablemente corta, encontrando normalmente sólo el 15% de las células en esta fase y más del 60% de las células en la fase S en un cultivo celular asincrónico (Hindley y Philpott, 2013). Esta corta duración de G1 está relacionada con la ausencia del *checkpoint* de G1 que determina el pasaje entre la fase G1 y la fase S del ciclo

(Stead *et al.*, 2002). Una vez que se inicia la diferenciación de las CME, se reestablece este *checkpoint* y el ciclo celular se enlentece debido al alargamiento de G1 (Boward, Wu y Dalton, 2016).

### 1.2.3. Diferenciación de CME en cultivo celular

Como mencionamos anteriormente, la pluripotencia es la capacidad de generar células de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Para evaluar la pluripotencia *in vitro*, suele utilizarse un protocolo de diferenciación de CMP no dirigido que se basa en la formación de cuerpos embrioides (Hanging drop) (Kurosawa, 2007). Esta diferenciación permite obtener una mezcla de células diferenciadas de los tres linajes, evaluando su presencia mediante análisis de expresión de marcadores moleculares específicos. Por otro lado, uno de los ensayos *in vivo* utilizados para evaluar pluripotencia consiste en la formación de teratomas. Para esto, se inyectan CMP de manera subcutánea en ratones inmunosuprimidos, las cuales forman un tumor en la zona de inyección. Una vez que logran un tamaño determinado, se evalúa en estos tumores la presencia de tipos celulares derivados de los tres linajes y, de ser así, el tumor se denomina teratoma (Ohtsuka y Dalton, 2008). Describiremos ambas técnicas (*in vitro* e *in vivo*) en detalle en esta tesis.

Actualmente, la formación de teratomas es el ensayo más riguroso para evaluar pluripotencia en CMP de origen humano. Para el caso de CMP no humanas, la técnica que comprueba la pluripotencia, en términos de la capacidad de diferenciación hacia células de todos los tejidos de un individuo, es la inyección de las células en un blastocisto y la posterior generación de ratones quimera (Bradley *et al.*, 1984), donde se evalúa la representación de las células inyectadas en los tejidos del mismo. Dado que este procedimiento resulta complejo y costoso, suelen utilizarse de manera rutinaria las técnicas antes descritas, siendo suficientes para probar la pluripotencia de las células en cultivo.

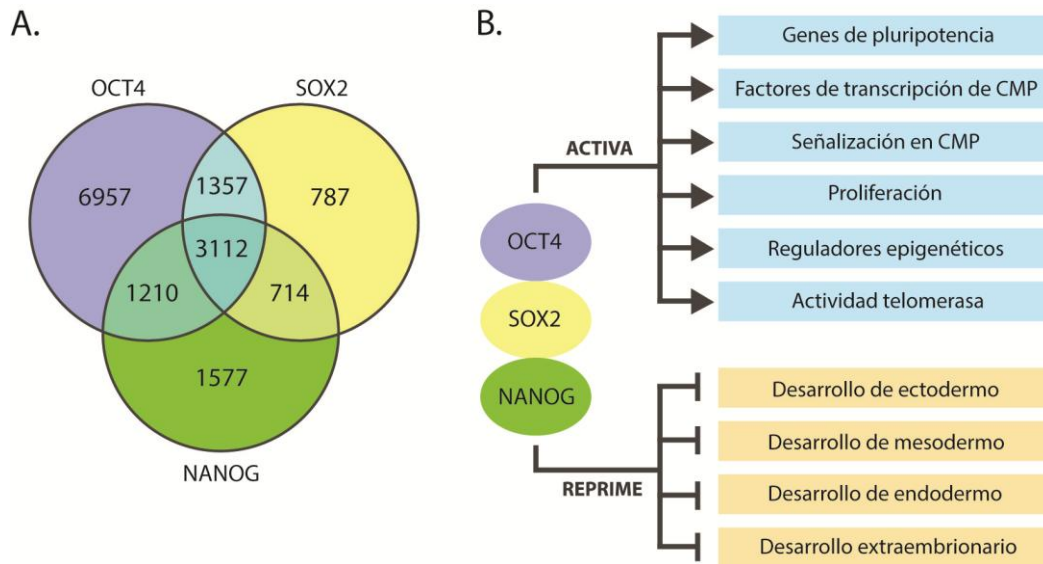
La capacidad de las CMP de diferenciarse hacia todos los tipos celulares genera una gran promesa en la clínica para la regeneración de tejidos (Mahla, 2016). En los últimos años se ha publicado un gran número de investigaciones en las que se desarrollaron condiciones de cultivo y protocolos adecuados para diferenciar CME a un amplio espectro de linajes (Keller, 2005). Además, el estudio de estas diferenciaciones permitió la generación de modelos *in vitro* de desarrollo embrionario, así como modelos de enfermedades y el ensayo de diversas drogas (Siller *et al.*, 2013; Zhu y Huangfu, 2013; Avior, Sagi y Benvenisty, 2016).

Las diferenciaciones dirigidas suelen realizarse utilizando distintas maneras de cultivar las células, generalmente mediante medios definidos que contienen factores específicos que promueven la diferenciación hacia cada linaje. La eficiencia de diferenciación no suele ser total, y es necesario continuar investigando los mecanismos moleculares que gobiernan cada diferenciación dirigida para optimizar estos protocolos.

#### **1.2.4. Factores de transcripción clave de CMP**

El estudio de las propiedades moleculares de las CME y del embrión temprano de mamíferos reveló la existencia de una serie de FT fundamentales para mantener el estado indiferenciado, siendo los más importantes Oct4, Sox2 y Nanog. El desarrollo de métodos que permiten un análisis de la distribución de FT a lo largo de todo el genoma ha permitido conocer diversos genes blanco (*target*) de estos factores (Boyer *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006). Estos trabajos revelaron que Oct4, Sox2 y Nanog comparten un gran número de genes *target*, co-ocupando sitios de unión en sus regiones promotoras. Además, estos FT se unen a sus propios promotores auto-regulando su expresión mediante un *feedback* positivo. Aproximadamente la mitad de los *target* de Oct4 son compartidos con Sox2. Además, el 70% de los genes *target* compartidos con Oct4 y Sox2 también están asociados con Nanog (Figura 1-6 A) (Li *et al.*, 2014). De esta manera, está establecido que los tres FT Oct4, Sox2 y Nanog forman el núcleo de una red regulatoria de la transcripción en CMP,

induciendo genes necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia y reprimiendo genes de diferenciación (Boyer *et al.*, 2005) (Figura 1-6 B).

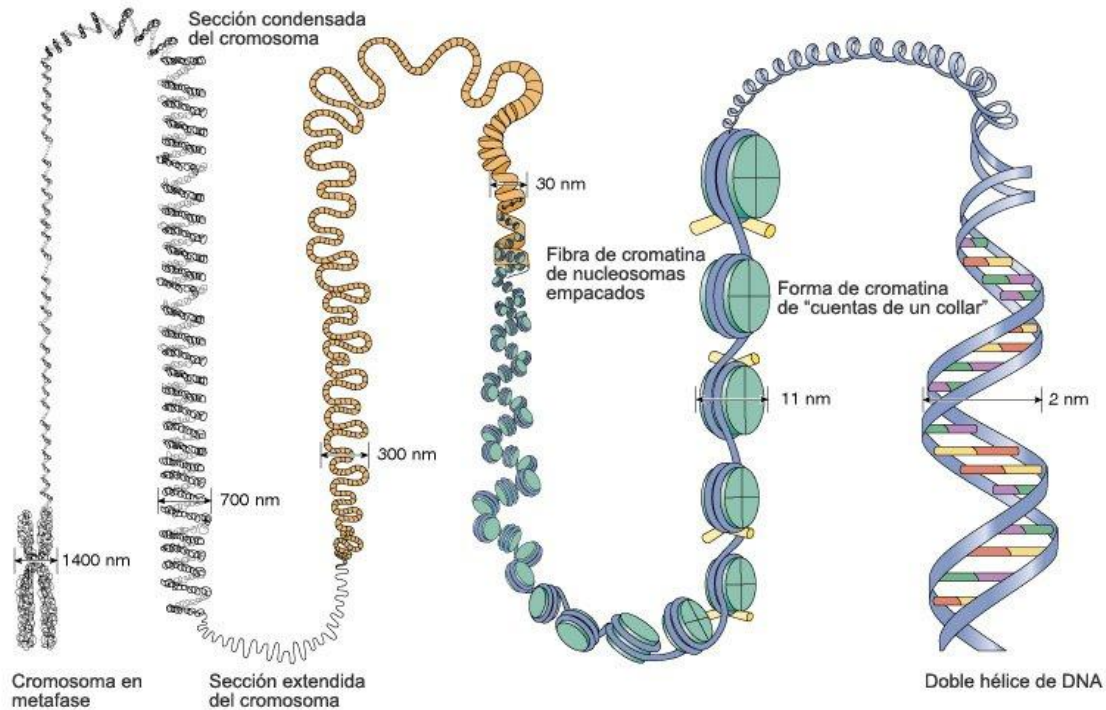


**Figura 1-6. A.** Número de regiones promotoras de genes a los que son reducidos Oct4, Sox2 y Nanog. Las intersecciones de los diagramas representan los promotores que son ocupados por dos o por los tres FT simultáneamente. Adaptado de Li y colaboradores (Li *et al.*, 2014). **B.** Los FT Oct4, Sox2 y Nanog inducen la expresión de genes relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia y reprimen genes relacionados con diferenciación celular.

### 1.3. Remodelado de la cromatina en CMP

#### 1.3.1. Estructura de la cromatina y regulación de la expresión génica

La cromatina es una estructura compleja de DNA, histonas y otros componentes proteicos que posee distintos niveles de organización (Figura 1-7). Las histonas forman los nucleosomas, alrededor de los cuales se envuelve el DNA y se consideran los bloques de construcción de la cromatina. Cada nucleosoma consiste en un octamero de histonas, conteniendo dos copias de las cuatro histonas clásicas H2A, H2B, H3 y H4.

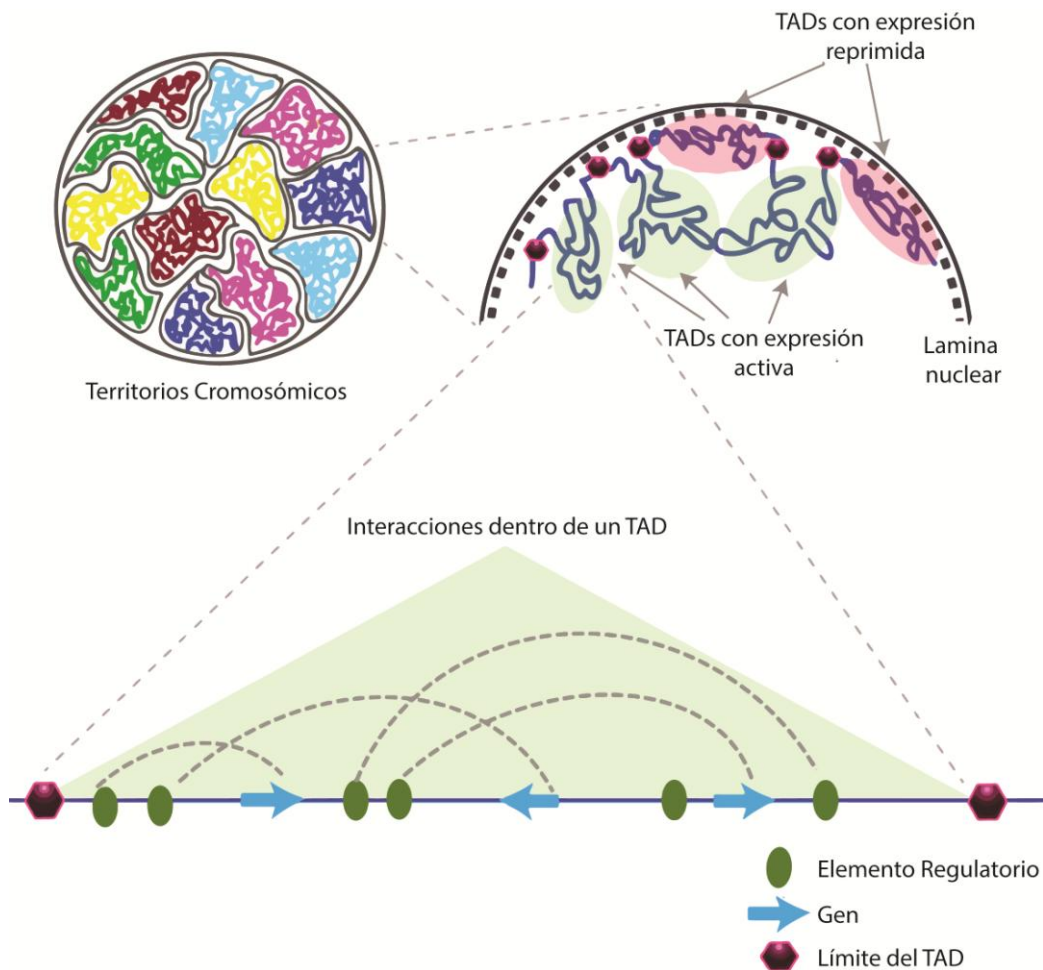


**Figura 1-7. Organización de la cromatina en células eucariotas.** El DNA enrolla alrededor de los nucleosomas, los cuales son empacados en fibras de 30 nm, y luego aumentando el nivel de compactación hasta el del cromosoma en metafase.

La regulación de la expresión génica ocurre mediante elementos regulatorios que se encuentran dispersos en las regiones no codificantes del genoma, como los *enhancers*, *silencers* e *insulators* (Ali et al. 2016; Zabidi y Stark 2016). Los *enhancers* son regiones de DNA no codificante que aumentan la transcripción de un gen, independientemente de su distancia y orientación relativa al promotor basal. Estos elementos regulatorios actúan por medio de la unión de diferentes factores de transcripción y cofactores, que interactúan con la ARN polimerasa II para promover la transcripción de un gen (Zabidi y Stark, 2016). Además, los *enhancers* pueden funcionar a distancias variables del promotor al cual regulan, desde unas pocas bases hasta millones de pares de bases de distancia. El modo de acción de un *enhancer* con su promotor se basa principalmente en un acercamiento espacial, mediante un *loop* en el DNA estabilizado por el complejo Mediador y Cohesina (Pombo y Dillon, 2015).



Los *insulators*, por su parte, son secuencias de ADN que median uniones entre dos sitios usualmente alejados en el genoma, generando un *loop* de interacción mediado por las proteínas CTCF y cohesina. El *loop* generado por la unión de dos *insulators* se denomina dominio topológico de asociación (TAD) (Dixon *et al.*, 2012). Se ha reportado que dentro de los TAD se ven favorecidas las interacciones entre regiones regulatorias y promotores, mientras que se inhiben las interacciones de un promotor con regiones que se encuentren por fuera del mismo (Ong y Corces 2011). En un nivel mayor de regulación, el núcleo en interfase se organiza en territorios cromosómicos, los cuales presentan posiciones preferenciales dentro del núcleo que dependen de cada tipo celular y que están conservadas entre distintas especies (Pombo y Dillon, 2015). Estos territorios pueden organizarse en regiones con expresión activa y regiones con expresión reprimida, estas últimas muchas veces encontradas cercanas a la lámina nuclear (Figura 1-8).



**Figura 1-8. Organización de la cromatina en forma de TADs y territorios cromosómicos.** Dentro del núcleo en interfase, los cromosomas se organizan en territorios cromosómicos, donde se encuentran compartimentos de expresión activa e inactiva, estos últimos muchas veces encontrados cercanos a la lámina nuclear. Los dominios de interacción del DNA se denominan TADs, los cuales permiten la interacción de distintas regiones del DNA para la regulación de la expresión génica.

### 1.3.2. Modificaciones epigenéticas

Las alteraciones de la estructura de la cromatina que no afectan a la secuencia genómica se definen como modificaciones epigenéticas. Estos patrones epigenéticos incluyen la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales (PTM) de las histonas (también llamadas marcas de histonas), el empaquetamiento y reordenamiento de nucleosomas, las estructuras de cromatina de orden superior y la interacción dinámica entre la cromatina y la lámina nuclear. Las colas N-terminales de las histonas están sujetas a diversas PTM, que incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitilación, sumoilación, entre otras, con efectos activadores o inhibidores sobre la transcripción. Por su parte, la metilación del DNA en dinucleótidos de citosina y guanina (islas CpG) está mediada por DNA metiltransferasas (DNMT) y suele ser represiva. Esta metilación del DNA suele ser un patrón epigenético más estable y heredable, que puede persistir durante varias generaciones de células (Gaspar-Maia *et al.*, 2011).

Como mencionamos anteriormente, todas las células de un animal se originan a partir de una única célula: el cigoto. Estas células comparten el mismo genoma pero muestran diferentes fenotipos y realizan diversas funciones. La identidad celular individual se establece durante el desarrollo principalmente por medios epigenéticos, ya que el material genético permanece inalterado (Bulger y Groudine 2011). Durante el desarrollo, las células adquieren cambios estables en sus epigenomas, y estos cambios aseguran que el proceso de diferenciación sea unidireccional (Li, Liu y Izpisua Belmonte, 2012).

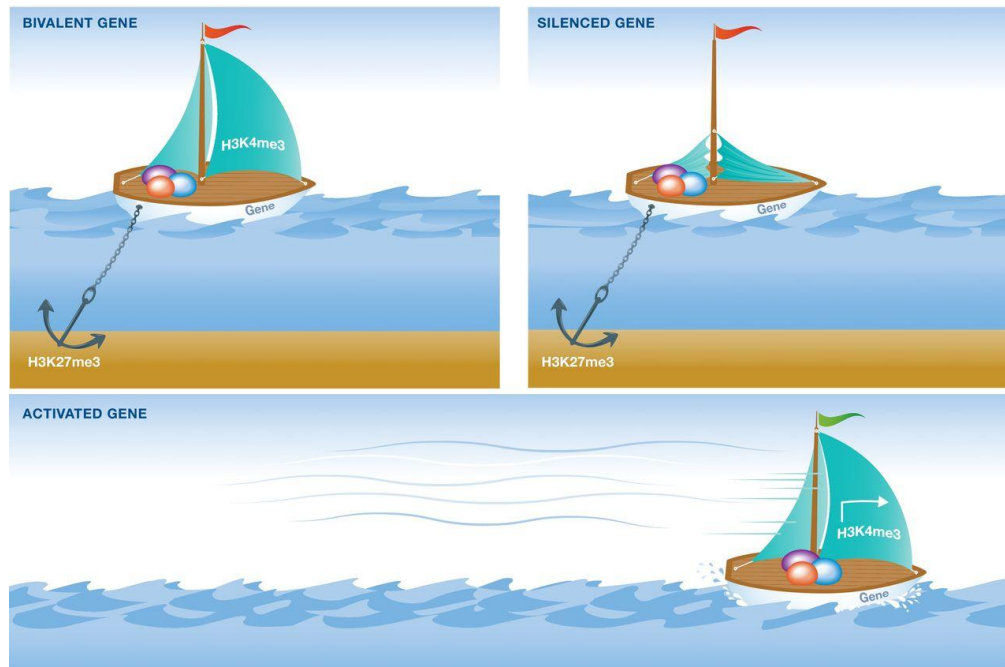
La regulación epigenética de la expresión génica requiere la participación de muchas enzimas modificadoras de histonas diferentes, incluidas las "*writers*" que generan

las modificaciones, las "erasers" que las eliminan, mientras que las "readers" reconocen las marcas distribuidas a través del genoma e interaccionan con proteínas catalíticas. Una función de las modificaciones de las histonas es coordinar la relación entre los remodeladores de cromatina y la maquinaria transcripcional para la regulación de la expresión génica. Estas marcas funcionan en conjunto con las variantes de las histonas, las actividades de remodelación de la cromatina, la metilación del DNA y las chaperonas de histonas para contribuir al establecimiento y mantenimiento fiel de la cromatina.

### **1.3.3. Importancia de la epigenética en CMP**

Estudios recientes indican que las CMP poseen un estado de cromatina "abierto" en comparación con el de células somáticas, lo que implica que su estructura general se encuentra menos condensada (Niwa, 2007). Se ha propuesto que este estado permite que los programas transcripcionales cambien rápidamente tras la inducción de la diferenciación (Meshorer y Misteli, 2006). Esto puede ser particularmente importante en este tipo de células, ya que debe estar disponible un amplio espectro de opciones de diferenciación.

Las regiones de cromatina enriquecidas simultáneamente en marcas de cromatina activa e inactiva (H3K4me3 y H3K27me3) se conocen como dominios bivalentes, los cuales se encontraron en CME de ratón y humanas (Bernstein *et al.*, 2006). Los genes cuyos sitios de inicio de transcripción se asocian con dominios bivalentes se caracterizan por un bajo nivel de transcripción independientemente de la presencia de la marca de cromatina activa, lo que confirma el hecho de que la marca inactiva H3K27me3 prevalece sobre H3K4me3. La mayoría de los dominios bivalentes están presentes en genes asociados con el desarrollo, y se cree que podrían conducir a la inducción rápida estos genes cuando se induce la diferenciación (Figura 1-9). En ese momento, la mayoría de los dominios bivalentes se vuelven monovalentes y contienen H3K27me3 o H3K4me3, dependiendo del tipo celular al cual se diferencian (Harikumar y Meshorer, 2015).



**Figura 1-9. Concepto de bivalencia.** Un gen con marcas bivalentes es representado como un barco con las velas izadas (H3K4me3) pero con un anda que no permite la navegación (H3K27me3). Un gen silenciado presenta las velas bajas (sin marca de activación) y se encuentra en un estado de represión estable. Si el ancla se remueve en el gen bivalente, el barco está listo para navegar y el gen se encuentra rápidamente activo.

La marca represiva de trimetilación de H3K27 que silencia genes de desarrollo en CMP está regulada por el complejo de proteínas Polycomb (PcG) (Boyer *et al.*, 2006). Las proteínas PcG incluyen el complejo represivo 2 de Polycomb (PRC2), que está involucrado en la adición de la marca, y PRC1, que reconoce esta marca y mantiene el estado represivo. Además, los genes *target* de las proteínas PcG tienden a ser co-ocupados por los FT Oct4, Sox2 y Nanog, actuando en conjunto para la represión de los genes de diferenciación. Por estas razones, estos complejos cumplen un rol esencial en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la auto-renovación y la diferenciación de CMP (Medvedev, Pokushalov y Zakian, 2012).

Por otro lado, la marca de transcripción activa H3K4me3 es realizada por el complejo Trithorax (TrxG). Se ha demostrado que este complejo actúa junto con Oct4,

Sox2 y Nanog para regular positivamente la transcripción génica en CME de ratón. Además, en experimentos de reprogramación de células somáticas, se reportó que el complejo TrxG es necesario para la formación de CMPI (Ang *et al.*, 2011).

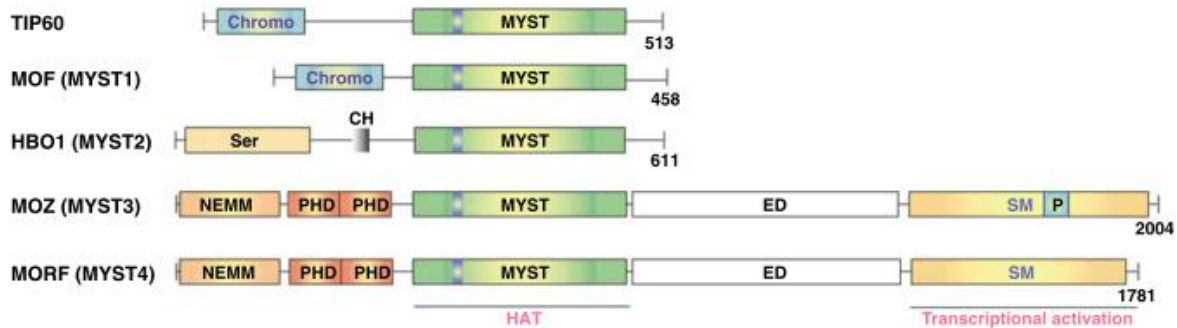
Además de las modificaciones de las histonas, la metilación de DNA es el principal mecanismo que regula los procesos celulares en los mamíferos (Cedar y Bergman, 2009). Se ha reportado que esta metilación participa en procesos fundamentales, como la embriogénesis, la diferenciación celular, el *imprinting* genómico, la cancerogénesis, la regulación de la transcripción de elementos genéticos móviles y la inactivación del cromosoma X en mamíferos hembra, entre otros. La metilación de DNA desempeña un papel crucial en la regulación de la auto-renovación y la pluripotencia de las CMP (Fouse *et al.*, 2008). Los promotores de los principales genes asociados con el mantenimiento de la pluripotencia y la autorrenovación se encuentran hipometilados en este tipo de células. Durante el desarrollo embrionario o en la diferenciación celular en cultivo, estos promotores sufren metilación con la participación de las DNA metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Por otro lado, las CME muestran un enriquecimiento significativo de metilación fuera de las islas CpG, una característica que parece ser exclusiva de estas células (Gaspar-Maia *et al.*, 2011).

#### 1.4. La acetiltransferasa de histonas **Myst4**

La acetilación de histonas es uno de los principales mecanismos que regulan la estructura y función de la cromatina. Además de las histonas, muchas otras proteínas también son blanco de acetilación *in vivo*. Las enzimas que realizan estas modificaciones se denominan acetiltransferasas de histonas (HAT), las cuales pertenecen a diferentes familias, incluidas GCN5/PCAF, p300/CBP y MYST, siendo esta última la menos estudiada.

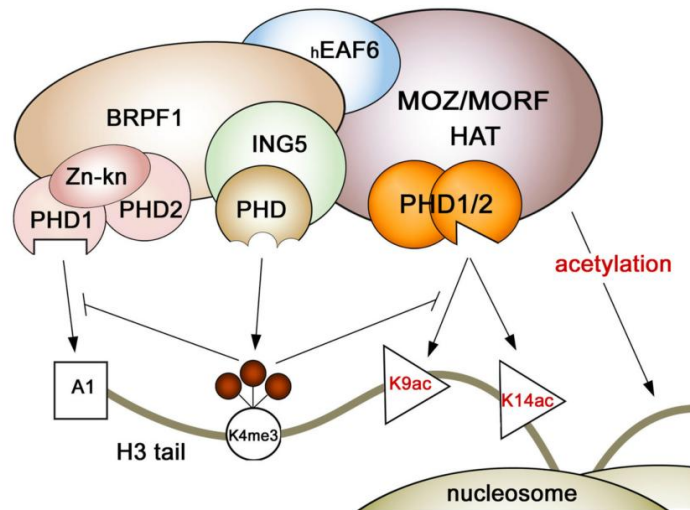
Myst4, también llamada KAT6B, MORF y Qkf, fue descubierta en humanos en el año 1999 (Champagne *et al.*, 1999) y su homólogo en ratón en el año 2000 (Thomas *et al.*, 2000). La familia MYST está compuesta por 5 integrantes en ambas especies, siendo el

dominio catalítico MYST la única característica estructural que comparten (Figura 1-10). Myst3 y Myst4 son los que comparten mayor identidad de secuencia y de dominios (Yang y Ullah, 2007). A pesar de la alta homología entre estas dos HAT, estudios en ratones y *zebrafish* revelaron que no son funcionalmente redundantes (Pelletier *et al.*, 2002; Miller, 2004; Thomas *et al.*, 2006).



**Figura 1-10. Dominios presentes en los distintos integrantes de la familia Myst en humanos.** Las 5 proteínas que forman parte de la familia Myst de acetiltransferasas comparten el dominio catalítico MYST. Myst3 y Myst4 son los que comparten mayor identidad de secuencia y de dominios. Adaptado de Yang y colaboradores (Yang y Ullah, 2007).

Tanto Myst3 como Myst4 forman complejos tetraméricos interactuando con subunidades no catalíticas. Estas proteínas poseen diversos dominios de interacción con el DNA o con modificaciones en las histonas, permitiendo a este complejo HAT reconocer diferentes marcas en la cromatina y así modular su actividad catalítica (Ullah *et al.*, 2008) (Figura 1-11). Se cree que Myst4 puede actuar como un coactivador de la transcripción, asociándose a diferentes FT y generando las marcas en la cromatina necesarias para modular la expresión de un gen. Sin embargo, aún se desconoce la totalidad de marcas de acetilación que realiza esta enzima.



**Figura 1-11. Complejo tetramérico de Myst3 (MOZ) o Myst4 (MORF).** Myst3 y Myst4 poseen dominios PHD que reconocen marcas de acetilación en las histonas. Las proteínas asociadas a estas enzimas también poseen dominios de reconocimiento de distintas marcas de la cromatina y pueden modular la actividad catalítica HAT. Adaptado de Muzaffar y colaboradores (Muzaffar *et al.*, 2012).

Se ha reportado que una disminución en los niveles de Myst4 en ratón producen defectos en el establecimiento y la autorrenovación de células madre neurales adultas, y consecuentemente defectos progresivos en la neurogénesis adulta (Merson *et al.*, 2006). La expresión de Myst4 se localiza en las regiones neurogénicas tanto durante el desarrollo como en el individuo adulto (Thomas *et al.*, 2000; Merson *et al.*, 2006) Esta regulación espacial y temporal de la expresión no es usual para una HAT, las cuales suelen tener expresión generalizada en muchos los tejidos. En humanos, la pérdida de solo un alelo de Myst4 produce discapacidad intelectual (Clayton-Smith *et al.*, 2011; Campeau *et al.*, 2012; Szakszon *et al.*, 2013). Además, se reportaron fusiones de Myst4 con otras acetiltransferasas como p300 y CPB en diferentes tipos de leucemias, generando una acetilación exacerbada en las células afectadas (Murati *et al.*, 2004).

Recientemente, en un trabajo que estudiaba el posicionamiento de FT clave de CME en regiones promotoras, se reportó que Myst4 presenta un enhancer con altos niveles de unión de Oct4, Sox2 y Nanog en este tipo de células, lo cual sugiere que su expresión sería regulada por estos factores (Whyte *et al.*, 2013). Sin embargo, su patrón

de expresión y su relevancia en CME aún no han sido estudiados, y será el objetivo de este trabajo de tesis.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las modificaciones epigenéticas cumplen un rol clave en la regulación de la expresión génica en CMP, siendo necesarias tanto para el mantenimiento del estado indiferenciado, activando genes de pluripotencia y reprimiendo genes de diferenciación, como para generar los cambios en el programa transcripcional que ocurren al inicio y durante el proceso de diferenciación. El objetivo general de este trabajo fue estudiar la participación de proteínas remodeladoras de la cromatina en el mantenimiento del estado indiferenciado y en la diferenciación de CMP. Nuestro fin último es contribuir al conocimiento de mecanismos moleculares clave de CMP, fundamentales para una aplicación segura de las mismas.

De un primer análisis surgió la acetiltransferasa de histonas *Myst4* como un candidato que podría ser relevante en CMP. El gen de este remodelador posee un elemento regulatorio altamente ocupado por los FT fundamentales de este tipo de células. En este trabajo de tesis, nos propusimos estudiar su regulación y relevancia en CMP en base a la siguiente hipótesis:

**Los FT clave de CMP regulan la expresión de *Myst4*, y su actividad es relevante para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de CME.**

Para estudiarla nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la interacción de FT clave de CMP con la región regulatoria de *Myst4* mediante estudios de inmunoprecipitación de la cromatina a escala genómica disponibles en bases de datos.

2. Analizar el patrón de expresión de *Myst4* en CME de ratón en estado indiferenciado y en diferentes etapas de distintos protocolos de diferenciación.
3. Estudiar la regulación de *Myst4* por los FT esenciales para la preservación de la pluripotencia mediante un abordaje de silenciamiento de estos factores en CME.
4. Estudiar la relevancia de *Myst4* en CME.
  - a. Generar líneas estables en CME de ratón *knockout* para el gen de *Myst4*.
  - b. Evaluar el efecto de la anulación de *Myst4* sobre el mantenimiento del estado indiferenciado de CME.
  - c. Estudiar el efecto de la anulación de *Myst4* sobre la capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*.
  - d. Evaluar el efecto de la anulación de *Myst4* sobre la proliferación de CME en estado indiferenciado y durante la diferenciación.

### **3. RESULTADOS I: Regulación de la expresión de Myst4 por los factores de transcripción clave de células madre pluripotentes**

Las CMP poseen un programa de expresión génica característico. Los FT clave de células madre forman una red de regulación transcripcional que permite la activación de genes necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia y la represión de genes de diferenciación celular. Para que ocurra esta regulación es clave el rol de los remodeladores de cromatina, dado que la modulación de la expresión de un gen por un FT es siempre acompañada de modificaciones epigenéticas en su región promotora.

Comprender los mecanismos de esta regulación en CMP es fundamental para su futura aplicación tanto en el área de la medicina regenerativa, como para el desarrollo de modelos de enfermedades, entre otras. El objetivo inicial de este trabajo de tesis fue estudiar actores clave en el remodelado de la cromatina de CME que no hayan sido previamente descritos. En este capítulo, comenzamos realizando una búsqueda de genes candidato en estudios a escala global de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en CME y luego nos centramos en el estudio de la acetiltransferasa de histonas Myst4, analizando su patrón de expresión en CME y su regulación por los FT clave de CMP.

#### **3.1. Análisis de reportes de interacción de FT clave de CMP con la región regulatoria de Myst4**

Con el fin de estudiar nuevos remodeladores de la cromatina que pudiesen ser importantes para el mantenimiento de las propiedades de CMP, realizamos una primera

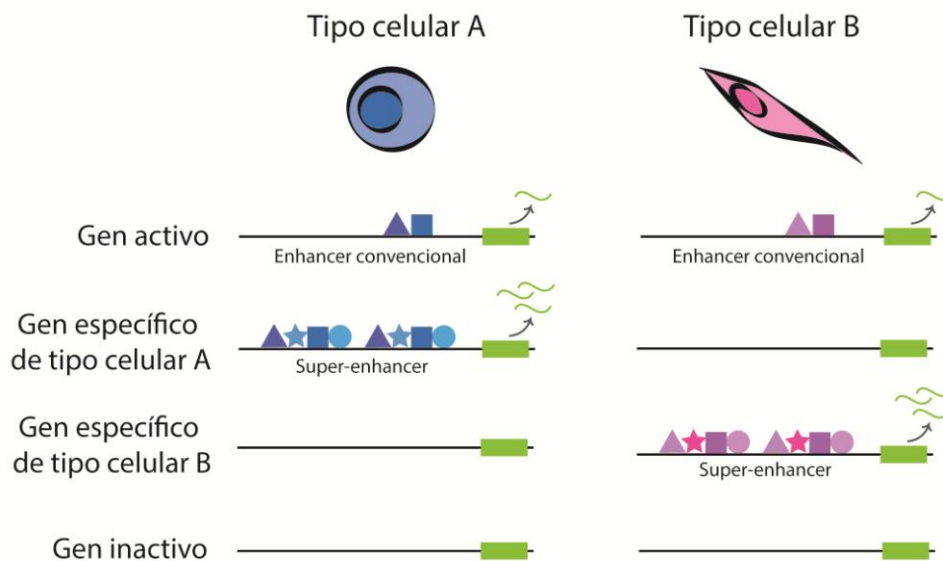
búsqueda bibliográfica analizando el posicionamiento de FT clave de células madre en promotores específicos. Hipotetizamos que remodeladores de la cromatina que presenten altos niveles de unión de estos FT en su región promotora podrían estar regulados por éstos y cumplir un rol en CMP. En un principio, analizamos publicaciones de diferentes estudios de ChIP-seq en los que se estudió de manera global la unión de Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 y otros FT en el genoma de CME. De esta manera, para nuestro primer análisis seleccionamos genes de remodeladores de la cromatina que poseen unión de los FT en su región promotora, y que por lo tanto su expresión podría estar regulada por estos FT específicos de CME.

Entre los genes analizados se encuentran *Myst2*, *Myst4*, *Prmt8*, *Jarid2*, *Smarcaad1*, entre otros, indicando que múltiples remodeladores de la cromatina con diversas funciones podrían estar regulados por estos FT. Sin embargo, *Myst4* fue el que mostró mayor unión de los FT en su región promotora y de manera consistente en distintos trabajos (Figura 3-1).

Trabajo	Línea de CMP	Abordaje	Factores enriquecidos en región regulatoria de <i>Myst4</i>
(Whyte <i>et al.</i> , 2013)	CME de ratón V6.5	ChIP-seq	Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, Essrb
(Ouyang, Zhou y Wong, 2009)*	CME de ratón E14	ChIP-seq	Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, Essrb, Stat3, Smad1
(Chen <i>et al.</i> , 2008)	CME de ratón E14	ChIP-seq	Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, Smad1, Stat3
(Loh <i>et al.</i> , 2006)	CME de ratón E14	ChIP-PET	Nanog

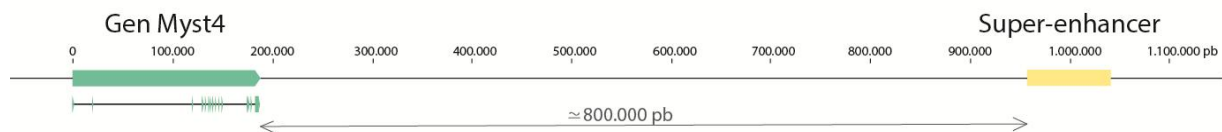
**Figura 3-1. Trabajos de ChIP-seq analizando la unión de FT de CMP en la región regulatoria de *Myst4*.** *Myst4* presenta unión de los FT clave de CMP en su región promotora en distintos trabajos con distintos abordajes y líneas celulares. \*Re-análisis de los datos de Chen *et al.*, 2008.

En particular, Whyte y colaboradores definen a los "super-enhancers" en CME como elementos regulatorios que poseen mayor longitud, mayor densidad de sitios de unión de FT específicos y que producen una mayor expresión del gen regulado en comparación con un enhancer convencional (Whyte *et al.*, 2013). Además, los genes que poseen un super-enhancer en su región regulatoria son generalmente genes específicos del tipo celular, y no genes que se expresan constitutivamente en todos los tipos celulares (Figura 3-2). Los autores de este trabajo asignaron super-enhancers a 237 genes en CME de ratón, siendo *Myst4* la única acetiltransferasa de histonas y, junto con *Smarcaad1*, los únicos genes relacionados con la regulación de la estructura de la cromatina con este elemento regulatorio.



**Figura 3-2. Esquema representativo de la región promotora de genes activos, inactivos y específicos de un tipo celular.** Los super-enhancers se encuentran en regiones regulatorias de genes que definen la identidad celular, poseen una alta densidad de factores de transcripción específicos y generan una mayor expresión del gen regulado en comparación con un enhancer convencional. Adaptado de Whyte y colaboradores (Whyte *et al.*, 2013).

Por otro lado, en 2015 se creó la página Super-Enhancer Archive ([sea.edbc.org](http://sea.edbc.org)) que concentra información de super-enhancers y genes asociados de distintos tejidos y tipos celulares (Wei *et al.*, 2016). Realizando la búsqueda para el gen *Myst4* se observa que éste posee super-enhancer ocupado por los FT específicos de CME en estas células, y que no se observa este elemento regulatorio asociado a éstos u otros FT en ningún otro tejido o línea celular. El gen *Myst4* posee una gran longitud (180.000 pb) y el super-enhancer asociado se encuentra 800.000 pb río abajo del gen (Figura 3-3). De los 220 genes asignados en este buscador, *Myst4*, *Smarcaad1* y *Jarid2* son los únicos remodeladores de la cromatina asociados a un super-enhancer en CME.



**Figura 3-3. Esquema a escala del gen de *Myst4* y la distancia al super-enhancer asociado.** El gen de *Myst4* tiene un tamaño de 180.000 pb, debajo del gen las barras verdes representan los 18 exones. El super-enhancer se encuentra a 800.000 pb río abajo del gen y su tamaño es de aproximadamente 80.000 pb.

*Smarcaad1* es una proteína de la familia SWI/SNF con actividad ATPasa que funciona como represor de la transcripción, generando la estructura compacta de la cromatina involucrada en el silenciamiento génico (Rowbotham *et al.*, 2011), y también como activador de la transcripción asociándose al coactivador p300/CBP (Doiguchi *et al.*, 2016). Además, está involucrado en la reparación del daño al DNA (Costelloe *et al.*, 2013). Por otra parte, *Jarid2* forma parte del complejo PCR2 y favorece la unión de éste a la región promotora de genes blanco (Sanulli *et al.*, 2015). La relevancia de estos remodeladores en CME ya ha sido estudiada, y se demostró que son necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia (Z. Zhang *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2017), por lo que decidimos no profundizar el estudio sobre estos genes.

Como mencionamos anteriormente, existen múltiples enfermedades humanas asociadas a la desregulación de la expresión de *Myst4*. Particularmente, mutaciones en este gen, incluso en uno solo de los cromosomas, se encuentran asociadas a discapacidad intelectual (Clayton-Smith *et al.*, 2011; Campeau *et al.*, 2012; Szakszon *et al.*, 2013). En ratones con expresión disminuida de *Myst4*, se reportó que este gen sería importante para el establecimiento y la auto-renovación de células madre neurales. Asimismo, estos ratones presentan un fenotipo similar al asociado al síndrome humano (Merson *et al.*, 2006). En conjunto, estos antecedentes sugieren que este gen podría ser relevante en el desarrollo del sistema nervioso. Por otra parte, la existencia de este elemento regulatorio y su interacción con los FT específicos de CMP sugieren que este gen podría ser regulado por estos FT y cumplir un rol en este tipo celular. Por estas razones, y dado que aún no hay trabajos sobre la función de *Myst4* en CME, decidimos estudiar la relevancia de este remodelador de la cromatina en nuestro modelo de estudio.

### **3.2. Análisis del patrón de expresión de *Myst4* en CME de ratón indiferenciadas y en distintos estadios de diferenciación**

Como ya mencionamos, los FT clave de CME se expresan en altos niveles en estas células y su expresión disminuye cuando las células salen del estado indiferenciado y se diferencian hacia distintos tipos celulares. Si *Myst4* estuviese regulado positivamente por estos factores, podría mostrar un patrón de expresión similar. Por esta razón, analizamos el perfil de expresión de *Myst4* en CME indiferenciadas y en distintos estadios de diferenciación. A lo largo de este trabajo utilizamos diferentes líneas de CME de ratón de acuerdo a las necesidades, como describiremos oportunamente. Normalmente, para el mantenimiento del estado indiferenciado, las células fueron cultivadas en placas de cultivo previamente tratadas con gelatina para favorecer la adherencia, en un medio de

cultivo conteniendo 15 % de suero fetal bovino (SFB) y suplementado con LIF y los inhibidores 2i.

La diferenciación se llevó a cabo utilizando dos protocolos de diferenciación no dirigidos (cultivo en adherencia en ausencia de LIF y 2i, y formación de cuerpos embrioides por *Hanging drop*) y un protocolo dirigido hacia progenitor neural. Determinamos los niveles de RNA mensajero (RNAm) de los distintos genes analizados por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), en estado indiferenciado y a lo largo de los distintos procesos de diferenciación. Además, analizamos la expresión de *Myst4* en información disponible en bases de datos de varios protocolos de diferenciación de CMP estudiados por RNA-seq o mediante análisis de expresión por microarrays.

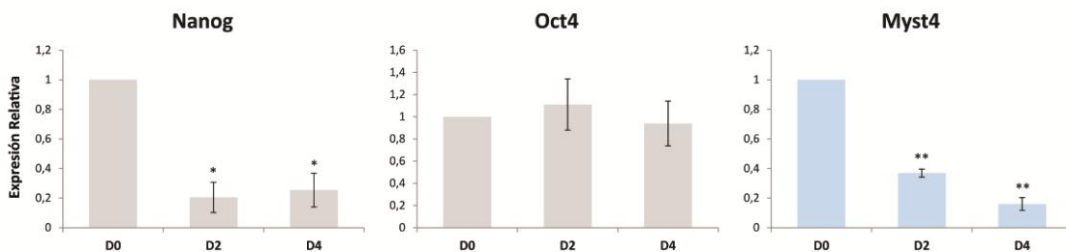
### **3.2.1. Diferenciación no dirigida 1: protocolo en adherencia y ausencia de LIF y 2i**

En primer lugar, realizamos el protocolo de diferenciación no dirigido en adherencia que consiste en el cultivo de las células adheridas a la placa cubierta con gelatina, pero en condiciones de diferenciación, en un medio de cultivo en ausencia de LIF y 2i. Realizamos este protocolo en las líneas de CME W4, 46C y R1. Como mencionamos anteriormente, LIF y 2i se adicionan al medio de cultivo de CME para mantenerlas en estado indiferenciado, y por lo tanto su ausencia produce diferenciación de las células. Esta diferenciación se define como "no dirigida" porque no se dirige hacia un tipo celular específico sino que lo que se induce es la salida del estado indiferenciado y las células pueden diferenciarse hacia diferentes linajes, por lo que se espera variabilidad en los tipos celulares obtenidos. Los protocolos no dirigidos son muy útiles cuando se quiere evaluar la pluripotencia y cuando se busca estudiar genes relevantes para el mantenimiento del estado indiferenciado o para el inicio de la diferenciación. Un protocolo dirigido, en cambio, permite estudiar específicamente la diferenciación hacia un tipo celular, pero no permite el análisis de procesos generales.

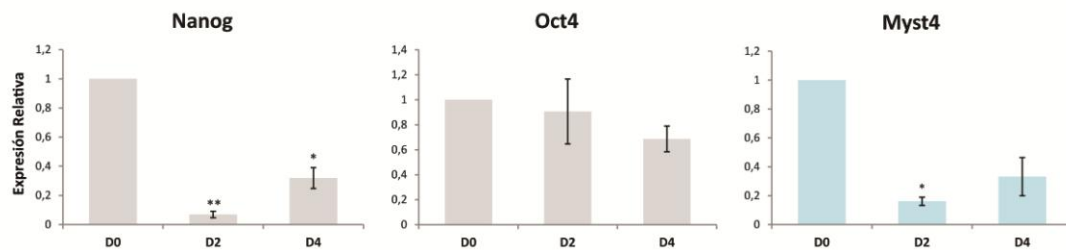


Al medir la expresión génica, observamos en todos los casos la disminución en la expresión del FT Nanog a día 2 y 4 de iniciado el protocolo, confirmando la eficiencia de la diferenciación, dado que es uno de los primeros marcadores de pluripotencia que se reprime al salir del estado indiferenciado (Figura 3-4). De acuerdo al análisis del perfil de expresión, *Myst4* mostró en todos los casos una represión marcada a lo largo de la diferenciación. Se observó que disminuyó significativamente su expresión a día 2 de iniciado el protocolo y se mantiene en bajos niveles a día 4, en todas las líneas de CME analizadas. Por otro lado, no se observó una disminución en la expresión de *Oct4*, lo cual es consistente con que su expresión suele disminuir a días más tardíos de la diferenciación.

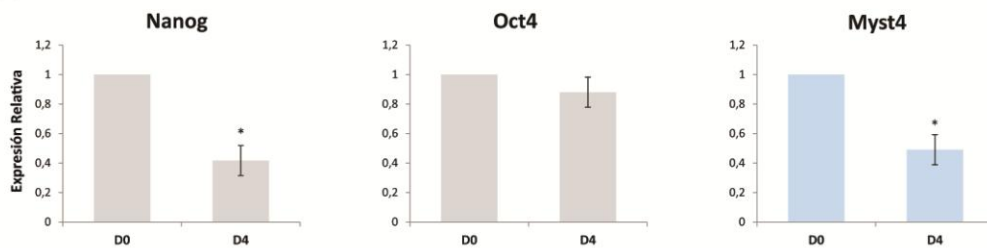
#### W4



#### 46C



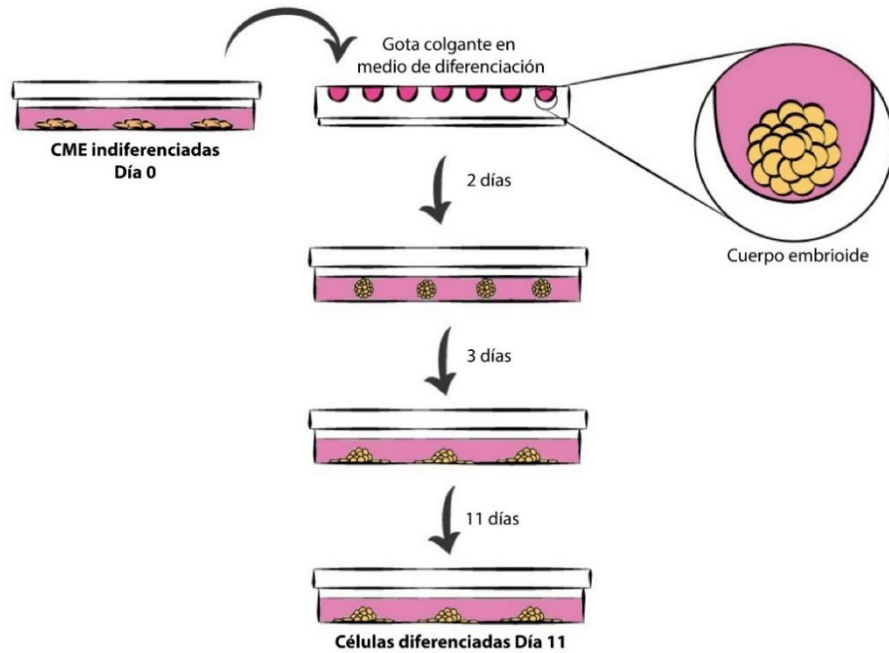
#### R1



**Figura 3-4. *Myst4* se expresa en CME indiferenciadas y se reprime a lo largo de la diferenciación por ausencia de LIF y 2i.** Las líneas de CME W4, 46C, y R1 fueron sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigida en adherencia. El RNA fue tomado al día 0 (estado indiferenciado) y a los días 2 y/o 4 del protocolo de diferenciación. El nivel de expresión de los distintos genes fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a *Gapdh* para el caso de las líneas W4 y R1, y a la media geométrica entre *Gapdh* y *Pgk1* para la línea 46C, y luego relativizados al día 0. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

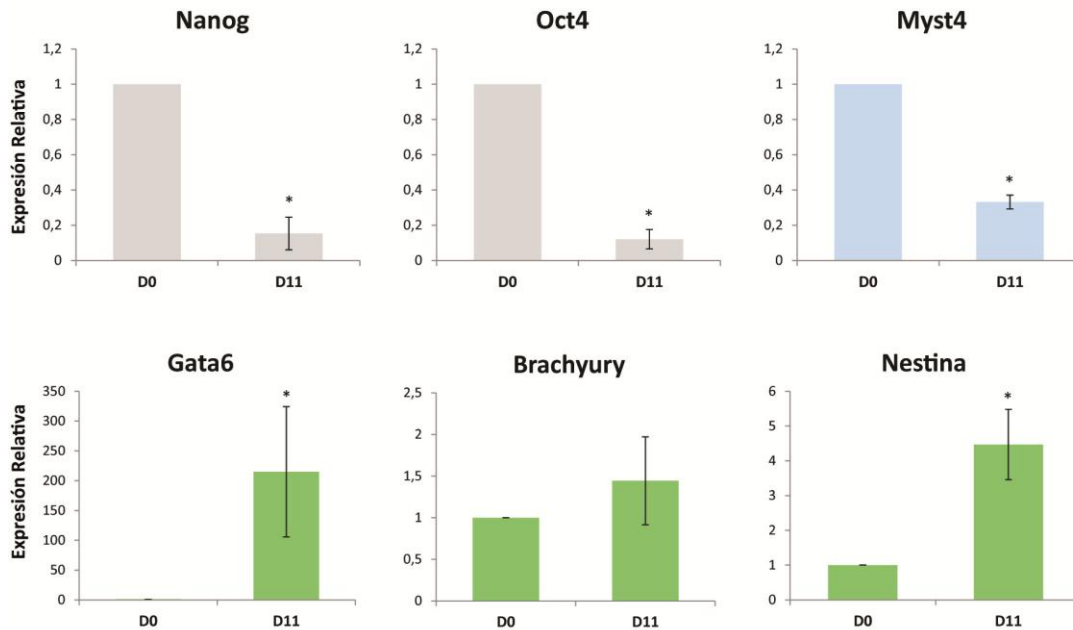
### **3.2.2. Diferenciación no dirigida 2: Hanging Drop**

La segunda diferenciación no dirigida se realizó en la línea W4 mediante la técnica de gota colgante (*Hanging Drop*). Esta técnica consiste en cultivar las células en una gota colgante con medio de diferenciación sin LIF por 3 días para lograr que, por acción de la gravedad, las células se posicionen en la base de la gota y de esta manera se generen agregados de células llamados cuerpos embrioides. Luego, se cultivan los cuerpos embrioides en suspensión por otros 3 días y posteriormente en adherencia por un período de tiempo variable, que en nuestro caso fue de hasta 11 días (Figura 3-5). Se tomaron muestras de RNA en el estado indiferenciado (D0) y en el punto final a día 11 (D11). En este protocolo se espera que en el punto final se encuentren células diferenciadas representantes de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).



**Figura 3-5. Esquema del protocolo de diferenciación de CME por gota colgante (*Hanging Drop*).** Las células se mantienen en adherencia y luego se cultivan en medio de diferenciación en suspensión en gotas de 25  $\mu$ l por 2 días. Posteriormente, se cultivan los cuerpos embrioides formados en suspensión por 3 días y luego en adherencia por 11 días.

Observamos la represión esperada de los marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4, y el aumento de los marcadores de diferenciación Gata6, Brachyury y Nestina, representantes de las capas embrionarias endodermo, mesodermo y ectodermo respectivamente (Figura 3-6). De esta manera, confirmamos la eficiencia de este protocolo no dirigido, ya que por un lado disminuyeron los marcadores de pluripotencia y, por otra parte, encontramos la diversidad esperada de tipos celulares en la misma placa de células diferenciadas. Por su parte, la expresión de *Myst4* fue alta en el estado indiferenciado y disminuyó significativamente en las células diferenciadas.



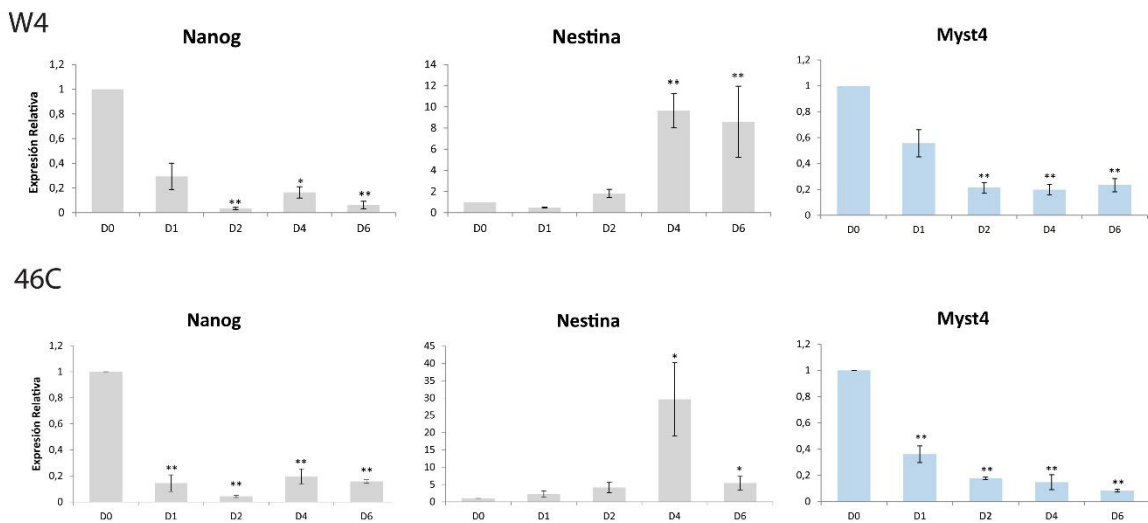
**Figura 3-6. *Myst4* se expresa en CME indiferenciadas y se reprime a día 11 de la diferenciación *Hanging Drop*.** La línea de CME W4 fue sometida a un protocolo de diferenciación no dirigido por gota colgante (*Hanging Drop*). El RNA fue tomado al día 0 (estado indiferenciado) y al día 11 del protocolo de diferenciación. El nivel de expresión de los distintos genes fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a la media geométrica entre *Gapdh* y *Pgk1*, y relativizados al día 0. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$

### 3.2.3. Diferenciación dirigida a progenitor neural

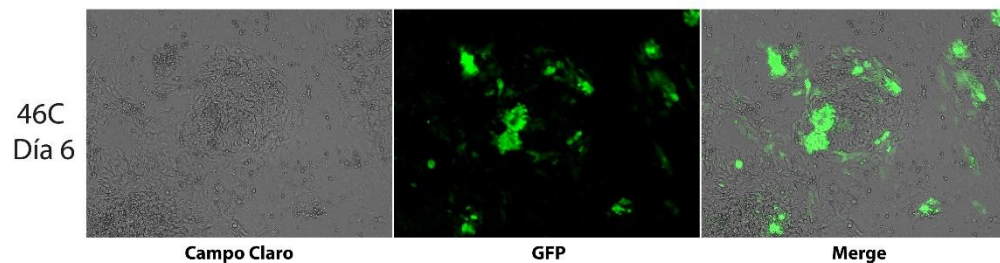
Por último, realizamos un protocolo de diferenciación dirigido hacia progenitor neural en las líneas W4 y 46C, el cual fue desarrollado por Abranches E. y colaboradores (Abranches *et al.*, 2009) y recapitula con alta fidelidad los eventos ocurridos durante el desarrollo. La línea 46C tiene la ventaja de poseer en el genoma una construcción reportera con el promotor de *Sox1* dirigiendo la expresión de la proteína fluorescente GFP (Ying *et al.*, 2003). *Sox1* es un FT que se expresa normalmente en progenitores neurales, por lo cual la expresión de GFP en esta línea celular es reportera de diferenciación hacia este tipo celular y una herramienta muy útil para evaluar su eficiencia. Este protocolo, que

se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos, se realiza de manera adherente con un medio definido sin suero y sin realizar el pasaje de las células por 6 días. Este medio contiene ácido retinoico que favorece la diferenciación neural. Se tomaron muestras de RNA en el estado indiferenciado (D0) y en los días 1, 2, 4, y 6 de iniciado el protocolo. Observamos la disminución del marcador de pluripotencia Nanog y el aumento del marcador de progenitor neural Nestina a día 4 y 6, comprobando la eficiencia del protocolo (Figura 3-7 A). Esto también se evidenció en la línea 46C al observar mediante microscopía de fluorescencia la expresión de GFP dirigida por el promotor de Sox1 (Figura 3-7 B). Al medir el patrón de expresión de *Myst4*, observamos que disminuyó significativamente a días tempranos y se mantuvo en bajos niveles a lo largo del protocolo de diferenciación en ambas líneas celulares.

## A.



## B.



**Figura 3-7. *Myst4* se expresa en CME indiferenciadas y se reprime a lo largo de la diferenciación a progenitor neural.** Las líneas de CME W4 y 46C fueron sometidas a un protocolo de diferenciación dirigida hacia progenitor neural. **A.** El RNA fue tomado al día 0 (estado indiferenciado) y a los días 1, 2, 4 y 6 del protocolo de diferenciación. El nivel de expresión de los distintos genes fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a *Gapdh* y relativizados al día 0. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. **\*\*p<0.01\* p<0.05** **B.** Imágenes de día 6 de diferenciación de la línea 46C en campo claro, GFP y superposición de ambas imágenes (Merge).

### 3.2.4. Análisis de expresión de *Myst4* en diferenciaciones de CME en bibliografía

En los últimos años, como consecuencia de los trabajos de investigación a escala global (*high-throughput o genome-wide*), se genera de manera permanente gran cantidad de información disponible en bases de datos de libre acceso, que resulta de suma utilidad para ser analizada de acuerdo al propósito de cada investigador. Múltiples laboratorios que utilizan CMP como modelo de estudio y realizan diferentes protocolos de diferenciación *in vitro* y análisis de expresión génica a gran escala para estudiar distintos aspectos de la biología de estas células, depositaron esa información en las mencionadas bases de datos. En este trabajo de tesis, luego de observar los resultados obtenidos en nuestras líneas celulares, analizamos la expresión de *Myst4* en información disponible en bases de datos de varios protocolos de diferenciación de CMP estudiados por RNA-seq o mediante análisis de expresión por microarrays (Figura 3-8). Consideramos que la información proveniente de este análisis complementaría nuestros resultados considerando la variabilidad que presentan los distintos protocolos y tipos celulares, además de la variabilidad intrínseca por el solo hecho de haber sido generados en distintos laboratorios.

Trabajo	Línea de CMP	Abordaje	Tipo de diferenciación	Expresión relativa al estado indiferenciado	p-valor
(Williams <i>et al.</i> , 2016)	CME de ratón	RNA-seq	EpILC	0.388	0,0017

(Wamstad <i>et al.</i> , 2012)	CME de ratón E14	RNA-seq	Diferenciación Cardíaca	0.197	-
(Christodoulou <i>et al.</i> , 2011)	CME de ratón 129/Ola	Microarray	Progenitores de Endodermo Definitivo	0.786	0,0059
(Christodoulou <i>et al.</i> , 2011)	CMPi de ratón	Microarray	Progenitores de Endodermo Definitivo	0.757	0,0006
(Ouyang, Zhou y Wong, 2009)	CME de ratón E14	RNA-seq	Cuerpo Embrioide	0.035	-
(Cloonan <i>et al.</i> , 2008)	CME de ratón W9.5	RNA-seq	Cuerpo Embrioide	0.094	-
(Sene <i>et al.</i> , 2007)	CME de ratón J1	Microarray	Cuerpo Embrioide	0,424	0,0084
(Sene <i>et al.</i> , 2007)	CME de ratón R1	Microarray	Cuerpo Embrioide	0,524	0,025
(Sene <i>et al.</i> , 2007)	CME de ratón V6.5	Microarray	Cuerpo Embrioide	0,312	0,0044
GEO: GDS2905, 2005	CME de ratón J1	Microarray	Cuerpo Embrioide	0,448	0,202

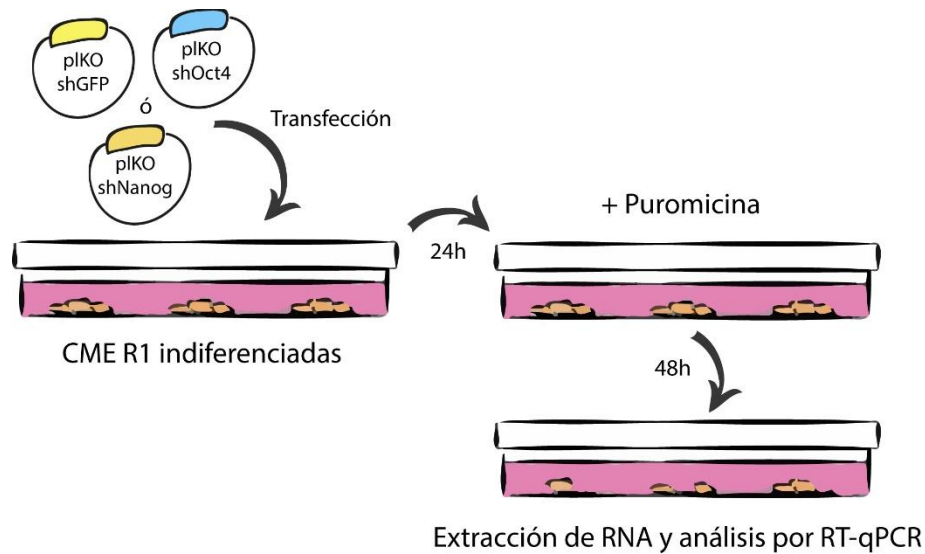
**Figura 3-8. Análisis de la expresión de *Myst4* en datos de RNA-seq o Microarray provenientes de publicaciones que utilizan distintos protocolos de diferenciación de CMP.** En todos los trabajos analizados, que emplearon distintos abordajes y diversas líneas celulares, *Myst4* presentó una expresión disminuida en células diferenciadas con respecto a su contraparte indiferenciada. En los casos donde se reportaron al menos tres réplicas, se analizaron las diferencias en la expresión de *Myst4* utilizando una prueba *t-student*.

*Myst4* mostró en todos los casos altos niveles de mRNA en CMP indiferenciadas y una marcada represión cuando las células salen del estado indiferenciado, evidenciada en distintos protocolos de diferenciación y en diversas líneas de CMP murinas. La expresión de este gen es reprimida aún antes de que disminuya la expresión del FT Oct4, y su patrón de expresión fue similar al del FT Nanog. Estos resultados, junto con el posicionamiento de Nanog y otros FT de CME en la región regulatoria de *Myst4*, sugieren que la expresión de este gen podría ser regulada por estos factores en CMP. Por estas razones, decidimos seguir estudiando la regulación de este gen por los FT clave de células madre.

### 3.3. Regulación de la expresión de *Myst4* por *Oct4* y *Nanog*

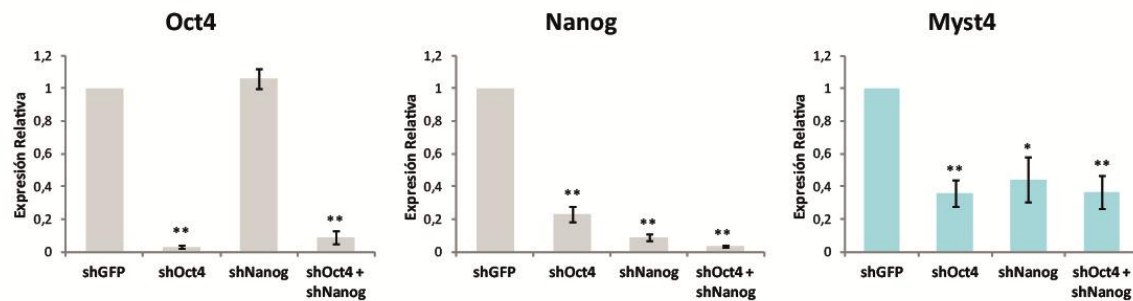
Los análisis de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) sugieren que el FT unido a una región promotora podría regular la expresión del gen asociado, sin embargo, es necesario realizar abordajes complementarios para poder estudiarlo en detalle. Una estrategia ampliamente utilizada para evaluar funcionalmente la regulación de la expresión génica es el silenciamiento del FT en estudio y la posterior evaluación de la expresión del gen blanco putativo. En este trabajo, para estudiar la regulación de *Myst4* por los FT esenciales de CME, decidimos disminuir la expresión de *Oct4* y *Nanog* mediante transfección con *short hairpin* RNA (shRNA) específicos de estos factores. Utilizamos la línea de CME R1 y realizamos un experimento de transfección con los plásmidos pLKO-sh*Nanog*, pLKO-sh*Oct4*, ambos shRNA juntos o el control GFPi, el cual genera un shRNA dirigido a GFP. Estos plásmidos, además de expresar shRNA específicos bajo un promotor constitutivo, expresan un gen que otorga resistencia al antibiótico Puromicina. Realizamos un cambio de medio a las 24 y a las 48 h post-transfección por medio fresco con Puromicina en una concentración final de 3 µg/ml, con el fin de seleccionar aquellas células que hayan sido transfectadas, para evitar la dilución del RNA de las células transfectadas con el de las células sin transfectar. A las 72 h post-transfección extrajimos RNA y analizamos los niveles de expresión de los genes de interés por RT-qPCR (Figura 3-9).





**Figura 3-9. Esquema del protocolo de silenciamiento de Oct4 y/o Nanog en CME por shRNA.** Las células R1 se transfirieron con el plásmido pLKOshNanog, pLKOshOct4, ambos plásmidos juntos o el control pLKOshGFP. A las 24 y 48 h se realizó un cambio de medio agregando Puromicina 3 µg/ml. A las 72 h post-transfección se realizó la extracción de RNA y análisis por RT-qPCR.

Observamos una disminución significativa en los niveles de Oct4 y Nanog cuando las células fueron transfectadas con los shRNA específicos con respecto a los niveles observados en los controles, validando de esta manera el abordaje experimental (Figura 3-10). Cabe destacar que la expresión de Nanog disminuye cuando se silencia Oct4, y contrariamente no se reprime la expresión de Oct4 cuando se silencia Nanog. Esto concuerda con la relación entre estos FT, donde Oct4 regula positivamente la expresión de Nanog, pero Nanog no modula la expresión de Oct4. Estos resultados no sólo demuestran que cada shRNA silenció a su *target*, sino que además encontramos el efecto esperado sobre un gen *target* del factor silenciado, lo cual implica que este abordaje resultó efectivo para observar modulaciones a este nivel. Una vez verificada la funcionalidad del sistema experimental, analizamos la expresión de *Myst4* y observamos que se redujo significativamente en las condiciones en que cualquiera de los dos FT fue silenciado de manera singular o en conjunto. Estos resultados indican que Oct4 y Nanog podrían estar involucrados en la regulación transcripcional de *Myst4*.



**Figura 3-10. El silenciamiento de los FT Oct4 y Nanog produce una disminución en los niveles de mRNA de Myst4.** La línea de CME R1 fue transfectada con distintos vectores que expresan shRNA para el silenciamiento de Oct4, Nanog, y GFP (control). A las 24 y a las 48 h post-transfección se realizó la selección de las células transfectadas con Puromicina. A las 72 h se tomó el RNA para analizar la expresión de los distintos genes por RT-qPCR. Los valores fueron normalizados con los niveles de Gapdh y relativizados al control GFPi. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

### 3.4. Conclusiones

En este capítulo estudiamos el patrón de expresión de Myst4 en diferentes protocolos de diferenciación, tanto dirigidos como no dirigidos, y encontramos una alta expresión en estado indiferenciado y represión en la diferenciación, de manera coincidente con los resultados de análisis a escala global reportados en bases de datos. Por otra parte, la correlación observada entre la cinética de expresión de Myst4 con Nanog y los datos de ChIP-seq nos llevaron a estudiar la regulación de Myst4 por los FT de CMP y encontramos que tanto el silenciamiento de Oct4 como de Nanog produjeron disminución del mRNA de Myst4. Dado que el silenciamiento de Oct4 también produce

una disminución en la expresión de Nanog, es posible que el efecto de represión del mRNA de *Myst4* se deba sólo a la disminución de Nanog, y no ocurra una regulación directa por parte de Oct4. Estos resultados sugieren que los FT clave de CMP podrían regular la expresión de *Myst4*, produciendo una alta expresión en estado indiferenciado, y una represión al salir del estado pluripotente, junto con la disminución en los niveles de los FT. Esta regulación podría implicar que *Myst4* cumple una función en CMP, sin embargo, aún no se estudió la relevancia de este remodelador en este tipo de células.

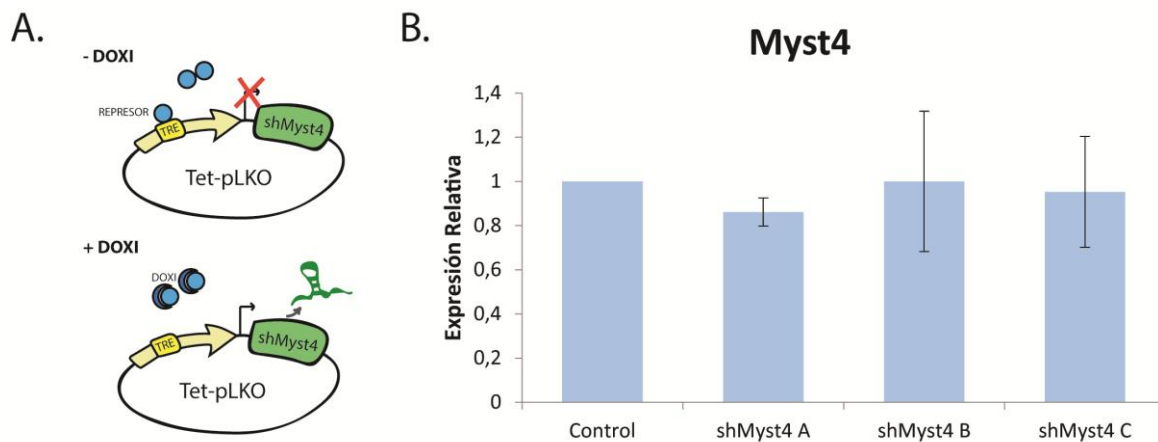
## 4. RESULTADOS II: Relevancia de *Myst4* en células madre embrionarias

En el capítulo anterior presentamos evidencias que indican que los FT clave de CMP podrían regular positivamente la expresión de *Myst4*. Asimismo reportamos que este gen se expresa en CME en estado indiferenciado y su expresión disminuye durante la diferenciación. Estas evidencias nos condujeron a especular que *Myst4* podría ser relevante en este tipo de células pluripotentes. En este capítulo, estudiamos la relevancia de este remodelador en CME. Para esto, decidimos realizar un abordaje de silenciamiento de *Myst4* y estudiar su efecto sobre la pluripotencia y la diferenciación.

Los RNA de interferencia son centrales en un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos ejercido por pequeños RNA que son complementarios a un mRNA y conducen habitualmente a su degradación. Esta estrategia permite evaluar diferencias de fenotipo entre células *wild type* y células con bajos niveles de mRNA específicos y su consecuente expresión proteica disminuida, y se atribuyen las diferencias encontradas a funciones que posee dicha proteína. Una de las técnicas de silenciamiento por RNA de interferencia más utilizadas es la de transducción de las células con vectores conteniendo secuencias para la generación de moléculas de *short hairpin RNA* (shRNA).

En un principio, diseñamos y clonamos tres shRNA dirigidos al mRNA de *Myst4* en el vector de expresión TET-pLKO (Addgene) y realizamos líneas estables de CME mediante transducción lentiviral, cada una con un único vector correspondiente a un shRNA diferente. Este plásmido empaquetado en partículas lentivirales transduce a las células, se inserta en el genoma y permite la transcripción del shRNA mediante la activación del promotor TET-ON en presencia de Doxiciclina (DOXI) (Figura 4-1 A). En esta estrategia se utilizan varios shRNA distintos dado que se espera encontrar distinta capacidad de silenciamiento por parte de cada shRNA, y se busca encontrar el óptimo, es decir, el que

produzca mayor efecto. Sin embargo, al analizar la expresión del mRNA de *Myst4* en las diferentes líneas estables en presencia de DOXI, observamos que ninguno de los shRNA produjo una disminución significativa en la expresión de *Myst4* con respecto al control (Figura 4-1 B). Por esta razón, no pudimos utilizar la estrategia de silenciamiento por shRNA para disminuir la expresión de este gen.



**Figura 4-1. Estrategia de silenciamiento de *Myst4* por shRNA en CME.** **A.** Esquema del mecanismo de acción del sistema Tet-pLKO. En presencia de DOXI, ésta se une al represor y permite la activación del promotor y la expresión del shRNA. **B.** Niveles de mRNA de *Myst4* en las diferentes líneas estables, en presencia de DOXI. Los valores fueron normalizados con los niveles de *Gapdh* y relativizados al control (línea celular parental). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes.

En los últimos años, comenzó a utilizarse la estrategia de CRISPR/Cas9 para realizar la anulación (*knockout*) de genes de una manera más rápida y simple con respecto a las técnicas utilizadas previamente para la edición génica (Ran *et al.*, 2013). A continuación explicaremos el funcionamiento de este abordaje, el cual utilizamos para realizar un *knockout* del gen *Myst4* y posteriormente evaluar su efecto en CME.

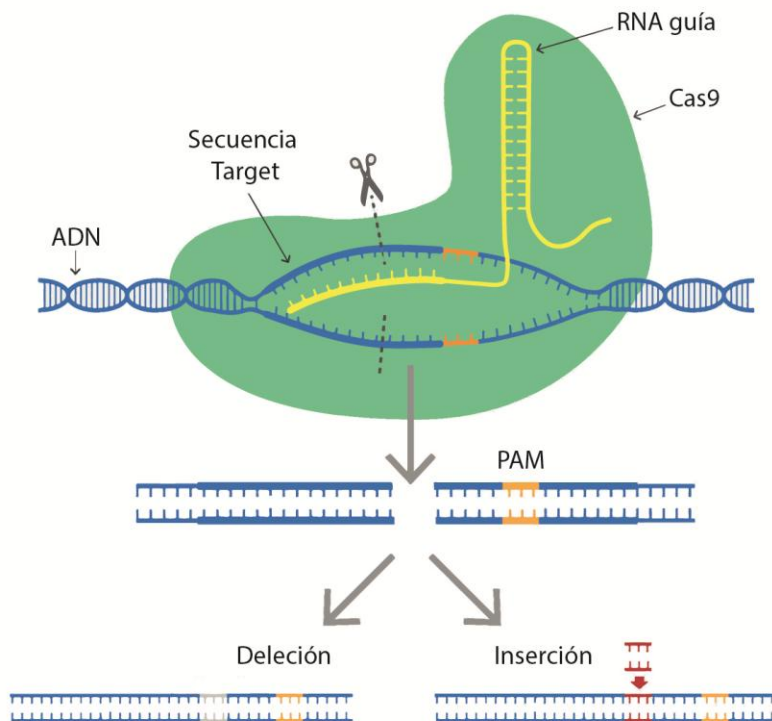
#### 4.1. Generación de construcciones conteniendo diferentes sgRNA para la obtención de líneas estables *knockout* para el gen *Myst4* utilizando CRISPR/Cas9

Dado que el silenciamiento de *Myst4* por shRNA no resultó exitoso, debimos utilizar abordajes alternativos para silenciar o anular este gen. La generación de líneas *knockout* tiene sus ventajas en comparación al silenciamiento por shRNA. En primer lugar, el shRNA actúa a nivel post-transcripcional y produce la degradación del mRNA *target*. Sin embargo, suelen mantenerse mínimos niveles del mRNA que pueden traducirse y generar una proteína funcional. En cambio, la generación de líneas *knockout* por edición génica produce la anulación total de la expresión de la proteína. De esta manera, no hay interferencia de expresión residual en los efectos encontrados.

La edición del DNA para la anulación de un gen puede generarse tanto por delección parcial o total del gen o de la región de inicio de la transcripción, como por inserciones o deleciones en la región codificante del gen que generen un cambio en el marco de lectura del mRNA y un codón stop prematuro. Las técnicas utilizadas previamente para la edición génica (Proteínas *Zinc Finger* y TALENs, fundamentalmente) solían involucrar la generación de proteínas específicas para cada DNA *target*, lo cual era un procedimiento complicado y costoso (Christian *et al.*, 2010; Sander, Dahlborg y Goodwin, 2010; F. Zhang *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2012). El sistema CRISPR/Cas9 revolucionó el campo de la ingeniería genética por ser mucho más eficiente, simple y económico. Por estas razones, decidimos realizar un *knockout* del gen endógeno de *Myst4* utilizando la estrategia de CRISPR/Cas9.

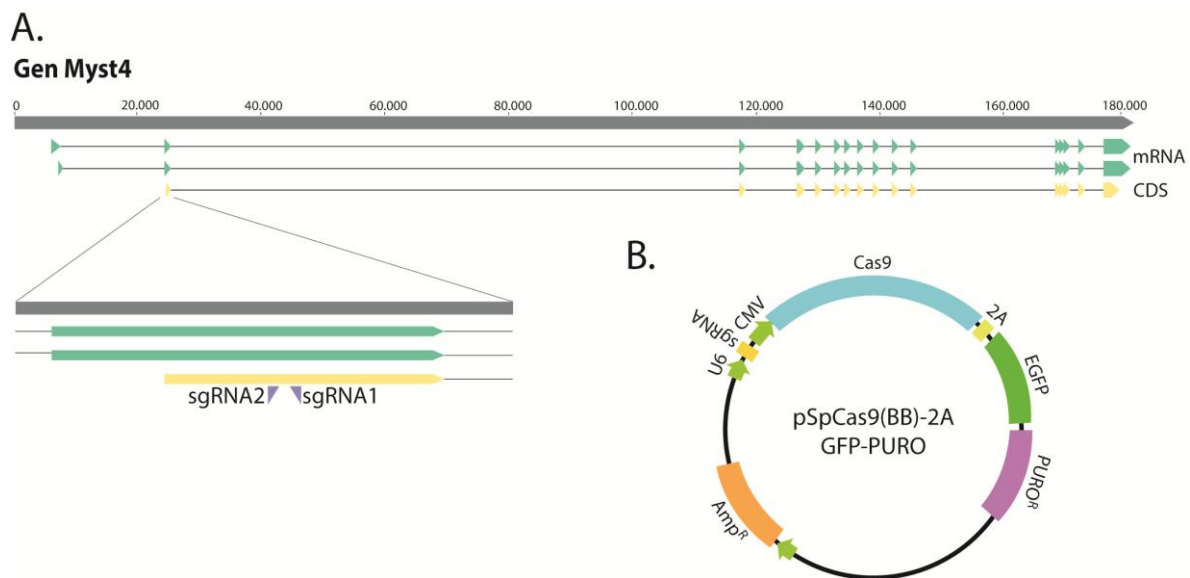
Este sistema se encuentra naturalmente en bacterias como mecanismo de defensa ante virus y fue adaptado para la edición del DNA. Consiste en una nucleasa (Cas9) que realiza cortes en ambas cadenas del DNA, y utiliza un RNA guía (sgRNA), cuya secuencia es complementaria a la del sitio de corte, para el reconocimiento de su blanco (*target*). De esta manera, se pueden diseñar distintos sgRNA para dirigir a Cas9 hacia la región de interés en el genoma. La secuencia *target* debe ser acompañada por una secuencia de tres

nucleótidos llamada PAM, la cual es reconocida por la Cas9 (Ran *et al.*, 2013; Terns y Terns, 2014). Una vez realizado el corte doble cadena, la célula activa el mecanismo de respuesta ante este tipo de estrés, reparando el daño al DNA. Esta reparación no suele ser perfecta, y pueden generarse inserciones o deleciones de pequeños fragmentos de DNA (Indels) en el sitio de corte (Figura 4-2). Estas Indels, si se encuentran próximas al codón de inicio de la traducción, pueden generar un cambio en el marco de lectura del mensajero, el cual puede producir un codón stop prematuro. De esta manera, el gen deja de codificar para la proteína original, ésta no se produce, por lo que se genera un *knockout* del gen de interés.



**Figura 4-2. Esquema del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9.** La nucleasa Cas9 cargada con un RNA guía realiza un corte doble cadena en una región del DNA complementaria a la secuencia del RNA guía. Este corte es reparado por el sistema de defensa contra daño al DNA de la célula, el cual generalmente produce inserciones o deleciones de fragmentos de DNA en el sitio de corte. Adaptado de imagen de Javier Zarracina ([www.vox.com](http://www.vox.com)).

Diseñamos dos sgRNA distintos utilizando la herramienta *CRISPR design* (<http://crispr.mit.edu/>) para direccionar a la nucleasa Cas9 hacia el primer exón codificante del gen de *Myst4*, en una región próxima al codón de inicio de la traducción del mRNA (Figura 4-3 A). Estos sgRNA fueron seleccionados por poseer una secuencia con la menor probabilidad de unirse a otras regiones del genoma (*off target*). Luego, realizamos el clonado de los sgRNA en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP, que permite la expresión transitoria del sgRNA y de la proteína Cas9. Además, se encuentra modificado para expresar tanto la proteína GFP como un gen de resistencia a Puromicina para la visualización y selección de las células transfectadas, respectivamente (pSpCas9(BB)-2A-GFP-PURO (Figura 4-3 B).



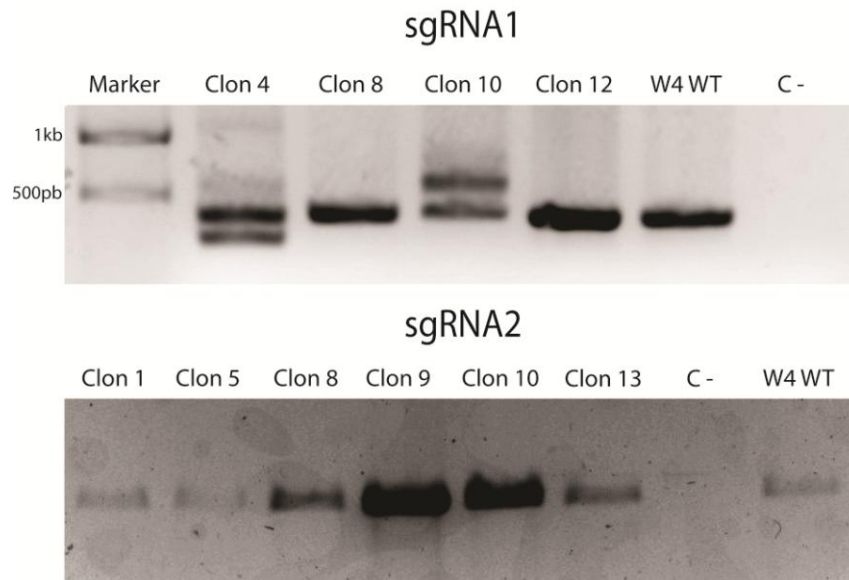
**Figura 4-3. Diseño y donado de sgRNA para realizar *knockout* para el gen *Myst4* utilizando CRISPR/Cas9. A.** Se diseñaron dos sgRNA (sgRNA1, sgRNA2) utilizando la herramienta *CRISPR design* (<http://crispr.mit.edu/>) para direccionar a Cas9 al primer exón codificante del gen *Myst4*. En color gris se muestra el gen de *Myst4*, en verde los mRNA y en amarillo la región codificante (CDS). Las puntas de flecha de color violeta muestran los sitios hacia los que están dirigidos los sgRNA 1 y 2, próximos al codón de inicio de la traducción del mRNA. **B.** Vector pSpCas9(BB)-2A-GFP-PURO. Este plásmido permite la producción del sgRNA y además la expresión de la nucleasa Cas9, de GFP y del gen de resistencia a Puromicina.



## 4.2. Establecimiento de líneas estables de CME en base a las construcciones obtenidas

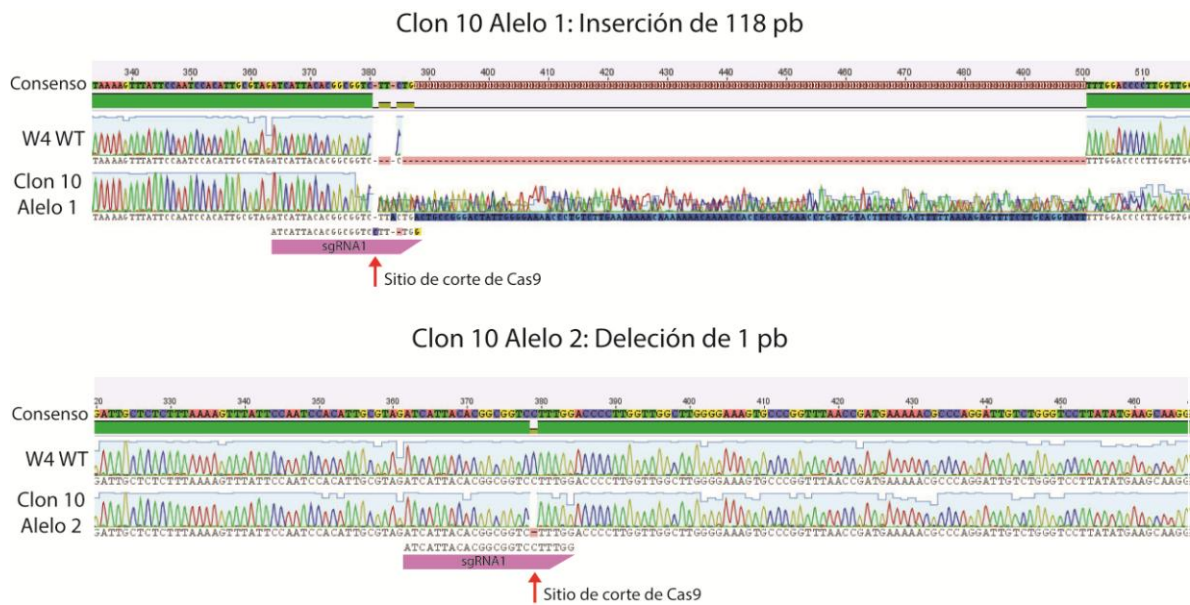
Logramos establecer líneas estables mediante la transfección de los plásmidos pSpCas9(BB)-2A-GFP-sgRNA 1 y 2 en CME de la línea W4, seleccionando las células transfectadas con Puromicina. Mediante microscopía de fluorescencia confirmamos que las células resistentes a la selección también expresaban la proteína fluorescente GFP. Posteriormente, seleccionamos clones individuales para analizar las posibles modificaciones en el gen de *Myst4* obtenidas en cada caso. Cabe destacar que, al ser una transfección transitoria, el plásmido no se integra al genoma de las células, sino que eventualmente se pierde. Esto fue comprobado por la pérdida de la fluorescencia de los clones al transcurrir los días de cultivo.

Para evaluar, en primer lugar, si el gen de *Myst4* fue modificado en ambos cromosomas homólogos, por inserciones o deleciones, diseñamos primers que flanquean las regiones *target* de los sgRNA, y que generan un producto de PCR de 461 pb en el gen *wild type*. Amplificamos con éstos el DNA genómico de cada uno de los clones y analizamos el producto de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa para observar el tamaño de las bandas obtenidas (Figura 4-5). Como control se utilizó la amplificación del DNA genómico de la línea W4 *wild type* (W4 WT). Observamos que el sgRNA2 no produjo inserciones o deleciones visibles a este nivel de resolución. El sgRNA1, en cambio, sí generó Indels en varios de los clones analizados. En el clon 4 se observa una banda por debajo del tamaño de la *wild type*, lo cual indica que habría una deleción, y el clon 10 posee una banda a la altura de la *wild type* y otra por arriba, lo cual indica una posible inserción. La presencia de dos bandas en este gel revela el producto de PCR de los dos cromosomas homólogos que contienen este gen, cada uno con distintas modificaciones independientes.



**Figura 4-4 Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de PCR de los clones modificados por CRISPR/Cas9.** Se realizó una amplificación por PCR utilizando primers que flanquean la zona de reconocimiento de los sgRNA en el gen *Myst4*. Como molde se utilizó DNA genómico de la línea *wild type* (wt) y de los distintos clones del sgRNA1 (4, 8, 10 y 12) y del sgRNA2 (1, 5, 8, 9, 10 y 13). El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1%.

El siguiente paso fue purificar las distintas bandas del gel de agarosa que representan a los distintos productos de PCR de cada alelo para cada clon, y enviarlos a secuenciar para determinar las Indels generadas. Una vez obtenidas las secuencias, realizamos el alineamiento del resultado de la secuenciación de cada alelo con el de la línea W4 WT utilizando el programa Geneious versión 6 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). El clon 10 fue el único que presentó Indels en los dos alelos del gen. Se observó una inserción de 118 pb en uno de los dos cromosomas (Figura 4-5, Alelo 1), y una delección de 1 pb en el otro (Figura 4-5, Alelo 2). Ambas modificaciones cambian el marco de lectura del mRNA y producen un codón stop prematuro. De esta manera, el gen se transcribe dando lugar al mRNA, pero la proteína *Myst4* original no podría producirse a partir de éste.



**Figura 4-5. Alineamiento de secuencias del producto de secuenciación de W4 WT y ambos alelos del Clon 10.** Se realizó una amplificación por PCR de ambas copias para cada clon utilizando primers que flanquean la zona de pegado de los sgRNA en el gen *Myst4* y se enviaron a secuenciar los productos obtenidos. Las secuencias de los dos alelos del Clon 10 se alinearon con la secuencia W4 WT y se evaluaron las Indels obtenidas. El alelo 1 posee una inserción de 118 pb y el alelo 2 una delección de 1 pb.

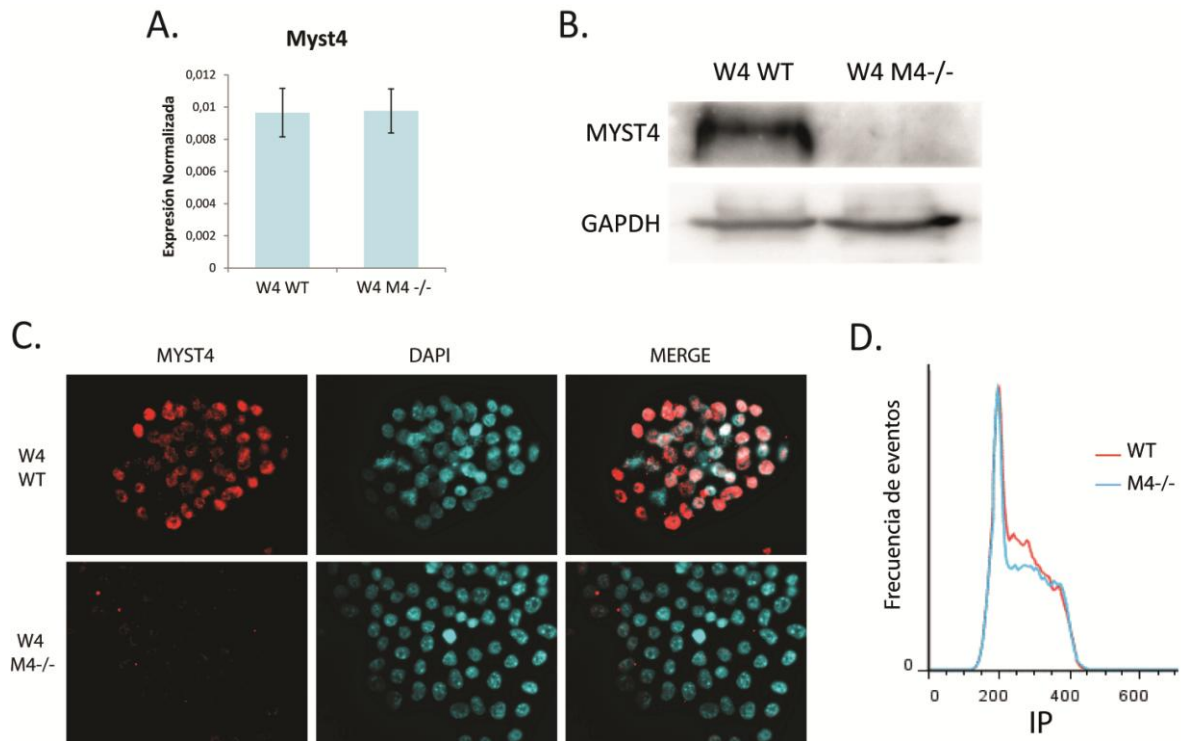
Logramos obtener un clon donde ambos alelos presentan mutaciones que producen un codón stop prematuro. Observamos en el gel de agarosa que el tamaño de uno de los alelos era indistinguible al observado en la línea W4 WT, pero al secuenciarlo evidenciamos una delección de 1pb. Esto mismo pudo haber sucedido con los clones del sgRNA2 que en principio decidimos no utilizar. Si bien siempre fuimos conscientes de que este método de *screening* no nos permitía detectar Indels de pequeño tamaño, sabemos que es posible que posean mutaciones detectables mediante secuenciación. Dado que obtuvimos una línea con ambos alelos mutados no profundizamos el análisis de estos clones, pero no descartamos evaluarlos en un futuro.

Al medir la expresión del mRNA de *Myst4* en el clon 10 por RT-qPCR, observamos que ésta no se redujo significativamente (Figura 4-6 A). Un mRNA con codón stop

premature podría degradarse mediante *Nonsense Mediated Decay* (NMD), un mecanismo celular que detecta estas mutaciones terminadoras y degrada el mRNA, evitando la expresión de proteínas truncadas. Sin embargo, no sucede en este caso, lo cual no implica que el mRNA se traduzca correctamente. Mediante la técnica de Western blot, estudiamos los niveles proteicos de Myst4 en el clon 10 con un anticuerpo específico (Figura 4-6 B). Observamos efectivamente que este clon no expresa la proteína Myst4, confirmando la obtención de la línea W4 *knockout* para el gen Myst4 endógeno (W4 M4 -/-).

Por otro lado, existe la posibilidad de que el mRNA mutado inicie su traducción por otro codón AUG que codifica para una metionina interna y no es utilizado como codón de iniciación en el mRNA *wild type*, produciendo una proteína de menor tamaño sin la región amino-terminal que se encuentra en la versión *wild type*. El mRNA de Myst4, que posee una gran longitud, codifica para múltiples metioninas, por lo que diversos AUG podrían ser utilizados como codón de iniciación manteniendo el marco de lectura. El anticuerpo utilizado para el Western es policlonal y reconoce una región del extremo carboxi-terminal de la proteína, con lo cual podría reconocer isoformas más cortas. Sin embargo, no observamos bandas de menor tamaño en el western de la línea W4 M4-/-, por lo cual confirmamos que el mRNA de Myst4 no se traduce en esta línea. Además, realizamos un análisis de inmunofluorescencia con el mismo anticuerpo utilizado en el Western Blot para complementar los resultados del análisis de niveles proteicos de Myst4 en la línea W4 M4 -/-. En la línea W4 WT detectamos la expresión de Myst4 y observamos que su localización es nuclear, lo cual era esperado por su actividad en el núcleo como remodelador de la cromatina (Figura 4-6C). Cabe destacar que, según nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta la localización nuclear de Myst4 detectada por inmunofluorescencia. Al observar la inmunomarcación en la línea W4 M4-/-, no evidenciamos una señal específica, confirmando la ausencia de Myst4 en estas células. Utilizamos células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario como control de autofluorescencia y observamos los mismos niveles que los obtenidos en la línea mutante. Por último, mediante tinción con yoduro de propidio estudiamos la distribución de fases del ciclo

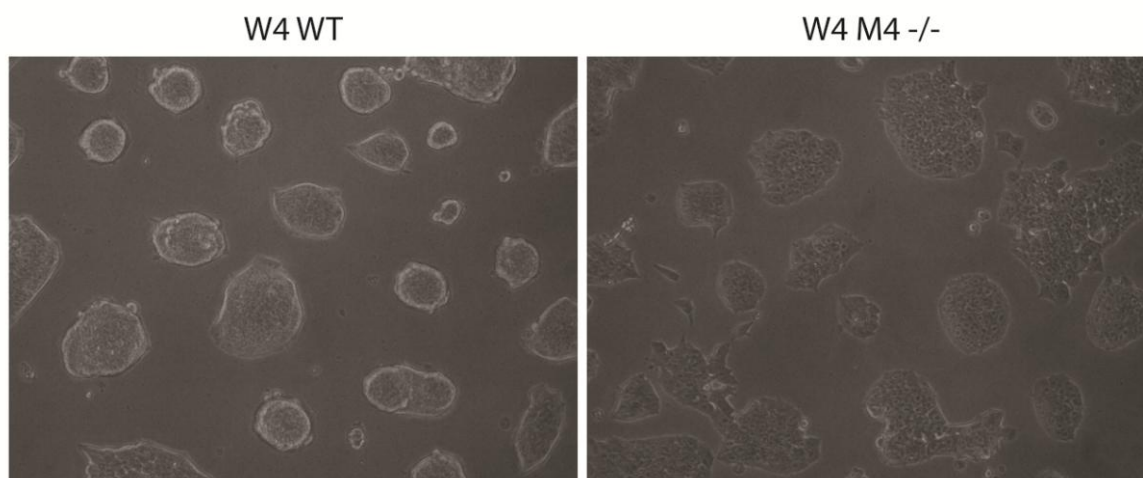
celular de la línea W4 M4  $-/-$ . Observamos que ésta presenta una distribución similar a la de la línea W4 WT, indicando que la mutación no produjo alteraciones en el ciclo celular que podrían interferir con nuestro estudio posterior (Figura 4-6D).



**Figura 4-6. Análisis de expresión de *Myst4* y del ciclo celular de la línea modificada por CRISPR/Cas9, W4 M4 $-/-$ .** **A.** Análisis de los niveles del mRNA de *Myst4* en el Clon 10 por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados con los niveles de *Gapdh* y se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. **B.** Western Blot con un anticuerpo específico contra *Myst4* (MORF sc-5720) para el análisis de los niveles proteicos en la línea W4 WT y W4 M4 $-/-$ . Se utilizó *Gapdh* como control de carga. **C.** Imagen representativa de inmunofluorescencia en las líneas W4 WT y M4 $-/-$ , utilizando un anticuerpo específico contra *Myst4* (MORF sc-5720). Se muestra en rojo la marca para la proteína *Myst4*, en azul la cromatina teñida con DAPI y la superposición de ambas imágenes (MERGE). **D.** Análisis por citometría de células W4 WT y M4 $-/-$  con marcación con Ioduro de Propidio. En rojo se muestra la curva obtenida en la línea W4 WT y en la línea W4 M4 $-/-$ .

### 4.3. Efecto de la ausencia de *Myst4* sobre el mantenimiento del estado indiferenciado de CME

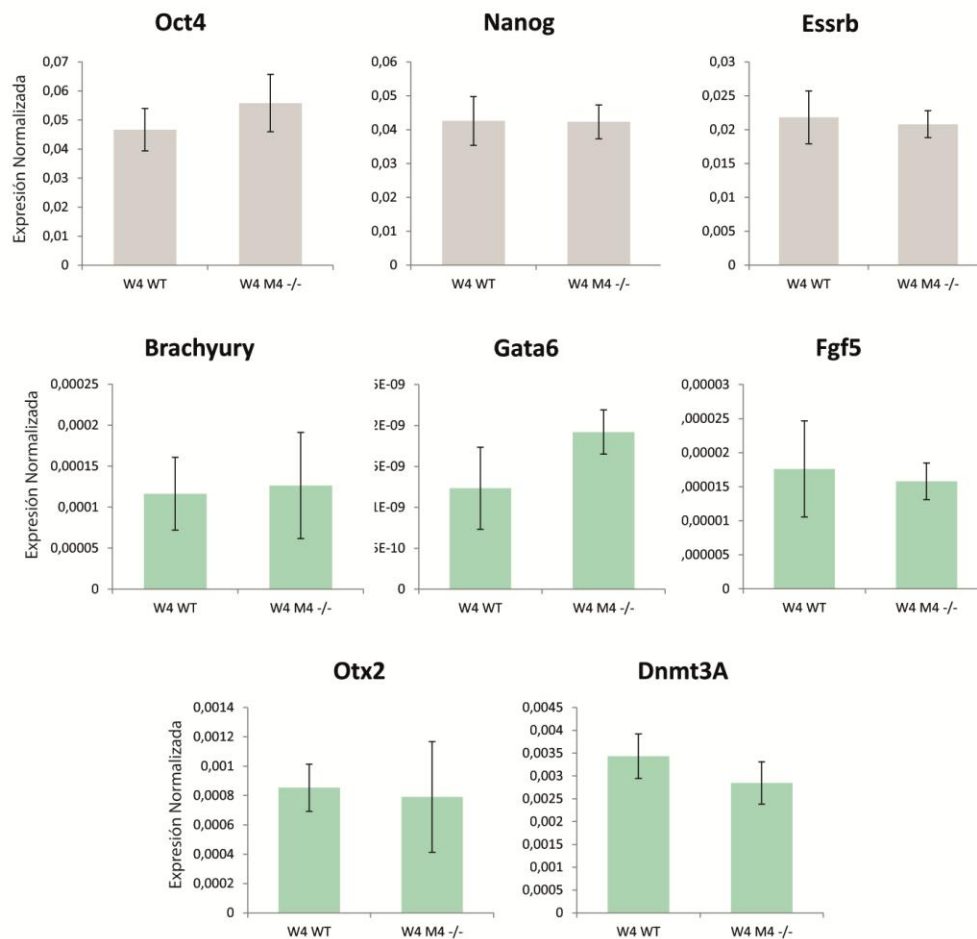
Una vez obtenida y validada la línea de CME *knockout* para *Myst4*, nuestro primer objetivo fue analizar el efecto de la ausencia de *Myst4* en el estado indiferenciado de las CME W4. Para esto, en primer lugar, estudiamos su morfología observando las células en un microscopio invertido de campo claro y notamos una diferencia de morfología en la línea mutante con respecto a la línea W4 WT, siendo las mutantes más planas y menos refringentes (Figura 4-7). Una morfología más plana podría indicar una salida del estado indiferenciado, por lo cual continuamos nuestro análisis midiendo los niveles de marcadores de pluripotencia y diferenciación temprana.



**Figura 4-7. Morfología de las líneas W4 WT y W4 M4 -/-.** Imágenes de campo claro de colonias de las líneas W4 WT Y W4 M4 -/-. Se observa que la línea mutante presenta una morfología más plana y menos refringente.

Analizamos la expresión a nivel de mRNA por RT-qPCR de los marcadores de pluripotencia *Nanog*, *Oct4* y *Essrb* y de los marcadores de diferenciación temprana *Brachyury*, *Gata6*, *Fgf5*, *Otx2* y *Dnmt3A*. Como se muestra en la Figura 4-8, no observamos diferencias significativas en la expresión de estos marcadores en la línea *knockout* con respecto a la línea WT en el estado indiferenciado (Figura 4-8). Estos resultados sugieren

que las células continúan siendo pluripotentes y no comenzaron un proceso de diferenciación por la ausencia de *Myst4*. Sin embargo, se sabe que los niveles de mRNA, si bien son un parámetro necesario de ser analizado, no definen la funcionalidad de las proteínas en estudio.

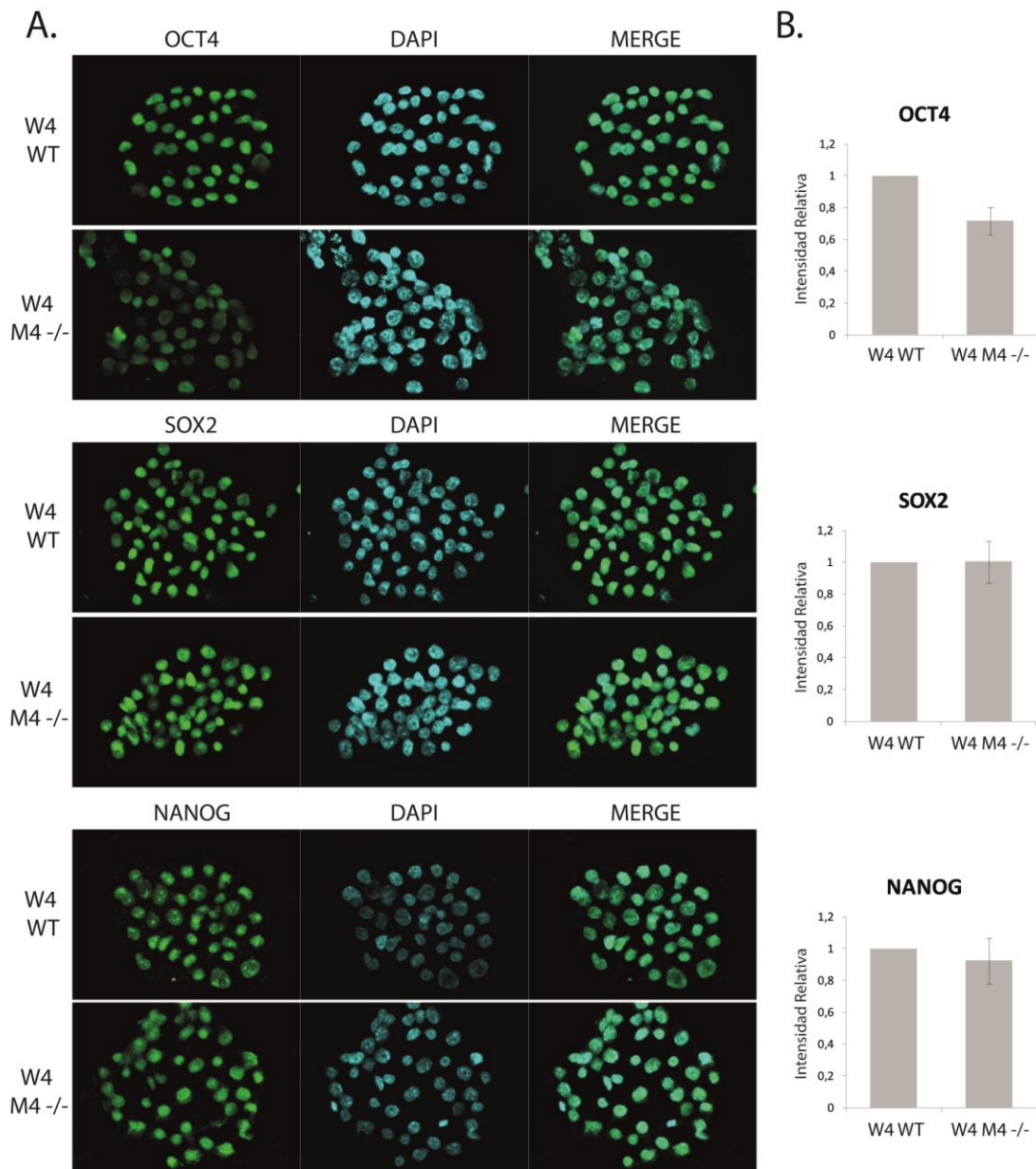


**Figura 4-8. Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y de diferenciación temprana en las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup>.** Las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> fueron cultivadas en estado indiferenciado, se extrajo RNA y la expresión génica fue analizada por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a *Gapdh*. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas entre ambas líneas celulares.

Al no encontrar diferencias de expresión a nivel de mRNA entre las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> en estado indiferenciado, decidimos evaluar la expresión a nivel proteico de los



FT marcadores de estado indiferenciado OCT4, SOX2 y NANOG mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos (Figura 4-9). Cuantificamos la intensidad de señal de cada factor utilizando el software FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Mediante esta técnica, tampoco observamos diferencias significativas en los niveles proteicos de los FT, complementando los resultados obtenidos a nivel de mRNA.



**Figura 4-9.** Análisis de expresión génica a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia en las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> en estado indiferenciado. **A.** Imágenes representativas de



inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para OCT4, SOX2 y NANOG. Los núcleos fueron visualizados mediante tinción de la cromatina con DAPI. **B.** Cuantificación de la intensidad de la señal de cada anticuerpo utilizando el software FIJI. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes relativizados a la línea W4 WT. Los valores se generaron con la cuantificación de 10 imágenes para cada réplica biológica, con alrededor de 40 células por imagen. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de estos marcadores entre ambas líneas.

A pesar de la morfología más plana de las células mutantes, que podría deberse a una salida del estado indiferenciado, no se modificaron los marcadores de pluripotencia ni aumentaron los marcadores de diferenciación. Esto indicaría que estas células son capaces de mantener el estado indiferenciado y autorrenovarse normalmente. Por otro lado, dado que el análisis de los niveles de un FT no es suficiente para evaluar su actividad, nos encontramos estudiando la dinámica de interacción de los FT con la cromatina mediante la técnica de microscopía avanzada *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS) en colaboración con el grupo de la Dra. Valeria Levi. Especulamos que podría haber diferencias entre las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> en el estado indiferenciado que se detecten a otro nivel, por lo que este estudio complementará los resultados presentados hasta el momento.

#### **4.4. Efecto de la ausencia de *Myst4* sobre la pluripotencia de CME**

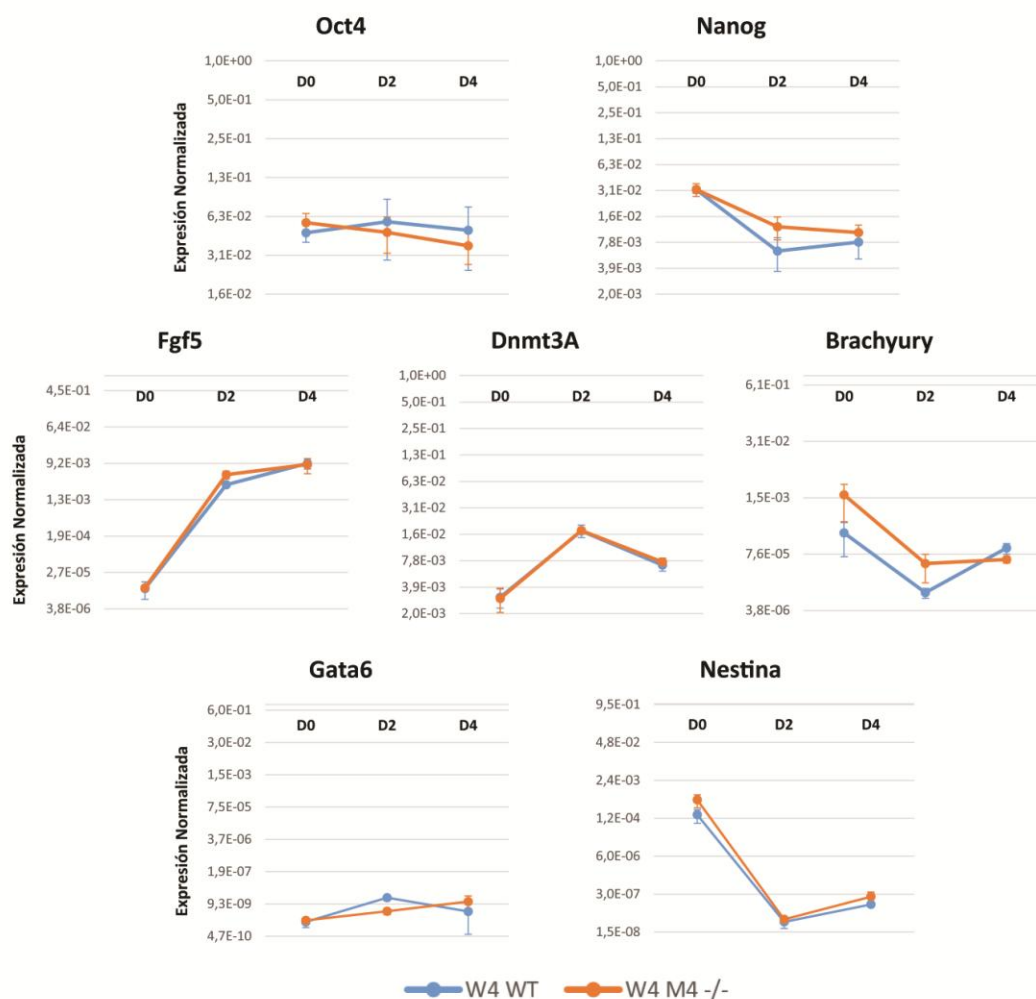
Como ya mencionamos, una célula pluripotente tiene la capacidad de diferenciarse y generar células representantes de las tres capas embrionarias. Para evaluar la pluripotencia se utilizan habitualmente diferentes protocolos de diferenciación, tanto in vitro como in vivo y se estudia en las células derivadas de la diferenciación si se encuentran presentes tipos celulares de las tres capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo. Los protocolos no dirigidos suelen utilizarse de rutina con este

propósito ya que son más económicos y menos laboriosos que los protocolos dirigidos y además en un único protocolo pueden encontrarse células representantes de las tres capas mencionadas. Por otra parte, tienen la desventaja de presentar una alta variabilidad y en muchos casos no puede detectarse la expresión de ciertos marcadores, ya sea porque no se haya expresado en ese protocolo en particular, como porque no se lo haya estudiado en la ventana temporal apropiada. Por estas razones estos protocolos suelen complementarse con protocolos de diferenciación *in vitro* pero dirigidos y con el ensayo de formación de teratomas, que como describiremos más adelante, consiste en un proceso de diferenciación *in vivo*.

Con el propósito de evaluar el efecto de la ausencia de *Myst4* sobre la pluripotencia, en primer lugar realizamos dos protocolos de diferenciación no dirigidos: el cultivo de las células en un medio en ausencia de LIF y 2i y la formación de cuerpos embrioides mediante el método de *Hanging drop*. Comparamos el patrón de expresión de marcadores de estado indiferenciado y de diferenciación, mediante extracción de RNA y análisis por RT-qPCR con primers específicos.

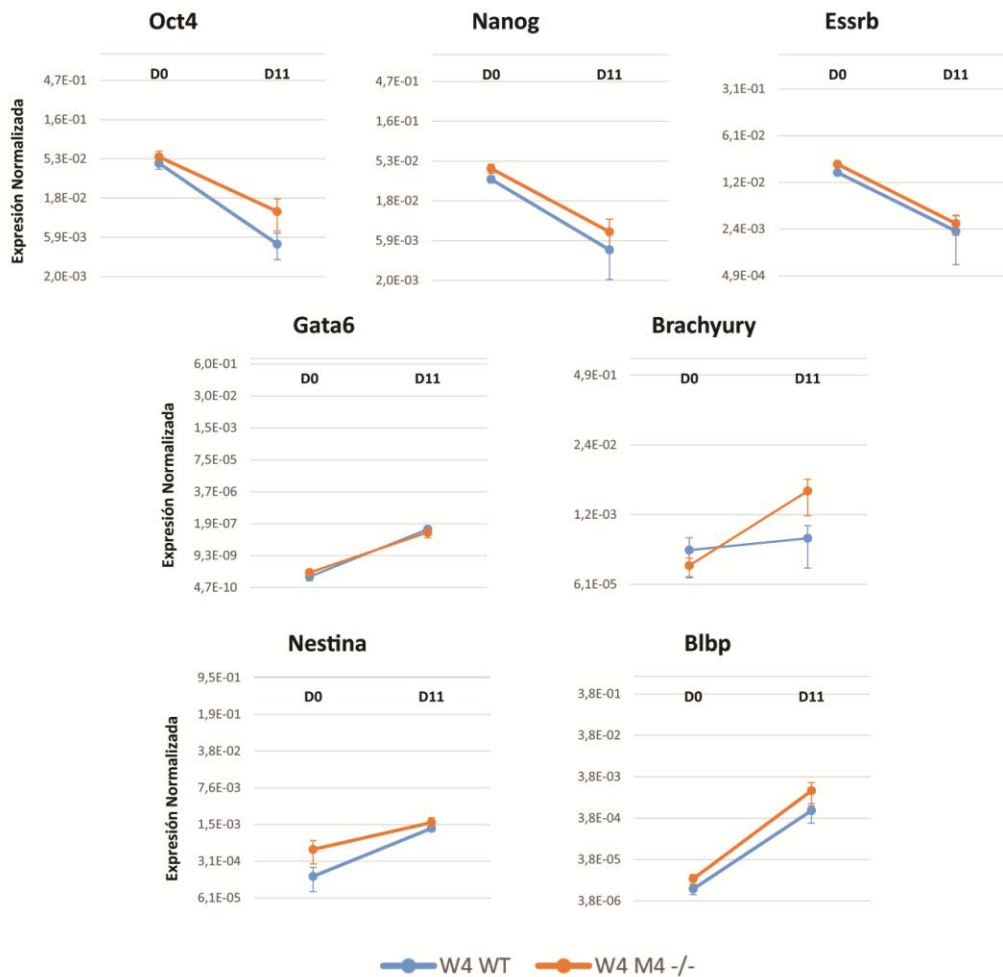
En el protocolo de diferenciación por ausencia de LIF y 2i, no observamos diferencias significativas en la expresión de los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Nanog*, ni de los marcadores de diferenciación *Fgf5*, *Dnmt3A*, *Brachyury*, *Gata6* y *Nestina*, comparando la línea *wild type* con la mutante (Figura 4-10). En ambas líneas observamos la disminución esperada del FT *Nanog*, y el aumento de algunos de los genes de diferenciación, corroborando que la línea *W4 M4<sup>-/-</sup>* mantiene la capacidad de diferenciarse mediante este protocolo. Si bien no observamos un aumento en la expresión de *Nestina* y *Brachyury*, sí observamos un aumento en los marcadores de diferenciación temprana *Fgf5* y *Dnmt3A*, y un leve aumento del marcador de endodermo *Gata6*. Esto puede deberse a que este protocolo, en los días que evaluamos, representa una diferenciación temprana, donde aún no se encuentra una especificación hacia linajes definidos, por lo cual es posible no siempre detectar expresión de marcadores más tardíos, aún cuando las células sean pluripotentes. Al comparar las líneas *W4 WT* y *W4 M4*

-/-, no observamos diferencias significativas en los niveles de mRNA de los genes evaluados durante este protocolo de diferenciación. Como describiremos a continuación, complementamos este análisis con otros protocolos de diferenciación hacia destinos celulares más tardíos.



**Figura 4-10. Diferenciación por ausencia de LIF y 2i en las líneas W4 WT y W4 M4 -/-.** Las líneas de CME fueron sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigida por ausencia de LIF y 2i. El RNA fue tomado al día 0 (estado indiferenciado) y a los días 2 y 4 del protocolo de diferenciación. El nivel de expresión de los distintos genes fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a Gapdh. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre las líneas W4 WT y W4 M4 -/-.

Al analizar la pluripotencia mediante el protocolo de *Hanging Drop*, de manera similar a lo obtenido en el protocolo anterior, no encontramos diferencias entre ambas líneas en los niveles de mRNA específicos en los cuerpos embrioides obtenidos por este método a día 11. La expresión de los FT de pluripotencia Oct4, Nanog y Essrb reflejó la represión esperada en las células diferenciadas (Figura 4-11). Por otra parte, medimos los niveles de mRNA de marcadores de endodermo (Gata6), mesodermo (Brachyury) y ectodermo (Nestina, Blbp) y observamos alta expresión de estos marcadores en células diferenciadas, lo que indica que ambas líneas tienen la capacidad de diferenciarse hacia estos linajes, demostrando la pluripotencia *in vitro* de las CME de la línea *knockout* para el gen *Myst4*.

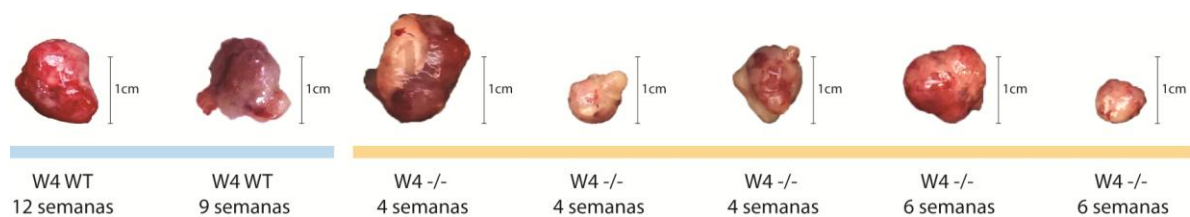


**Figura 4-11. Diferenciación por Hanging Drop en las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup>.** Las líneas de CME fueron sometidas a un protocolo de diferenciación no dirigida por Hanging Drop. El RNA fue

tomado al día 0 (estado indiferenciado) y al día 11 del protocolo de diferenciación. El nivel de expresión de los distintos genes fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a Gapdh. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre las líneas W4 WT y W4 M4 -/-.

Como ya mencionamos, una de las técnicas mayormente utilizadas para evaluar la pluripotencia de CMP es mediante un ensayo *in vivo*, realizando la inyección subcutánea de las células en ratones inmunosuprimidos (*nude*), ya que estas células tienen la capacidad de generar tumores en ese contexto, aunque el porcentaje de éxito no suele ser total. Posteriormente, se evalúa en los tumores generados la presencia de tipos celulares derivados de las tres capas germinales como producto de la diferenciación de las CMP inyectadas. En caso de tener todas las capas representadas, el tumor puede ser un teratoma y eso prueba su pluripotencia *in vivo*.

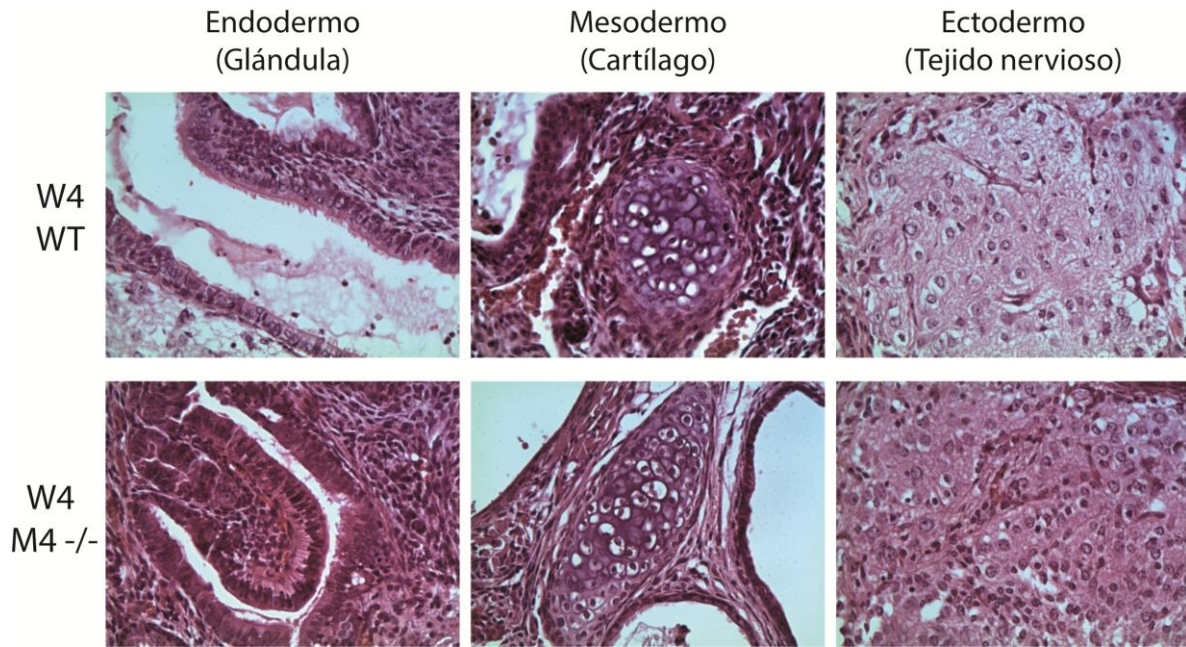
Para realizar este ensayo, inyectamos células W4 WT y W4 M4 -/- de manera subcutánea en ratones *nude*. Se monitoreó semanalmente el crecimiento de los tumores, y cuando presentaron un tamaño de aproximadamente 1 cm los ratones fueron sacrificados. Si bien realizamos 10 inyecciones por línea celular, utilizando 2 sitios de inyección por ratón en 10 ratones y distribuyendo de manera aleatoria las líneas, obtuvimos 2 tumores de la línea W4 WT y 5 tumores de la línea W4 M4 -/- (Figura 4-12).



**Figura 4-12. Tamaño y tiempo de generación de los tumores obtenidos por inyección de células W4 WT y W4 -/- en ratones nude.** Las células indiferenciadas W4 WT y W4 -/- fueron inyectadas de manera subcutánea en ratones inmunosuprimidos. Una vez formados los tumores fueron removidos por cirugía y se midió su tamaño. Se obtuvieron 2 tumores de la línea W4 WT y 5 tumores de la línea W4 M4 -/-.

Evidenciamos en primer lugar un crecimiento mayor en los tumores generados a partir de células W4 M4<sup>-/-</sup>. Los tumores provenientes de W4 WT fueron colectados a las 9 y 12 semanas de inyectadas las células, mientras que los tumores de la línea mutante sólo tardaron 4 y 6 semanas en alcanzar un tamaño similar. Esto indica que podría haber diferencias en la tasa de proliferación entre las líneas cuando estas células se empiezan a diferenciar, parámetro que analizaremos más adelante en este trabajo. Sin embargo, para confirmar este efecto de mayor velocidad de crecimiento es necesario realizar más réplicas biológicas.

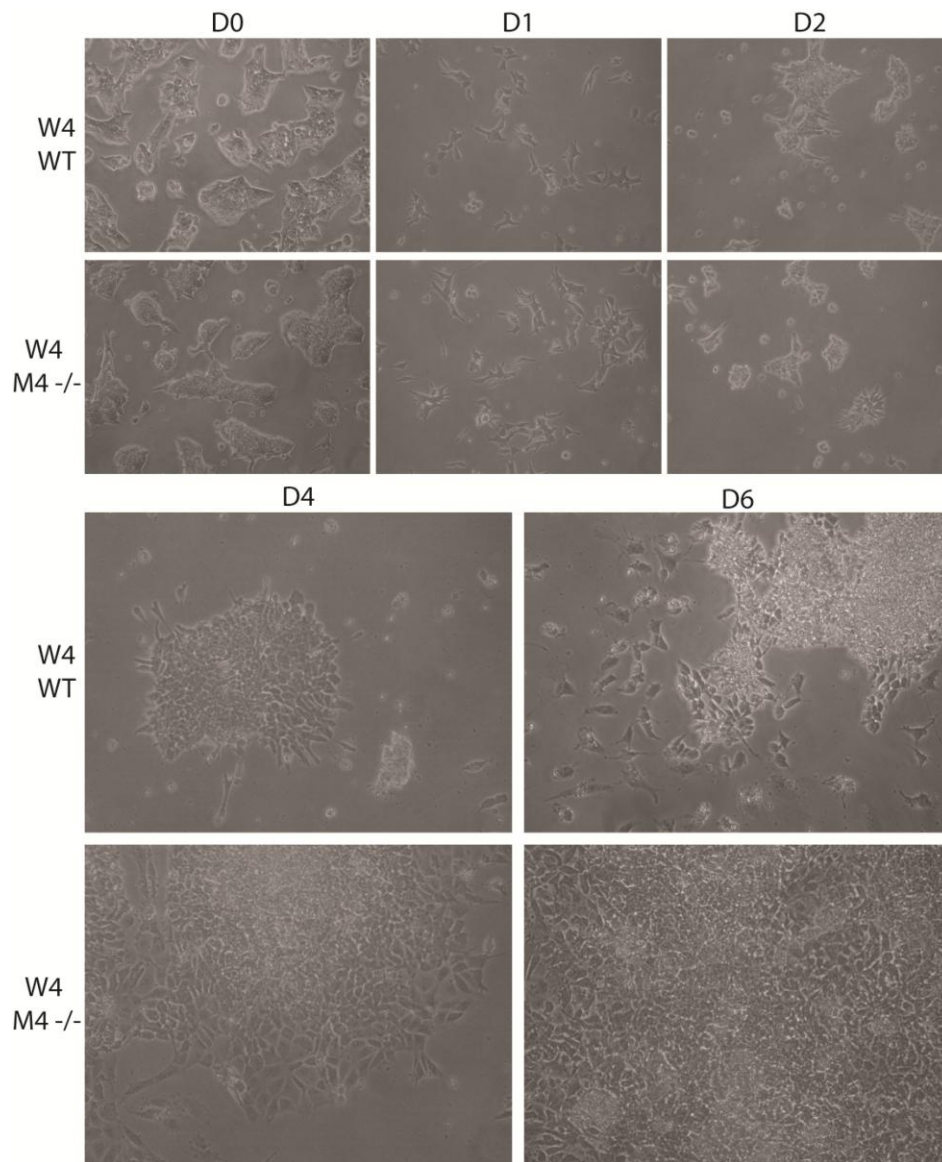
Con el propósito de evaluar la pluripotencia, realizamos un análisis histológico para la identificación de diferentes tipos celulares. Los tumores obtenidos se fijaron con formol, se efectuaron cortes y se realizó la tinción con hematoxilina-eosina para permitir el reconocimiento de las distintas estructuras generadas. Observamos las muestras con un microscopio óptico y analizamos los tejidos obtenidos en los distintos tumores con el asesoramiento de un patólogo, el Dr. Gustavo Sevlever (FLENI). Como se muestra en la figura 4-11, ambas líneas celulares generaron tumores conteniendo estructuras representantes de las tres capas embrionarias. En todos los tumores observamos derivados de endodermo (Glándulas, epitelios ciliados), de mesodermo (músculo, cartílago, tejido adiposo) y de ectodermo (tejido nervioso, epitelio pavimentoso). Estos resultados indican que las células W4 M4<sup>-/-</sup> tienen la capacidad de generar tejidos de las tres capas embrionarias, y por lo tanto son pluripotentes.



**Figura 4-13. Imágenes de microscopía óptica de cortes de tumores obtenidos a partir de células W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> con tinción con hematoxilina-eosina.** Se tomaron cortes de los tumores obtenidos por inyección subcutánea de las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> en ratones *nude* y se realizó la tinción con hematoxilina-eosina para analizar las distintas estructuras generadas. Se muestran imágenes representativas donde se observan tipos celulares derivados de las tres capas embrionarias (Endodermo, Mesodermo y Ectodermo).

Por último, debido a los antecedentes mencionados que sugieren que *Myst4* podría ser relevante durante el desarrollo del sistema nervioso, evaluamos el efecto de la ausencia de este gen sobre la capacidad de diferenciación hacia progenitores neurales. Para ello, realizamos el protocolo de diferenciación dirigido a este tipo celular y comparamos el comportamiento de la línea W4 WT con la W4 M4<sup>-/-</sup>. Al analizar la diferenciación en microscopio invertido de campo claro, observamos diferencias morfológicas que se evidenciaban a día 4 y 6 de iniciado el protocolo, donde la línea W4 M4<sup>-/-</sup> mostraba un mayor número de células en comparación a la línea W4 WT y generaban una monocapa de células a día 6 (Figura 4-14).



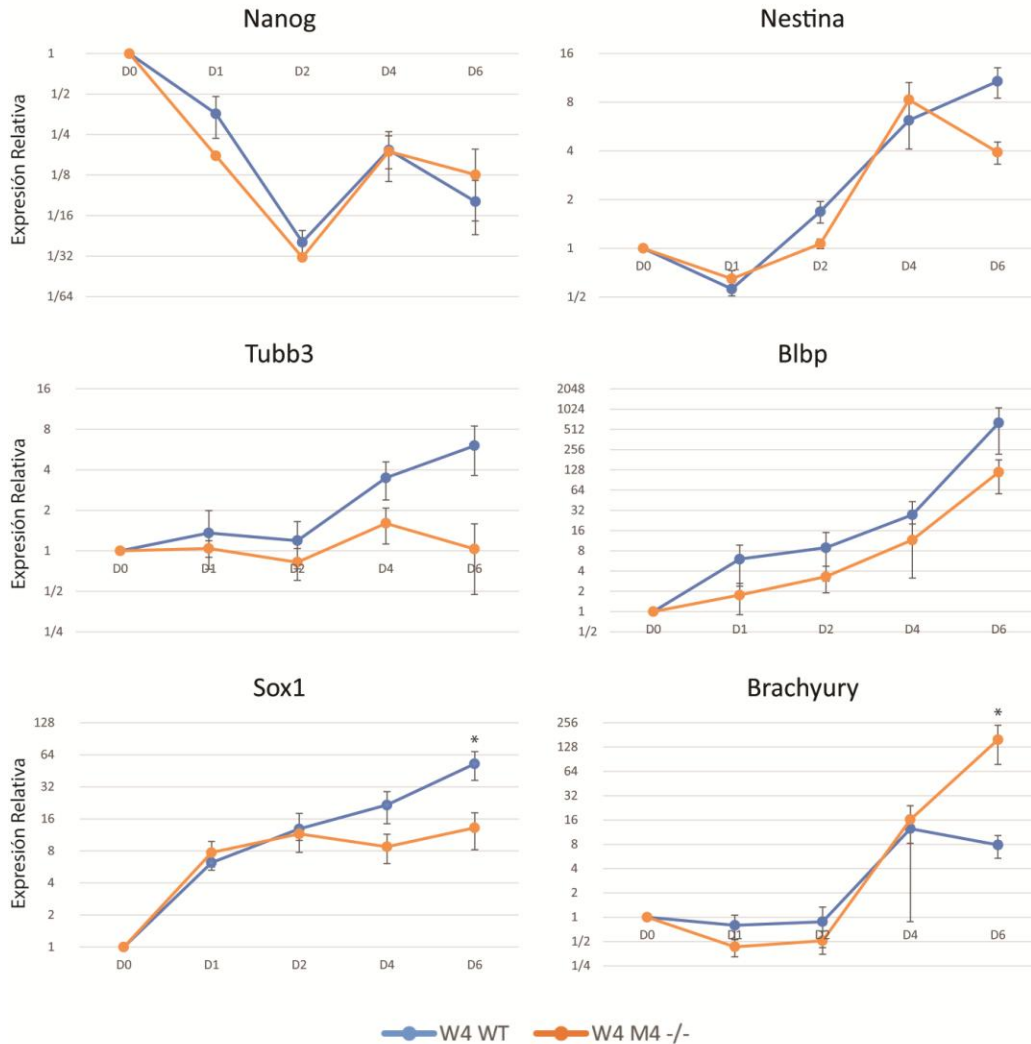


**Figura 4-14. Morfología de la línea W4 WT y W4 M4 -/- en un protocolo de diferenciación a progenitor neural.** Imágenes de campo claro de las líneas W4 WT Y W4 M4 -/- a día 0 (estado indiferenciado en alta densidad) y a los días 1, 2, 4 y 6 de iniciado el protocolo de diferenciación.

Posteriormente, realizamos la extracción de RNA en el estado indiferenciado y a los días 1, 2, 4, y 6 de iniciado el protocolo y analizamos la expresión del factor de pluripotencia Nanog y de los genes de diferenciación neural Nestina, Sox1, Tubb3 y Blbp. En ambas líneas observamos la disminución de Nanog esperada a lo largo del protocolo (Figura 4-15). Por otro lado, tanto la línea *wild type* como la *knockout* presentaron un



aumento de los marcadores de diferenciación neural a lo largo del protocolo. Esto indicaría que las células que no expresan *Myst4* mantienen la capacidad de diferenciarse hacia este tipo celular. Sin embargo, encontramos que los niveles del marcador de progenitor neural *Sox1* fueron significativamente menores en la línea mutante en comparación con las células W4 WT a día 6 del inicio del protocolo. Este resultado sugiere que estas células poseen una disminución en su eficiencia de diferenciación hacia progenitores neurales. Estas evidencias, sumadas al aumento en el número de células encontrado en la línea mutante, y la morfología de las células de la monocapa generada a día 6, podrían indicar la presencia de células diferenciadas de otros linajes. Por esta razón, evaluamos los niveles del marcador de mesodermo *Brachyury*, el cual puede presentar un aumento en su expresión a día 4 del inicio del protocolo, pero que luego se reprime junto con el aumento de los marcadores de progenitor neural a día 6. Sorpresivamente, este gen presentó mayor expresión a día 6 en la línea W4 *M4*<sup>-/-</sup> respecto a la *wild type* (Figura 4-15). Estos resultados sugieren que la línea mutante mantiene la capacidad de diferenciarse hacia progenitores neurales pero con una menor eficiencia que la línea *wild type*, y además genera un aumento en el número de células totales a día 6, acompañado por un aumento en un marcador de mesodermo, indicando la presencia de células diferenciadas hacia ese linaje junto con los progenitores neurales.



**Figura 4-15. Nivel de expresión de genes a lo largo de la diferenciación a progenitor neural de las líneas W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup>.** Las células fueron sometidas a un protocolo de diferenciación a progenitor neural. El RNA fue tomado al día 0 (estado indiferenciado) y a los días 1, 2, 4 y 6 del protocolo de diferenciación. El nivel de expresión de los distintos genes fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a Gapdh y relativizados al día 0. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$

Las diferencias encontradas en el crecimiento de las células a día 4 y 6 del inicio del protocolo, en conjunto con el mayor tamaño de tumores obtenidos en el protocolo de obtención de teratomas, nos llevaron a investigar si la ausencia de *Myst4* tiene un efecto sobre la proliferación de las células en un contexto de diferenciación. Además, los menores niveles de *Sox1* y el aumento en la expresión de *Brachyury* podrían deberse a

una diferencia en la eficiencia de diferenciación hacia progenitores neurales, presentando contaminación con otros linajes. A continuación, profundizaremos el estudio de estos dos aspectos.

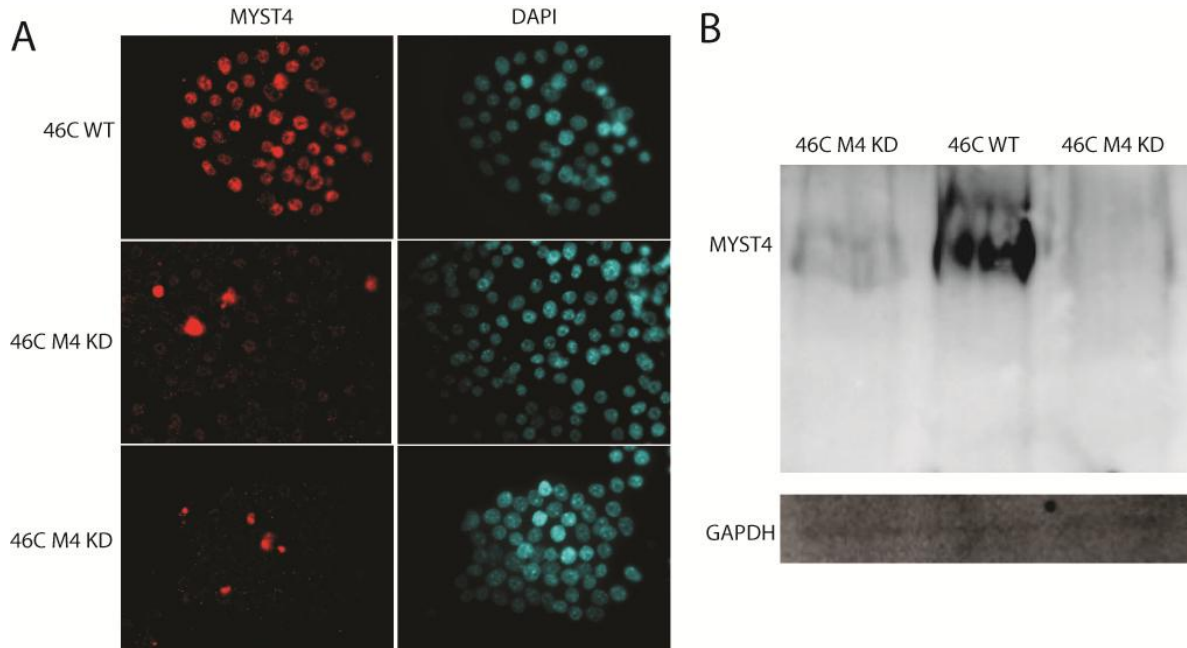
#### **4.4.1. Generación de *knockout* de *Myst4* en la línea 46C para evaluar la eficiencia de diferenciación a progenitor neural**

Como mencionamos anteriormente, la línea 46C es reportera de progenitores neurales, dado que posee en su genoma el gen de la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor del FT Sox1 (Ying y Smith, 2003). De esta manera, utilizando esta línea en un protocolo de diferenciación hacia progenitor neural, el porcentaje de células con presencia de GFP es un indicador de la eficiencia de diferenciación hacia este tipo de células y es fácilmente cuantificable tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia.

Dado que, como ya mencionamos, encontramos diferencias significativas en la expresión de Sox1 en la diferenciación de las células W4 M4<sup>-/-</sup> con respecto a las células W4 WT, decidimos profundizar el estudio de la eficiencia de diferenciación de estas células. Para lograr medir esta eficiencia de una manera simple, decidimos realizar una nueva línea *knockout*, pero esta vez utilizando como células parentales a la línea 46C. Recurrimos al mismo sgRNA1 utilizado para la generación de la línea W4 M4<sup>-/-</sup>, el cual, como describimos anteriormente, presentó mayor eficiencia de generación de Indels en el gen de *Myst4* que el sgRNA2. Realizamos la transfección de células 46C, selección y aislamiento de clones individuales, como ya describimos. Es importante destacar que la línea 46C no expresa GFP en estado indiferenciado, por lo cual no interfiere al momento de seleccionar las células resistentes al antibiótico que expresan esta proteína fluorescente. Mediante análisis del DNA genómico evaluamos por PCR los distintos clones obtenidos y enviamos a secuenciar los productos con posibles Indels. Obtuvimos un clon con una delección de 1 pb en una de las copias del gen de *Myst4* y una delección de 2 pb en

el cromosoma homólogo, generando un codón stop prematuro en ambas copias del gen de *Myst4*.

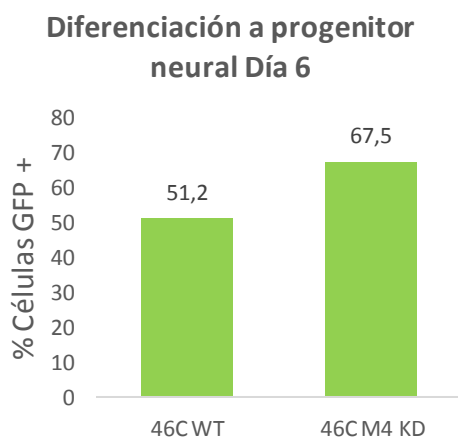
Al evaluar la expresión proteica de *Myst4* en este clon por inmunofluorescencia y Western blot, observamos una mínima expresión que sólo en algunas muestras fue indetectable (Figura 4-16). Por lo tanto, este clon no se comportaría como un verdadero *knockout*. Nos encontramos evaluando las posibles causas de este hecho. Sin embargo, esta línea puede ser útil con el fin de evaluar si una expresión altamente disminuída de *Myst4* produce un efecto en la eficiencia de diferenciación a progenitor neural.



**Figura 4-16. Análisis de niveles proteicos de *Myst4* en la línea 46C WT y M4 KD.** A. Inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra *Myst4* en las líneas 46C WT y 46 M4 KD. En rojo se muestra la señal específica de *Myst4* y en azul los núcleos teñidos con DAPI. B. Western blot revelando la expresión proteica de *Myst4* con el mismo anticuerpo en ambas líneas. Se utilizó GAPDH como control de carga. Se muestran dos réplicas de la línea mutante para evidenciar la heterogeneidad de los resultados.

Realizamos una primera réplica de la diferenciación a progenitor neural de esta línea, a la que denominamos 46C *Myst4 knock down* (46C M4 KD), y de las células 46C *wild*

*type* y cuantificamos la expresión de GFP a día 6 mediante citometría de flujo (Figura 4-17). Si bien éstos son resultados preliminares, y no es posible analizar diferencias hasta tener más réplicas biológicas, logramos una puesta a punto exitosa para la visualización de esta línea reportera por citometría. Planeamos realizar nuevas réplicas para cuantificar la eficiencia de diferenciación a progenitor neural.



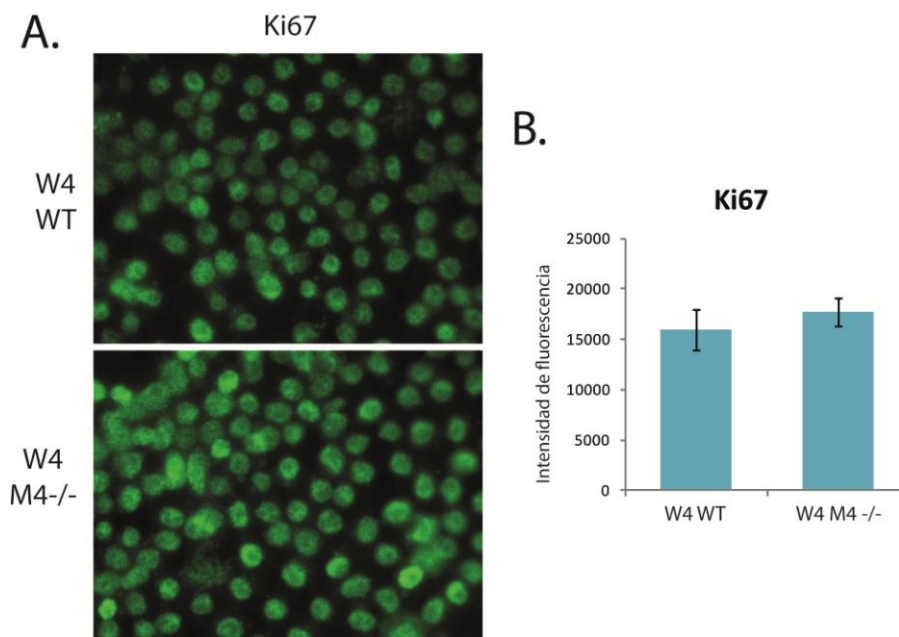
**Figura 4-17. Análisis de porcentaje de células que expresan GFP a día 6 del protocolo de diferenciación de las células 46C WT y 46C M4 KD.** Las células 46C WT y 46C M4 KD fueron sometidas a un protocolo de diferenciación a progenitor neural y se realizó el análisis de células con expresión de GFP por citometría de flujo a día 6 de iniciado el protocolo. Los valores se expresan como porcentaje de células GFP positivas.

#### 4.5. Efecto de la ausencia de *Myst4* sobre la proliferación de CME en estado indiferenciado y en diferenciación

En las secciones anteriores reportamos que al estudiar la pluripotencia *in vivo* observamos un mayor crecimiento en los tumores generados por la línea celular con ausencia de *Myst4* en comparación con los generados con la línea *wild type* (Figura 4-12). Por otro lado, la línea *knockout* también presentó un aumento en el número de células a día 4 y 6 de iniciada la diferenciación neural, evidenciado visualmente mediante microscopía de campo claro (Figura 4-14). Estos resultados nos llevaron a especular que *Myst4* podría tener un efecto sobre la proliferación, particularmente en un contexto de

diferenciación, ya que no habíamos advertido estas diferencias en las células en estado indiferenciado. Por esta razón, en esta sección nos propusimos evaluar el efecto de la ausencia de *Myst4* sobre la proliferación en estado indiferenciado y durante la diferenciación.

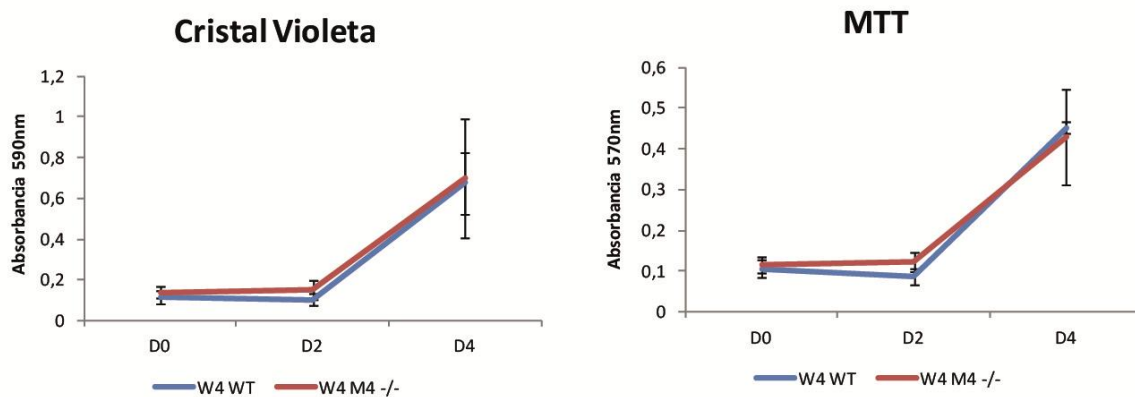
En un principio, evaluamos mediante inmunofluorescencia el marcador de proliferación Ki67 en el estado indiferenciado. Como se muestra en la figura 4-18, no observamos diferencias en la expresión proteica de este marcador comparando ambas líneas celulares, sugiriendo que las células W4 M4  $-/-$  y su contraparte *wild type* no presentan diferencias en la proliferación en el estado pluripotente, al menos diferencias que puedan ser detectadas mediante análisis de este marcador (Figura 4-18).



**Figura 4-18. Niveles proteicos del marcador de proliferación Ki67 en las líneas W4 WT y W4 M4  $-/-$ .** **A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico contra Ki67 de ratón en las líneas W4 WT y W4 M4  $-/-$ . **B.** Cuantificación de la intensidad de la señal de este marcador utilizando el software FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Los resultados se muestran como el promedio de intensidad de 10 imágenes con aproximadamente 50 células por imagen.

A pesar que mediante análisis cualitativo del aspecto de los cultivos no encontramos diferencias en el número de células en el protocolo de diferenciación por ausencia de LIF y 2i, decidimos cuantificar estos parámetros mediante los ensayos de viabilidad de Cristal Violeta y MTT.

El Cristal Violeta tiñe las macromoléculas de las células fijadas, por lo tanto, los niveles de incorporación de este colorante cuantificados por espectrofotometría se relacionan directamente con la masa celular presente en la placa de cultivo. Ambas líneas celulares mostraron un aumento en la masa celular durante la diferenciación por ausencia de LIF y 2i, y no presentaron diferencias significativas entre ellas (Figura 4-19).



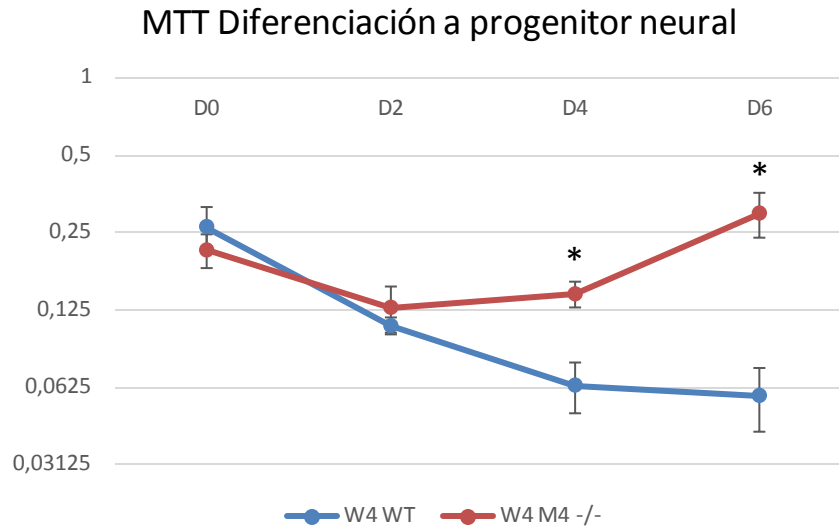
**Figura 4-19. Cuantificación de la masa celular mediante ensayo de Cristal Violeta y de la viabilidad mediante MTT en células W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> a lo largo del protocolo de diferenciación por ausencia de LIF.** Las células W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> fueron sometidas a un protocolo de diferenciación por ausencia de LIF y se realizaron los ensayos de Cristal Violeta y MTT en el estado indiferenciado (D0) y en los días 2 y 4 de iniciado el protocolo. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas entre líneas.

Por otro lado, el MTT se incorpora al medio de cultivo y permite evaluar actividad mitocondrial, dado que actúa como sustrato de una enzima mitocondrial que lo reduce y genera un compuesto de color azul. De esta manera, los niveles de coloración azul cuantificados por su absorbancia a 570 nm se relacionan con el número de células viables

en la placa de cultivo. Para este ensayo, realizamos la diferenciación de las células por ausencia de LIF e incubamos por 30 minutos con MTT en el estado indiferenciado y a los días 2 y 4 de iniciado el protocolo. Al cuantificar la coloración azul en un lector de placas, observamos un aumento en el número de células a lo largo del protocolo, de manera similar a la observada en el ensayo de Cristal Violeta y consistente con la observación por microscopía (Figura 4-19). Nuevamente, no encontramos diferencias en estos valores entre la línea W4 WT y la línea W4 M4  $-/-$ , lo cual sugiere que la ausencia de *Myst4* no genera un cambio en la proliferación de estas células cuando se diferencian por ausencia de LIF y 2i. Dado que ambos ensayos presentaron resultados muy similares, a partir de ese momento continuamos evaluando la viabilidad celular por la técnica de MTT, que además genera resultados con menor variabilidad.

Dada la diferencia encontrada entre las líneas W4 WT y W4 M4  $-/-$  al observar al microscopio la diferenciación a progenitor neural, evaluamos el número de células a lo largo de este protocolo mediante el ensayo de MTT. Efectivamente, encontramos un aumento significativo en el número de células viables a día 4 y 6 de iniciado el protocolo (Figura 4-20). Estos resultados sugieren que la ausencia de *Myst4* produce un aumento en la proliferación o una disminución de la apoptosis en células diferenciadas a partir del día 4 de la diferenciación hacia progenitor neural.

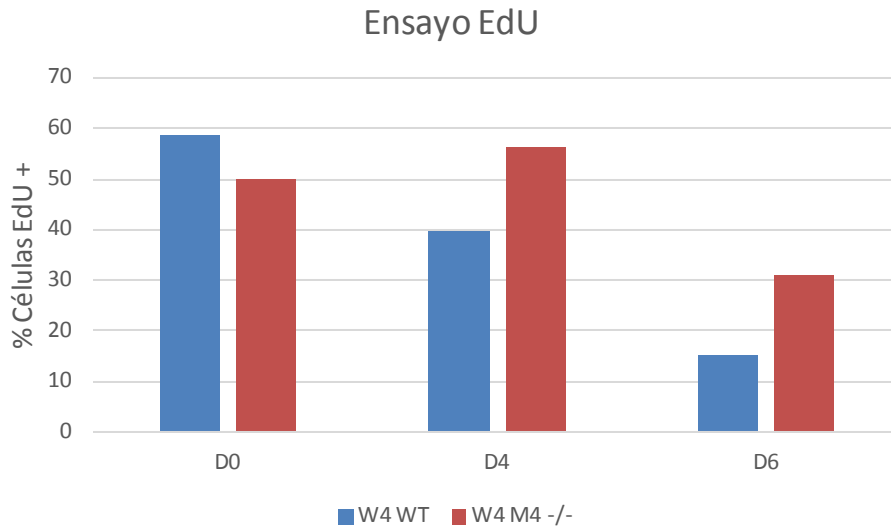




**Figura 4-20. Ensayo de MTT en células W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> a lo largo del protocolo de diferenciación a progenitor neural.** Las células W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> fueron sometidas a un protocolo de diferenciación a progenitor neural y se realizó el ensayo de MTT en el estado indiferenciado (D0) y en los días 2, 4 y 6 de iniciado el protocolo. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$

Para evaluar si el efecto se debe a cambios en la proliferación o en la apoptosis evaluaremos los dos procesos a futuro. Comenzamos con el análisis de proliferación por un ensayo de ciclo celular por incorporación del análogo de Timidina, EdU. Este protocolo permite identificar mediante citometría de flujo el porcentaje de células que se encuentra en fase S del ciclo celular, la cual es indicadora de la tasa de proliferación de la población celular.

La figura 4-21 muestra una primera réplica de este experimento, con resultados preliminares que sugieren una tendencia a una mayor cantidad de células en fase S en la línea mutante, lo cual evidenciaría un aumento en la proliferación a día 4 y 6 de la diferenciación. Además, este aumento no parece evidenciarse en el estado indiferenciado. Sin embargo, como mencionamos, estos son datos preliminares y es necesario analizar más réplicas biológicas para confirmar este resultado.



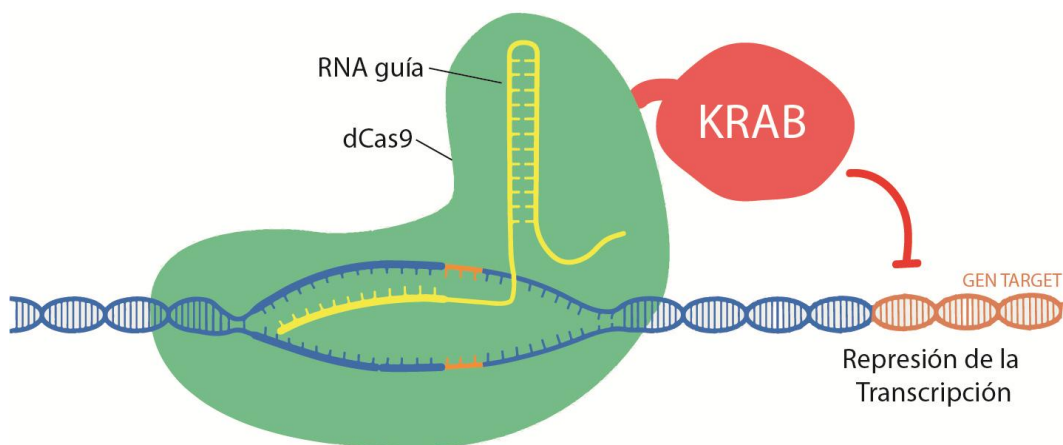
**Figura 4-21. Análisis de ciclo celular por incorporación de EdU.** Las células W4 WT y W4 M4<sup>-/-</sup> fueron sometidas a un protocolo de diferenciación a progenitor neural y se analizó la proporción de células en fase S mediante incorporación de EdU en el estado indiferenciado (D0) y en los días 4 y 6 de iniciado el protocolo. Las células fueron analizadas por citometría de flujo y los valores se expresan como porcentaje de células que incorporaron EdU (EdU +), análogo de Timidina que se incorpora a las células en la fase S del ciclo celular.

#### 4.6. Generación de líneas para la modulación inducible de la expresión de **Myst4**

En este trabajo de tesis, observamos que el patrón de expresión de *Myst4* en la diferenciación a progenitor neural en células *wild type* mostró una represión marcada en el inicio y se mantuvo en bajos niveles a lo largo del protocolo. Sin embargo, las diferencias en el crecimiento de la línea con ausencia de *Myst4* fueron encontradas durante días tardíos de la diferenciación, cuando normalmente hay una expresión muy baja de este remodelador. Postulamos que estos hallazgos podrían explicarse mediante dos hipótesis. Una de ellas es que esta HAT genera modificaciones en la cromatina durante el estado indiferenciado que se ponen en evidencia recién durante el proceso de

diferenciación. De esta manera, en la línea *knockout*, no es posible la generación de estas marcas en la cromatina y se produce una desregulación en la diferenciación. La otra hipótesis postula que los niveles mínimos de expresión de *Myst4* a día 4 y 6 de la diferenciación son necesarios para la regulación de la proliferación o la apoptosis de las células, y en la línea *knockout* la ausencia de estos niveles mínimos produce el efecto observado. En ese caso, los resultados obtenidos no se deberían a una disociación temporal entre la generación y el efecto de las modificaciones generadas por *Myst4*.

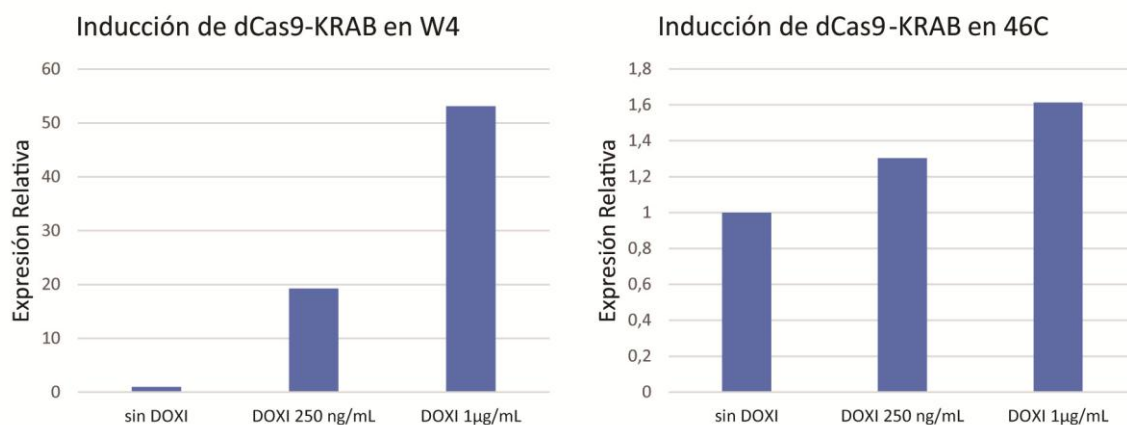
Para estudiar estas hipótesis, proponemos realizar una represión inducible de la expresión de *Myst4*, tanto en el estado indiferenciado, como en diferentes etapas a lo largo de distintos procesos de diferenciación. Para esto, decidimos utilizar la herramienta CRISPRi, la cual se generó por mutaciones en la proteína Cas9 que remueven su actividad de nucleasa, pero permiten su posicionamiento en una región de interés del genoma (dCas9). En este sistema, la proteína dCas9 se encuentra fusionada a un dominio represor de la transcripción KRAB. De esta manera, utilizando un sgRNA dirigido hacia el promotor de un gen, es posible inhibir la transcripción de ese gen (Figura 4-22). Además, la expresión de esta proteína de fusión se encuentra regulada por un promotor inducible por DOXI, por lo que es posible modular el momento en el cual se desea reprimir un gen mediante el agregado de DOXI al medio de cultivo.



**Figura 4-22. Esquema del mecanismo de acción del sistema CRISPRi.** La proteína Cas9 se encuentra con una mutación que inactiva su acción como nucleasa, pero permite su posicionamiento en la región del DNA complementaria a la secuencia del RNA guía (dCas9). Además, se encuentra fusionada al represor transcripcional KRAB, que reprime la expresión del gen *target*. Adaptado de imagen de Javier Zarracina ([www.vox.com](http://www.vox.com)).

Para realizar la represión inducible de *Myst4* por CRISPRi, es necesario realizar una línea de CME que contenga el plásmido pHAGE TRE dCas9-KRAB integrado en el genoma por transducción lentiviral, y luego realizar sobre ésta una segunda transducción con un plásmido que codifica para la expresión del sgRNA de interés. En primer lugar, logramos generar las líneas celulares con dCas9-KRAB integrado en el genoma, utilizando las líneas parentales W4 y 46C. Realizamos el aislamiento de clones individuales y confirmamos la integración en el genoma por PCR de DNA genómico con primers específicos. Posteriormente, evaluamos la inducción de la expresión de esta proteína de fusión luego del agregado de DOXI, a través de RT-qPCR. Observamos que en el caso de uno de los clones de la línea W4 aumentó la expresión de dCas9-KRAB con el agregado de DOXI, de una manera dependiente de la concentración (Figura 4-23). En las células 46C, en cambio, no observamos un aumento considerable de esta expresión, por lo que no sería útil para nuestros propósitos de inducción. De esta manera, logramos obtener una línea celular que llamamos W4 KRAB que permite la inducción de la proteína dCas9-KRAB mediante el agregado de DOXI al medio de cultivo. Nos encontramos evaluando otros clones de la línea 46C con el objetivo de obtener la línea inducible también en estas células parentales.

El siguiente paso fue diseñar sgRNA para el posicionamiento de dCas9-KRAB en el promotor de *Myst4*. Para esto, utilizamos la herramienta *CRISPR design* (<http://crispr.mit.edu/>) y diseñamos dos sgRNA distintos para direccionar a la proteína de fusión hacia la región promotora de *Myst4*, próxima al inicio de la transcripción del gen. Los sgRNA fueron seleccionados por poseer la menor probabilidad de *off target*. Realizaremos en un futuro el clonado de estos sgRNA en vectores lentivirales de expresión, y la transducción de la línea W4 KRAB, para lograr obtener CME con represión inducible de *Myst4*.



**Figura 4-23. Análisis de inducción de la expresión de dCas9-KRAB mediante el agregado de DOXI en las líneas parentales W4 y 46C.** Las células W4 KRAB y 46C KRAB fueron incubadas en ausencia de DOXI (sin DOXI), con 250 ng/ml o 1 µg/ml de DOXI por 48h. El nivel de expresión de dCas9-KRAB fue analizado por RT-qPCR con primers específicos. Los valores fueron normalizados a Gapdh y relativizados a los de células en condición control (sin DOXI).

#### 4.7. Conclusiones

En este capítulo, generamos una línea *knockout* de la proteína *Myst4* en las CME de ratón de la línea W4. En estado indiferenciado, si bien observamos diferencias morfológicas entre las células con ausencia de *Myst4* y células *wild type*, no encontramos diferencias en la expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación temprana. Nos encontramos estudiando la dinámica de los factores de pluripotencia y la cromatina, dado que especulamos que el estado de la cromatina puede ser diferente entre las líneas y esto podría determinar un cambio en la función de estos FT. Por otra parte, las células mutantes mostraron ser pluripotentes, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, observamos un aumento en el número de células cuando éstas se diferenciaban hacia progenitores neurales, lo cual podría explicarse por un aumento en la proliferación o una disminución en la apoptosis. Estas diferencias no se observaron en estado indiferenciado. Además, las células W4 *M4*<sup>-/-</sup> podrían tener disminuída la eficiencia de diferenciación hacia este tipo celular, dado que observamos menores niveles del

marcador de progenitores neurales Sox1 y un aumento del marcador de mesodermo Brachyury al final de la diferenciación. Profundizaremos este estudio en una línea *knockout* de *Myst4* en la línea reportera de progenitores neurales 46C, que nos encontramos realizando. Por otro lado, estudiaremos si el efecto de la actividad de *Myst4* en estado indiferenciado es evidenciado durante la diferenciación celular, mediante la generación de una línea de CME con represión inducible de este gen.

## 5. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo embrionario, desde la fertilización hasta la formación de un individuo completo, ocurre una coordinación espacio temporal precisa de la expresión génica. Los remodeladores de la cromatina contribuyen a los cambios dinámicos en esta expresión, pero también al mantenimiento de un destino celular, generando además programas transcripcionales estables y heredables. Las células madre embrionarias se encuentran en el macizo celular interno del blastocisto de mamíferos, y son las responsables de generar todos los tejidos del individuo. La diferenciación de estas células en cultivo recapitula en muchas ocasiones el desarrollo embrionario, por lo que son un excelente modelo para estudiar este proceso y patologías asociadas (Keller, 1995; Barberi *et al.*, 2003; Murry y Keller, 2008; Thomson *et al.*, 2011). Además, son una fuente potencialmente ilimitada de células para su utilización en terapia regenerativa (Murry y Keller, 2008; Cohen y Melton, 2011; Sánchez Alvarado y Yamanaka, 2014). Por estas razones, su estudio ha ganado mucha importancia, y es de gran interés comprender los mecanismos moleculares que gobiernan el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación. El remodelado de la cromatina resulta un nivel de regulación clave en el mantenimiento del programa transcripcional típico de CMP y en la modulación de la expresión génica que ocurre durante la diferenciación. El objetivo inicial de este trabajo de tesis fue estudiar remodeladores de la cromatina que podrían ser relevantes tanto para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CMP como para su diferenciación.

Los trabajos a escala genómica realizados en los últimos años generaron una gran cantidad de información que se encuentra disponible para ser analizada por otros investigadores. Estos estudios incluyen secuenciación masiva luego de inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos específicos (ChIP-seq) (Chen *et al.*, 2008; Ouyang, Zhou y Wong, 2009; Whyte *et al.*, 2013), secuenciación de RNA total (RNA-

seq) o análisis mediante microarrays de expresión luego de distintos tratamientos, como distintos protocolos de diferenciación (Cloonan *et al.*, 2008; Ouyang, Zhou y Wong, 2009; Wamstad *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2016) o silenciamiento de genes (Ivanova *et al.*, 2006; Loh *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007; Sharov *et al.*, 2008), entre otros. Utilizar esta información resulta muy útil para fortalecer los resultados obtenidos a menor escala, para complementar evidencias encontradas y para evitar realizar repeticiones de experimentos ya generados por otros grupos. Además, resulta enriquecedor el hecho de que los resultados obtenidos por un grupo de trabajo se encuentren validados por otros investigadores con distintas preguntas biológicas y diferentes modelos experimentales.

En este contexto, hallamos numerosos trabajos que evalúan la unión de los FT de pluripotencia en regiones regulatorias en CMP, mediante experimentos de ChIP-seq. Generalmente, el objetivo de estos trabajos fue definir la compleja red transcripcional que gobierna el estado indiferenciado. Especulamos que si un gen presenta un alto nivel de posicionamiento de Oct4, Sox2 o Nanog en su región promotora, posiblemente esté regulado por estos factores y cumpla una función en este tipo de células. En la búsqueda encontramos algunos remodeladores de la cromatina con alto nivel de unión de estos FT, muchos de los cuales ya habían sido previamente estudiados en CMP. Centramos entonces, nuestro estudio en la acetiltransferasa *Myst4* por poseer un elemento regulatorio super-enhancer en CME, no haber sido previamente estudiada en ese tipo celular, y por los antecedentes relacionados a enfermedades de desarrollo consecuencia de la desregulación en la expresión de este gen.

El término “super-enhancer” fue utilizado por primera vez en 2004 por Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2004), y luego estos elementos fueron identificados a gran escala por Young y sus colegas en 2013 (Chapuy, McKeown y Lin, 2013; Lovén *et al.*, 2013; Whyte *et al.*, 2013; Hnisz y Abraham, 2014). Como ya mencionamos, los super-enhancer son regiones regulatorias *cluster* de sitios de unión a FT que difieren de los enhancers convencionales por su mayor tamaño, mayor densidad de FT y por generar una activación exacerbada del gen regulado. Otros autores afirman que cada elemento del super-



enhancer actúa de manera independiente, y el conjunto genera un efecto aditivo y no de sinergia (Hay *et al.*, 2016). De cualquier manera, se especula que los genes regulados por estos elementos podrían ser relevantes en ese tipo celular, dado que suelen ser genes de expresión específica que definen la identidad celular. Asimismo, apoyando esta idea, no se encontraron super-enhancer en genes de expresión ubicua (Hnisz y Abraham, 2014).

Como mencionamos anteriormente, distintos trabajos asignaron un super-enhancer con alto posicionamiento de Oct4, Sox2 y Nanog en la región promotora de *Myst4*. La distancia encontrada desde este elemento al gen regulado fue de gran tamaño. Por esta razón, es importante estudiar la regulación transcripcional en el contexto genómico, donde la organización tridimensional de la cromatina hace que un gen pueda estar regulado por regiones muy lejanas en la cadena de DNA (Ji *et al.*, 2016). En CME, más del 80% de los genes con unión de Oct4 y Sox2 en sus enhancers se encuentran a más de 50 kb del sitio de inicio de la transcripción (Matsuda *et al.*, 2017). Debido a esto, para el estudio de la regulación de la expresión génica es fundamental entender las limitaciones de los ensayos reporteros para analizar regiones regulatorias, y la necesidad de complementar éstos con estudios en el contexto cromatínico endógeno.

Por otra parte, en relación a los alcances y limitaciones de los diferentes abordajes experimentales, particularmente para el estudio de la función de un determinado gen, se destaca la realización de una línea *knockout* con respecto al silenciamiento por shRNA, dado que no hay expresión residual que pudiera influenciar los resultados obtenidos. Al inicio de este trabajo intentamos silenciar *Myst4* mediante la estrategia de shRNA, pero, como mencionamos, no tuvimos éxito. En una etapa posterior, surgió la posibilidad de utilizar la herramienta de CRISPR/Cas9, la cual revolucionó la ingeniería genética en los últimos 5 años por ser eficiente, simple y económica en comparación con las técnicas utilizadas previamente para la edición génica (Terns y Terns, 2014). En nuestra experiencia, esta técnica resultó ser altamente eficiente, dado que en un primer abordaje se obtuvo una gran cantidad de clones con mutaciones en el gen de interés. Esta herramienta podría generar mutaciones *off target* en regiones genómicas no deseadas.

Para que esto no ocurra, es fundamental el diseño inicial del sgRNA que se va a utilizar. La herramienta bioinformática *CRISPR Design Tool* nos permitió diseñar sgRNA con un índice de probabilidad de *off target* muy bajo. Sin embargo, para confirmar la ausencia de mutaciones en una región no deseada, algunos autores proponen la secuenciación de todo el genoma (Ran *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, no realizamos este control, dada la baja probabilidad de *off target* y los costos implicados.

Al utilizar esta herramienta para la realización de una línea *knockout* en las células parentales 46C, si bien observamos una importante reducción, detectamos la presencia de mínimas cantidades de Myst4 en algunas muestras proteicas, por lo que esta línea no resultó ser un verdadero *knockout*. Esto pudo deberse al inicio de la traducción de la proteína en un codón de inicio interno. De ser así, éste debería encontrarse muy próximo al codón de inicio del gen *wild type*, dado que el tamaño de la proteína evidenciado por Western blot sigue siendo similar. Si bien esto podría ocurrir con baja frecuencia, explicando la importante reducción en los niveles, la presencia de proteína detectable no nos permite estudiarla como línea *knockout*. Por otro lado, otra explicación para la presencia de proteína de Myst4 en la línea obtenida es que no se trate de un clon único, sino que haya ocurrido una contaminación con otro clon que no presente mutaciones en el gen de Myst4 y se encuentre en muy baja proporción. De ser este el caso, especulamos que deberíamos haberlo detectado en la secuenciación, dado que amplificamos el DNA genómico de la población celular. Sin embargo, si la contaminación se encuentra en muy baja relación respecto al clon mutante, aunque improbable, es posible que no haya sido detectada en la secuenciación. Planeamos realizar de todas formas una nueva expansión clonal de esta línea para descartar esta hipótesis. A pesar de esta incertidumbre, como ya mencionamos, la expresión de Myst4 observada en esta línea resultó altamente disminuida en todos los casos en comparación con la línea 46C WT, por lo que es probable que sea útil para estudiar la función de este gen. Continuaremos utilizándola para evaluar la eficiencia de diferenciación a progenitores neurales, por la ventaja de ser reportera de este tipo celular.

Como mencionamos previamente, mutaciones en el gen de *Myst4* se encuentran asociadas a los síndromes Say-Barber/Biesecker/Young-Simpson (SSBYS) y Genitopatellar (GPS) (Clayton-Smith *et al.*, 2011; Campeau *et al.*, 2012; Szakszon *et al.*, 2013). Además, este remodelador sería importante para el establecimiento y auto-renovación de células madre neurales de ratón (Merson *et al.*, 2006). Estos antecedentes sugieren que *Myst4* podría estar implicado en la regulación del desarrollo neural. Sin embargo, no es el único modificador de la cromatina asociado a este tipo de enfermedades. La secuenciación de exomas humanos y estudios *genome-wide* realizados en muestras de pacientes han asociado muchas enfermedades neurobiológicas a mutaciones en genes que codifican para remodeladores de la cromatina (Varilly y Chandler, 2012; Tatton-Brown *et al.*, 2017). Estas mutaciones pueden tener efectos profundos en el desarrollo y en la cognición adulta. Por ejemplo, mutaciones identificadas en *metil CpG binding protein 3* (MECP3) causan el síndrome de Rett (McGraw, Samaco y Zoghbi, 2012; Heckman, Chahrour y Zoghbi, 2014), en la acetiltransferasa CBP producen el síndrome Rubinstein-Taybi (Petrij *et al.*, 1955; Wang *et al.*, 2010), en proteínas de complejos SWI/SNF causan el síndrome Coffin-Siris (CSS) (Tsurusaki *et al.*, 2012) y síndrome Nicolaides-Baraitser (NBS) (Van Houdt *et al.*, 2012), en la deacetilasa HDAC4, síndrome brachydactyly mental retardation (BDMR) (Williams *et al.*, 2010), y en EZH2, una subunidad del complejo PCR2, causan el síndrome Weaver (Gibson *et al.*, 2012), entre otras. Todos estos síndromes, sumados a los generados por mutaciones en *Myst4*, se caracterizan por defectos en el desarrollo del sistema nervioso y discapacidad intelectual. En conjunto, estos antecedentes sugieren que durante el desarrollo neural es necesaria una regulación epigenética muy controlada para lograr una expresión génica adecuada en tiempo y espacio.

En base a los antecedentes antes descriptos, especulamos que la ausencia de *Myst4* podría tener algún efecto en la diferenciación hacia células neurales. Sin embargo, tanto en la formación de teratomas como en el protocolo de diferenciación *in vitro* no dirigido de *Hanging drop*, observamos representación de este tipo de células en la línea W4 M4 *-/-*, indicando que la ausencia de *Myst4* no impide la diferenciación hacia este linaje. De la misma manera, en el protocolo dirigido hacia progenitores neurales, las

células mutantes lograron diferenciarse hacia células con expresión de marcadores de ese tipo celular, como Nestina, Sox1, Tubb3 y Blbp. Sin embargo, observamos una diferencia en el número de células a lo largo del protocolo, encontrando una mayor cantidad en la línea *knockout*. Este aumento en el número de células coincide con el mayor tamaño de los tumores generados en el ensayo *in vivo*. La cantidad de células presentes en un determinado momento es producto del balance entre diferentes procesos, por lo cual esta diferencia entre las dos líneas celulares podría deberse a una mayor proliferación o a una menor muerte celular, o a ambos. Existen evidencias de la participación de acetiltransferasas de histonas con un dominio Myst en estos procesos. Mutaciones en Enok, una HAT de la familia Myst en *Drosophila*, produce un arresto en la proliferación de neuroblastos, generando defectos en la formación del cerebro de la mosca (Scott, Lee y Luo, 2001). Por otro lado, estudios en *S. cerevisiae* mostraron que mutaciones en Sas3, homólogo de Myst3, y Gcn5, otra HAT, afectan la proliferación al arrestar a las células en la fase G2/M del ciclo celular (Howe *et al.*, 2001). En fibroblastos de ratón, Myst3 acetila a p53 en respuesta al daño al DNA y modula su actividad generando un arresto en el ciclo celular (Rokudai *et al.*, 2009). Con respecto a Myst4, se reportó que su silenciamiento en células de cáncer de próstata produjo una disminución en la señalización de PI3K/AKT y una disminución en la proliferación (He *et al.*, 2013). Nos encontramos evaluando si la ausencia de Myst4 produce un efecto sobre la proliferación o la apoptosis durante la diferenciación neural.

El protocolo de diferenciación a progenitor neural que utilizamos fue generado inicialmente por Ying L. y colaboradores en 2003 (Ying *et al.*, 2003; Ying y Smith, 2003) y luego desarrollado por Abranches E. y colaboradores en 2009 (Abranches *et al.*, 2009). Se ha reportado que el tercer día luego de iniciado el protocolo se produce una gran cantidad de muerte celular y las células sobrevivientes se diferencian a progenitores neurales a partir del día 4. Dado que la diferencia en la cantidad de células en la diferenciación de la línea con ausencia de Myst4 comienza a evidenciarse a partir del día 4, es posible que esta diferencia se explique por una menor apoptosis en esta etapa en la línea mutante con respecto a la línea *wild type*. Evaluaremos esta hipótesis mediante análisis del proceso de

apoptosis como detección de clivaje de Caspasa3 y Parp1, fragmentación de DNA y alteración de la membrana plasmática.

Además de encontrar un mayor número de células, observamos menores niveles de expresión del marcador de progenitores neurales Sox1 en las células W4 M4 -/- con respecto a las células *wild type* a día 6 de diferenciación neural. Esta disminución está acompañada por un aumento en la expresión del marcador de mesodermo Brachyury en esas mismas condiciones. Estos resultados podrían reflejar una disminución en la eficiencia de diferenciación hacia el linaje neural, presentando células diferenciadas hacia otros tipos celulares, posiblemente derivados de mesodermo. Se ha descrito previamente la existencia de células contaminantes en este protocolo de diferenciación (Abranches *et al.*, 2009). Estas células pueden ser grupos de células madre indiferenciadas, que mantuvieron la pluripotencia, o células planas no neurales. No se ha reportado la identidad celular de estas últimas, sino que fueron definidas por su morfología y por la ausencia de señal de progenitores neurales. Por otro lado, al estudiar la diferenciación de la línea 46C a mesendodermo, Thomson y colaboradores encontraron la activación de Brachyury y de Sox1 en la misma población celular (Thomson *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando observaron células únicas, evidenciaron que la expresión de estos marcadores era mutuamente excluyente, es decir, no observaron células simultáneamente expresando Brachyury y Sox1. Dado el aumento en la expresión de Brachyury encontrado en la línea W4 M4-/-, planeamos evaluar si éste se debe a un aumento de células no neurales expresando este marcador, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

En un futuro nos proponemos estudiar el rol de *Myst4* en la neurogénesis y gliogénesis durante la diferenciación *in vitro* de CME hacia este tipo de células. Esto puede realizarse como una continuación del protocolo utilizado, mediante el repique de los progenitores neurales en placas tratadas con laminina, ensayo que actualmente nos encontramos poniendo a punto. Avances recientes en la investigación con células madre prometen la derivación de neuronas y células de la glía a partir de CME y de CMPI para la

reparación neural (Khazaei, Ahuja y Fehlings, 2017; Wei *et al.*, 2017). Además, la reprogramación de células de pacientes y posterior diferenciación a células neurales es una estrategia promisoría para estudios tanto de mecanismos degenerativos como para la evaluación de fármacos, dado que las células humanas afectadas por enfermedades neurológicas son inaccesibles para su aislamiento para estudios *in vitro* (Han, Williams y Egan, 2011). Por estas razones, es importante conocer los mecanismos moleculares que permiten esta diferenciación específica, tanto para comprender el desarrollo de este sistema como para lograr perfeccionar las técnicas de diferenciación de CMP hacia diversos tipos celulares neurales.

Cuando estudiamos el patrón de expresión de *Myst4*, encontramos altos niveles en CME y una disminución significativa cuando las células salieron del estado indiferenciado para iniciar un proceso de diferenciación, tanto en protocolos no dirigidos como dirigidos a progenitor neural. Un protocolo no dirigido puede generar varios tipos celulares y con distintos niveles de representación en diferentes repeticiones, por lo cual, al medir la expresión de genes marcadores de distintos linajes, se encuentra una gran variabilidad entre réplicas biológicas. Por otra parte, a diferencia de los protocolos dirigidos, en este tipo de protocolos también es posible que ciertos marcadores no sean detectados por variabilidad de la ventana temporal en la que se expresan. Sin embargo, la variabilidad de los protocolos no dirigidos puede ser una ventaja al querer estudiar procesos generales de la diferenciación, independientes del tipo celular al que se diferencian. Además, resultan más prácticos y económicos para evaluar la pluripotencia que realizar protocolos de diferenciación dirigidos a cada linaje separadamente.

En este trabajo, observamos representación de las tres capas germinales en las células diferenciadas por el protocolo de *Hanging drop*, el cual representa la diferenciación que ocurre en el embrión postimplantatorio temprano (Desbaillets *et al.*, 2000). En el protocolo no dirigido por ausencia de LIF y 2i, en cambio, no observamos un aumento de estos marcadores de diferenciación tardía. Esto puede deberse a que este protocolo, a los días evaluados, representa una diferenciación temprana, aún sin

evidenciar marcadores de las tres capas germinales. Sí observamos un aumento de marcadores de diferenciación temprana como Fgf5 y Dnmt3A. Por otra parte, existen evidencias que sugieren que este protocolo no logra generar progenitores neurales por la presencia de SFB en el medio de cultivo, el cual contiene BMP4 que inhibe la diferenciación neural (Ying y Smith, 2003). Para verificar si con este protocolo no dirigido es posible obtener células representantes de las tres capas embrionarias habría que evaluar la diferenciación a tiempos más largos y midiendo además otros marcadores de ectodermo no neurales. Si bien mediante este último protocolo no detectamos marcadores de diferenciación hacia estos linajes, pudimos comprobar que las CME con ausencia de *Myst4* son pluripotentes tanto mediante el protocolo de *Hanging drop* como por el ensayo de formación de teratomas.

Tim Thomas y sus colegas caracterizaron la expresión de *Myst4* durante el desarrollo embrionario de ratón, encontrando alta expresión en el macizo celular interno del blastocisto y luego en el período de neurogénesis en la zona ventricular de la corteza cerebral, en la cual se encuentran progenitores neurales proliferativos (Thomas *et al.*, 2000). En otro trabajo, los mismos autores reportan la expresión de *Myst4* en células madre neurales de ratones adultos (Merson *et al.*, 2006). En nuestros resultados, sin embargo, no observamos un aumento en la expresión de este gen en los progenitores neurales generados a partir de CME en cultivo por diferenciación *in vitro*. Esta discrepancia podría deberse a que el entorno proporcionado por el resto del tejido en el contexto natural del organismo difiere de las condiciones del cultivo celular aislado. La expresión de *Myst4* en diferentes tejidos y etapas del desarrollo evidencia la pleiotropía de este gen, que puede cumplir diferentes funciones dependiendo del contexto celular. Este trabajo de tesis contribuye al conocimiento de la relevancia de este remodelador en CME, la cual no había sido previamente estudiada.

El hecho de que la expresión de *Myst4* esté restringida al estado indiferenciado en nuestro modelo de estudio, nos hizo pensar que era probable que ésta se encuentre regulada por los FT de CMP y que podría cumplir una función en el estado pluripotente. En

la línea *knockout* sin expresión de este remodelador, observamos una diferencia morfológica en el estado indiferenciado respecto a la *wildtype*, pero no se modificaron los niveles de los marcadores de pluripotencia y de diferenciación temprana que analizamos. Es posible que, al no estar presente un remodelador de la cromatina, cambie la expresión de ciertos genes que no hayamos analizado. Sería interesante realizar un estudio de secuenciación masiva del RNA comparando la línea W4 M4 *-/-* con la *wildtype* para analizar esta regulación, tanto en estado indiferenciado como en diferenciación. Por otro lado, analizar los niveles de expresión de FT a nivel de RNA o proteína no es suficiente para estudiar su actividad. Es posible que los efectos de la ausencia de este remodelador se encuentren en la dinámica de unión de estos FT a la cromatina. Nos encontramos estudiando la dinámica del factor Oct4 y de la cromatina mediante la técnica de microscopía avanzada FCS en colaboración con el grupo de la Dra. Valeria Levi, comparando células W4 M4 *-/-* con W4 WT. De acuerdo a los resultados obtenidos estudiaremos también la dinámica de Oct4 en la diferenciación y la de los FT Sox2 y Nanog.

Con respecto a la actividad de Myst4, aún se desconocen las modificaciones de acetilación que ésta realiza en la Histona H3. Se ha reportado que reconoce las acetilaciones convencionales de lisina 9 y 14 y podría contribuir a la propagación de estas marcas (Ali *et al.*, 2012). Un trabajo reciente afirma que Myst4 genera la acetilación de la lisina 23 de la histona H3 (Simo-Riudalbas *et al.*, 2015), la cual generalmente se asocia a activación génica, pero cuya relevancia no ha sido estudiada en profundidad. Por otro lado, dado que, como mencionamos previamente, otro miembro de la familia Myst acetila a la proteína p53 (Rokudai *et al.*, 2009), es posible que Myst4 también tenga otros sustratos aún no reportados. Su identificación podría permitir dilucidar su rol en la expresión génica y posiblemente su participación en otros procesos celulares. Debido a esto, sería interesante evaluar marcas de acetilación total y específicas de la histona H3 comparando la línea con ausencia de Myst4 con la *wildtype*, y así contribuir al conocimiento de los sustratos de la actividad de esta acetiltransferasa.



El efecto de un remodelador de la cromatina suele estudiarse en el contexto espacio temporal en el que actúa. Sin embargo, puede ocurrir que una marca generada por un remodelador en un momento sea “leída” en otro momento en la vida de una célula. Reportamos que *Myst4* se expresa en altos niveles sólo en el estado indiferenciado, y sin embargo las diferencias en el crecimiento de la línea *knockout* fueron encontradas durante la diferenciación, cuando normalmente hay una expresión muy baja de este remodelador. Estos hallazgos sugieren que esta HAT podría generar modificaciones en la cromatina durante el estado indiferenciado, pero que se ponen en evidencia recién durante el proceso de diferenciación. Para estudiar esta hipótesis, proponemos modular de manera inducible la expresión de *Myst4*, tanto en el estado indiferenciado, como en diferentes etapas a lo largo de distintos procesos de diferenciación. La línea con modulación inducible de dCas9-KRAB y con sgRNA que se dirigen al promotor de *Myst4* podría funcionar para este propósito, produciendo un bloqueo en la transcripción del gen de *Myst4* mediante el agregado de Doxiciclina al medio de cultivo. Si la modificación en la cromatina que genera *Myst4* en el estado indiferenciado es leída durante la diferenciación, entonces al silenciar este gen en células indiferenciadas y luego liberarlo al inicio de la diferenciación, se deberían encontrar los mismos efectos que en la línea *knockout*. Por otro lado, si *Myst4* se expresa en el estado indiferenciado e inhibimos su transcripción mediante el agregado de Doxiciclina al inicio de la diferenciación, según nuestra hipótesis, las células deberían comportarse como la línea W4 WT, dado que su patrón de expresión normalmente es de esta manera. Por otra parte, es probable también que ejerza su efecto durante la diferenciación aun expresándose a bajos niveles. Esperamos que los experimentos que planeamos realizar con la línea inducible nos permitan dilucidar esta incógnita.

Será muy interesante evaluar esta hipótesis, dado que habla de una regulación espacio temporal muy precisa de la expresión génica ejercida por un remodelador de la cromatina, y contribuiría a las evidencias de un estado indiferenciado con mucha más información de la que se conoce en la actualidad. No descartamos la necesidad de generar una línea inducible mediante la misma estrategia pero para la activación del gen, con una

línea estable con dCas9 fusionada a un activador de la transcripción como VP64 o p300, las cuales están siendo generadas en nuestro laboratorio. Esta línea podría complementar los resultados obtenidos permitiéndonos lograr un entendimiento más profundo de la función de este gen.

Con el propósito de identificar genes regulados por los FT pluripotentes de CMP, trabajos previos realizaron el silenciamiento individual de éstos y analizaron su efecto sobre el transcriptoma (Ivanova *et al.*, 2006; Loh *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007). El resultado es eventualmente la diferenciación de estas células, dado que son necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado. La ausencia de estos factores produce una desregulación de la red transcripcional y genera expresión de genes de diferenciación. Nuestro diseño experimental incluyó el silenciamiento de Oct4 y/o Nanog en CME y la posterior evaluación de su efecto en la expresión génica. La expresión de *Myst4* disminuyó significativamente cuando fue silenciado Oct4, Nanog o los dos FT juntos. Este resultado sugiere que su expresión podría estar regulada directa o indirectamente por estos FT. Dado que Nanog también es reprimido cuando se silencia Oct4, cabe la posibilidad de que el efecto en la expresión de *Myst4* en este caso no sea por el silenciamiento mismo de Oct4, sino por la consecuente represión de Nanog. En este caso, la regulación de la expresión de *Myst4* estaría dada por Nanog y no por Oct4 de manera directa. En concordancia con esta hipótesis, estudios de RNAi y posterior evaluación por microarray en CME mostraron que *Myst4* fue reprimido cuando se silenció Nanog. Sin embargo, no se modificó su expresión cuando se silenció Oct4 (Loh *et al.*, 2006). Esta diferencia con nuestros resultados podría deberse a que el tiempo en el que se analizó el efecto del silenciamiento no haya sido suficiente para evidenciar un efecto indirecto como el que observamos en nuestro análisis. Por otra parte, los ensayos *genome wide* son muy útiles para realizar *screening* a gran escala, pero sus resultados habitualmente presentan falsos negativos y positivos, por lo que requieren posterior validación de los genes de interés.

Sumado a estas evidencias, el patrón de expresión de *Myst4* fue similar al de Nanog en todos los protocolos analizados, y se ha reportado que la expresión de este FT

correlaciona positivamente con la expresión de *Myst4* en CME cultivadas con suero (Kolodziejczyk *et al.*, 2015). *Nanog* es uno de los primeros factores en silenciarse al salir del estado indiferenciado, y es marcador del estado *ground state* de pluripotencia. Estos resultados, junto con los obtenidos por estudios de ChIP, sugieren que *Nanog* es un importante regulador de la expresión de *Myst4*. Falta determinar la relevancia de esta relación, la cual podría ser bidireccional, actuando en conjunto esta HAT con *Nanog* para modular la expresión de genes relacionados con la pluripotencia.

La comprensión de los mecanismos epigenéticos y moleculares que ocurren en células madre en estado indiferenciado y en distintos estadios de diferenciación es de gran importancia para lograr la optimización tanto de protocolos de diferenciación hacia linajes de interés, como de desdiferenciación para aumentar la eficiencia de obtención de CMPI. Creemos que conocer y mejorar los mecanismos básicos implicados en estos procesos posibilitará la futura aplicación de las células madre pluripotentes en el área de la medicina regenerativa.

## 5.1. Perspectivas

Este trabajo de tesis se enmarca en un proyecto de investigación que continuaremos estudiando durante mi postdoctorado. A lo largo de este trabajo se generaron nuevas preguntas e hipótesis que investigaremos en la siguiente etapa. A continuación realizamos una descripción sintética de las perspectivas a futuro, algunas de las cuales nos encontramos evaluando actualmente.

- Estudiar si el aumento en el número de células evidenciado en la diferenciación a progenitor neural en la línea W4M4  $-/-$  se debe a un aumento en la proliferación por análisis del ciclo celular por tinción del DNA con ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo y específicamente por estudio de la replicación mediante incorporación de un análogo de nucleótido como BrdU o EdU.
- Evaluar si el mencionado aumento en el número de células se debe a una disminución en la apoptosis mediante análisis de marcadores de este proceso, como detección de clivaje de Caspasa3 y Parp1, por Western blot, fragmentación de DNA, mediante la técnica de TUNEL y alteración de la membrana plasmática, mediante ensayo de Anexina V y Ioduro de Propidio.
- Evaluar el potencial de diferenciación a progenitor neural de la línea 46C (promotor de Sox1-GFP) con expresión disminuída de Myst4 mediante análisis de la eficiencia por determinación del número de células con expresión de GFP mediante citometría de flujo y análisis cuantitativo de imágenes de microscopía de fluorescencia.

- Analizar el efecto de la ausencia de Myst4 en la dinámica de unión al DNA de distintos FT en estado indiferenciado por la técnica de microscopía avanzada FCS y el estado de compactación de la cromatina mediante análisis de distribución de las proteínas de fusión H2B-cherry y HP1-GFP.
- Generar líneas inducibles para el bloqueo transcripcional o la inducción del gen endógeno de Myst4 utilizando CRISPRi y estudiar el efecto de esta modulación en diferentes estadios de las CME.

# 6. MATERIALES Y MÉTODOS

## 6.1. Cultivo celular

### 6.1.1. Cultivo de CME de ratón en estado indiferenciado

Trabajamos con las líneas de CME de ratón R1, adquirida comercialmente (ATCC), W4 y 46C, cedidas generosamente por el Dr. Ali Brivanlou (*Rockefeller University*, EEUU) y por el Dr. Austin Smith (*Cambridge Stem Cell Institute*, Reino Unido), respectivamente. Para el mantenimiento del stock celular en estado indiferenciado, las células fueron cultivadas en medio de propagación (MP). El mismo se compone de *high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 2 mM Glutamax, 100 mM MEM aminoácidos no esenciales, 0,1 mM 2-mercaptoetanol, penicilina-estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente), en presencia de 15% SFB. Adicionalmente, el MP fue complementado con la citoquina LIF y con los inhibidores de MEK y GSK3, denominados en conjunto 2i, para el mantenimiento en el estado indiferenciado. La citoquina LIF fue obtenida a partir del medio condicionado por una línea de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), que se encuentra modificada genéticamente para sobreexpresar la citoquina LIF en el medio de cultivo (CHO-LIF). El protocolo de obtención de LIF a partir de células CHO-LIF se detalla en la siguiente sección. Los inhibidores se componen de 0,5 µM PD0325901 (Tocris) y 3 µM CHIR99021 (Tocris). Todos los reactivos, a menos que esté indicado, fueron obtenidos de Gibco (Thermo Fisher Scientific).

La propagación del stock celular se llevó a cabo en placas pre-tratadas con gelatina de piel bovina (Sigma) al 0,1% en PBS durante 15 minutos a 37°C. Este paso se realiza para aumentar la adherencia celular de las CMP. Las placas con células fueron mantenidas en una estufa a 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> de 5% v/v. Las células fueron normalmente re-plaqueadas cada 72 h, cuando llegaron a una confluencia de 80% aproximadamente, mediante un protocolo convencional de tripsinización.

### **6.1.2. Cultivo de células CHO y obtención de LIF**

La obtención de LIF a partir de células de la línea CHO-LIF se realiza comúnmente en laboratorios con cultivos de CMP, dado que resulta más económico que el LIF recombinante y es equivalente en su funcionamiento. Las células de esta línea contienen integrado en el genoma el plásmido 8/242 720 LIFD de *Genetics Institute*, Cambridge, que codifica para la sobreexpresión de la citoquina LIF y su secreción al medio de cultivo. Para la obtención del medio condicionado (MC), se cultivó esta línea en placas de 10 cm de diámetro (p100) con 10 ml *high-glucose* DMEM suplementado con SFB al 10%, 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina, Gibco). Las células se mantuvieron hasta alcanzar una confluencia del 90% aproximadamente, y luego se cosecharon para plaquear en una densidad de  $1 \cdot 10^6$  células por 1 ml de medio fresco en placas p100. Las placas se incubaron por 48 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, luego de las cuales se obtuvo el MC con LIF, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y se transvasó el sobrenadante a un tubo estéril. Posteriormente, se evaluaron distintas diluciones del MC con LIF en el medio de cultivo de CME. Como controles de estado indiferenciado y de diferenciación se utilizaron CME con LIF comercial y CME sin el agregado de LIF, respectivamente. Se evidenció la diferenciación de las células por morfología, y se determinó la mínima dilución en la cual las células se mantuvieron indiferenciadas, la cual comúnmente se encuentra en relación 1:1000 (MC CHO-LIF: MP).

### **6.1.3. Congelamiento y descongelamiento de células**

Para el mantenimiento de los stocks a largo plazo, las distintas líneas celulares fueron conservadas en nitrógeno líquido. Para el congelamiento, las células se cosecharon de manera habitual, se centrifugaron a 1100 rpm por 5 min, y se resuspendieron en 700 µL de MP. Luego, se agregaron 200 µL de SFB y 100 µL de DMSO (Concentración final >25% SFB y 10% DMSO). Finalmente, se colocó la suspensión de células en un criotubo

dentro de un recipiente que contiene isopropanol (*Mr. Frosty Freezing Container*, Nalgene) para lograr un enfriamiento gradual, y se incubó durante toda la noche a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se colocaron los criotubos en un tanque con nitrógeno líquido, donde son mantenidos por tiempo indefinido.

Para el descongelamiento de células, se tomó el criotubo de interés del tanque de nitrógeno líquido, y rápidamente se descongeló utilizando un baño térmico a  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelado, se procedió a la dilución del medio de congelamiento con 4 ml de MP fresco, y se centrifugó 5 minutos a 1100 rpm. Estos pasos se realizaron de manera rápida dado que el DMSO resulta tóxico para las células a temperatura ambiente (TA). Luego, se resuspendieron las células en MP y se plaquearon en placas apropiadas según la cantidad de células presentes en el criotubo. Se analizó la viabilidad celular mediante el método de exclusión con Azul de Tripan .

#### **6.1.4. Diferenciación de CME por ausencia de LIF y 2i**

Para la diferenciación de CME por ausencia de LIF y 2i, las células se cultivaron en MP, luego fueron cosechadas y resuspendidas en medio MP sin LIF ni 2i. Luego, se contó el número de células en cámara de Neubauer y se plaquearon en una densidad de  $1 \times 10^5$  células en placas *multiwell* de 6 *wells* pre-tratadas con gelatina 0,1%, con 2 ml de MP sin LIF ni 2i. Se realizó un cambio de medio al día 2 de iniciado el protocolo de diferenciación y se extrajo RNA a días 0, 2 y 4 utilizando el reactivo TRIzol. (TRIzol™ Reagent, Thermo Fisher Scientific).

#### **6.1.5. Diferenciación de CME por *Hanging drop***

Para la diferenciación de CME por *Hanging drop*, las células se cultivaron en MP, luego fueron cosechadas y resuspendidas en medio MP sin LIF ni 2i con 20% SFB (medio de diferenciación). Se contó el número de células en cámara de Neubauer y se



resuspendieron 40000 células en 1 ml de MP sin LIF ni 2i con 20% SFB. Luego, con esta suspensión de células se realizaron gotas de 25  $\mu$ L en la tapa de una placa no adherente de 100 mm, de manera que se utilizaron 1000 células por gota. Posteriormente, se giró la tapa para que las gotas se encuentren colgando, y se agregó 1 ml de PBS a la base de la placa para proporcionar humedad y evitar que las gotas se sequen en la estufa de cultivo. De esta manera las células caen al fondo de la gota y forman la estructura de cuerpo embriode. Se mantuvieron las placas con gotas colgantes a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h y luego se tomaron esos cuerpos embrioides con una pipeta de 5 ml y se cultivaron por 72 h en suspensión en 10 ml de medio de diferenciación en una placa no adherente. Luego se pasaron los cuerpos a placas adherentes tratadas previamente con gelatina 0.1%. A partir de ese momento, las células diferenciadas comienzan a adherirse y a proliferar. Se cambió el medio por medio fresco cada 48 h. Se tomaron muestras para extracción de RNA a día 0 de iniciado el protocolo y a día 11 de iniciada la adherencia, utilizando el reactivo TRizol. En la Figura 3-5 se encuentra un esquema de este protocolo.

#### **6.1.6. Diferenciación de CME a progenitores neurales**

Para realizar la diferenciación de CME a progenitores neurales, se utilizó un medio definido sin suero. El mismo está compuesto por una mezcla 1:1 de los medios base DMEM-F12 y Neurobasal, complementados con suplemento N2, suplemento B27, 2 mM Glutamax, 25  $\mu$ g/ml BSA, 10  $\mu$ g/ml insulina, 0,1 mM 2-mercaptoetanol y penicilina-estreptomina (100 U/ml y 100  $\mu$ g/ml, respectivamente). Todos los reactivos, a menos que esté indicado, fueron obtenidos de Gibco (Thermo Fisher Scientific). El día previo a la diferenciación, las células mantenidas en MP son cosechadas, y resuspendidas en medio definido, utilizando el suplemento B27 sin Vitamina A y con el agregado de LIF y 2i para el mantenimiento del estado indiferenciado. Se contó el número de células y se plaquearon  $1 \times 10^6$  células en un well de multiwell de 12 tratado previamente con gelatina 0.1%, en condiciones de alta densidad de células. Al día siguiente, las células se cosecharon, y se plaquearon en medio definido de diferenciación, con el suplemento B27 con Vitamina A, a

una densidad de  $1 \times 10^5$  células en placas de 35 mm tratadas previamente con gelatina 0.1%. Se cambió el medio por medio fresco cada 48 h. De esta manera, las CME se diferencian a precursores neurales, los cuales comienzan a aparecer a partir del día 4 de diferenciación, constituyendo generalmente un 80-90% de población a día 6. Se evaluó la eficiencia de diferenciación a progenitores neurales analizando la morfología de las células y por la expresión de marcadores de este tipo de células como Sox1 y Nestina. En los casos en que se utilizó la línea reportera 46C, la cual fue modificada genéticamente para expresar GFP bajo las órdenes del promotor de Sox1 (Ying *et al.*, 2003), evaluamos la eficiencia midiendo la expresión de GFP por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo.

#### **6.1.7. Diferenciación *in vivo*: generación de teratomas**

Para la generación de teratomas a partir de CME, las células fueron cultivadas en MP, luego fueron cosechadas y resuspendidas en DMEM en ausencia de SFB a una densidad de  $1.10^7$  células/ml. Posteriormente, se inyectaron 100  $\mu$ L de la suspensión de células de manera subcutánea en el flanco dorsal de ratones macho inmunosuprimidos (cepa nude *nu/nu*) de 6 - 8 semanas de edad. Se realizaron 10 inyecciones con la línea W4 WT y 10 con la línea W4 M4 *-/-*, distribuidas aleatoriamente en 10 ratones con 2 sitios de inyección cada uno. Las inyecciones se realizaron en tres días diferentes con un stock distinto de células cada día. Se controló una vez por semana la aparición de algún tumor en el sitio de inyección. Cuando los tumores tenían un diámetro aproximado de 1 cm, los animales fueron sacrificados en una cámara con CO<sub>2</sub> y por dislocación cervical. Los tumores se removieron quirúrgicamente, se midió el tamaño y se fijaron en formaldehído 4% en PBS. Posteriormente, se realizaron técnicas histológicas con tinción con hematoxilina y eosina para la visualización de los tejidos formados. El trabajo con ratones se realizó de acuerdo a las normas éticas locales y el protocolo fue aprobado por la

CICUAL de la FCEN, UBA. El análisis histológico fue realizado por el Dr. Gustavo Sevlever (FLENI), investigador colaborador de nuestro grupo, médico especialista en patología.

#### **6.1.8. Transfección transitoria de células**

La transfección transitoria de las células se realizó utilizando el agente polietilenimina (PEI, Poliscience Inc), el cual genera complejos con el DNA plasmídico que son endocitados por las células. Generalmente, las células fueron plaqueadas en MP en la superficie requerida el día previo a la transfección. El día de la transfección, se realizó una mezcla de DNA plasmídico con el PEI en medio OPTIMEM (Gibco) en una relación de 1µg DNA : 5µl PEI. La mezcla se resuspendió con vortex por 15 segundos y se incubó 15 minutos a TA. Luego, los complejos formados se agregaron en forma de gotas a las placas con células. Incubamos las placas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> realizando un cambio de medio por medio fresco al día siguiente a la transfección, y luego a las 48 h.

#### *Silenciamiento de FT Oct4 y Nanog en la línea de CME R1*

Para realizar el silenciamiento de Oct4 y Nanog, las células de la línea R1 fueron cultivadas en MP, luego fueron cosechadas y plaqueadas en MP en una densidad de  $3 \times 10^5$  células en placas de 60 mm. Al día siguiente, fueron transfectadas utilizando PEI como se describió anteriormente, con los plásmidos pLKO shNanog, pLKO shOct4, ambos plásmidos juntos o el control pGFPI. Al día siguiente, se cambió el medio por medio fresco con 3µg/ml de Puomicina (PURO). Se repitió el cambio de medio con PURO al segundo día, y se cosecharon las células seleccionadas al tercer día post-transfección. En la figura Figura 3-9 se muestra un esquema del protocolo utilizado. Se tomó el RNA utilizando el reactivo TRIzol.

### 6.1.9. Detección de contaminación con *Mycoplasma*

Uno de los mayores riesgos de contaminación en células en cultivo es por bacterias del género *Mycoplasma*. Este tipo de contaminación es intracelular y afecta muchas de las funciones de las células, por lo que se debe realizar un control periódico de su presencia y descartar las células que resulten positivas. Para detectar la presencia de estas bacterias, que no se detectan mediante el control microscópico de rutina, se realizó la extracción de DNA genómico de las líneas celulares a estudiar y se analizó por PCR a punto final la amplificación de DNA bacteriano con primers específicos de un gen de estas bacterias. El producto de PCR tiene un tamaño de 500 pb y se evidencia en un gel de agarosa 1%. Utilizamos también primers que amplifican el gen GAPDH de ratón como control positivo de presencia de DNA genómico. Los primers utilizados se detallan en la sección correspondiente.

## 6.2. Técnicas microbiológicas

### 6.2.1. Plásmidos utilizados

A continuación se presenta una lista de los plásmidos utilizados en este trabajo de tesis.

Nombre	Descripción
pLKO shNanog	Expresión de shRNA para silenciamiento de Nanog
pLKO shOct4	Expresión de shRNA para silenciamiento de Oct4
TET-pLKO shMyst4 A, B y C	Expresión inducible por Doxiciclina de shRNA para silenciamiento de Myst4

<b>pLKO GFPi</b>	Expresión de shRNA para silenciamiento de GFP
<b>pSpCas9(BB)-2A-GFP-PURO</b>	Expresión de Cas9 y sgRNA, Resistencia a Puromicina y eGFP
<b>pMD2.G</b>	Expresión de la envoltura lentiviral VSV-G
<b>psPax2</b>	Expresión de la cápside, la transcriptasa reversa (gag/pol) y proteínas regulatorias lentivirales
<b>pHAGE TRE dCas9-KRAB</b>	Expresión inducible por Doxiciclina de dCas9 fusionada al dominio represor KRAB

### 6.2.2. Obtención de bacterias ultracompetentes

Para la obtención de bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, siguiendo las indicaciones del método Inoue para preparación de “ultracompetentes” (Sambrook y W Russell, 2001). Se determinó la eficiencia mediante la transformación con un plásmido de concentración conocida, sembrando tres diluciones de las bacterias transformadas (1:10, 1:100 y 1:1000) en placas con medio LB con Ampicilina. La eficiencia de transformación se determinó como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico, y se encontró en el orden de  $10^6$  UFC/ $\mu\text{g}$ . Se conservó el stock de bacterias ultracompetentes en alicuotas a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 6.2.3. Transformación de bacterias ultracompetentes

Se realizó la transformación de bacterias ultracompetentes siguiendo las indicaciones del método de golpe de calor (*heat shock*) (Sambrook y W Russell, 2001). Luego, las bacterias fueron sembradas en placas con LB-agar conteniendo el antibiótico

Ampicilina. Las placas se mantuvieron a 37°C y al día siguiente se evaluó la presencia de colonias de bacterias transformadas.

#### **6.2.4. Preparación de DNA plasmídico en pequeña y mediana escala**

Para la preparación de DNA plasmídico a pequeña escala con fines analíticos, se utilizó el protocolo de *miniprep*, siguiendo las indicaciones del método de Birnboim y Doly (Bevan, Lane y Cb, 1979), que se basa en la lisis alcalina de bacterias utilizando NaOH y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS).

Para la preparación de DNA plasmídico a mediana escala se utilizó el kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el DNA plasmídico fue cuantificado por su absorbancia a 260 nm, mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000, y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Este método se utilizó para lograr una mayor concentración y pureza del plásmido para su posterior uso en cultivo para transfección de células, o para realizar clonados subsiguientes.

### **6.3. Generación de líneas estables de CME**

#### **6.3.1. Generación de líneas estables por transducción lentiviral.**

Para la generación de líneas estables por transducción lentiviral deben producirse las partículas lentivirales defectivas en su replicación que contengan el DNA que se desea integrar en el genoma. Con este propósito, utilizamos como células empaquetadoras a la línea HEK 293-T (*Human Embryonic Kidney*), las cuales fueron mantenidas en placas *multiwell* de 6 *wells* con 2 ml de medio DMEM 10% FBS. Las células se transfectaron cuando se encontraban en un 80% de confluencia con el plásmido pMD2.G que codifica para la envoltura lentiviral, el plásmido psPax2, que codifica para la cápside, la

transcriptasa reversa (gag/pol) y proteínas regulatorias, y con un tercer plásmido que contiene la secuencia de DNA de interés. De esta manera, las células empaquetadoras expresan toda la maquinaria necesaria para la síntesis de las partículas lentivirales cargadas con el DNA a integrar en las células *target* y, una vez generadas, son liberadas al medio de cultivo. Es importante destacar que los lentivirus generados son defectivos en su replicación, dado que los genes que codifican para las proteínas virales carecen de las secuencias necesarias para ser empaquetados. El medio fue colectado a las 48 y 72 h luego de la transfección, y se pasó a través de un filtro 0,45  $\mu\text{m}$  *low binding* (Millipore). Luego, se complementó con 1/3 de medio fresco y 5  $\mu\text{g/ml}$  de polibreno, y se agregó a las células a transducir plaqueadas en *multiwell* de 6 *wells*. La placa fue centrifugada a 750 x g durante 45 minutos a TA (*spinfection*), y luego incubada a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio fresco.

A continuación se detallan las medidas de seguridad que se utilizaron para la manipulación responsable y segura de este tipo de agente, siguiendo las indicaciones de las guías de bioseguridad (“Lentiviral Vectors Information and Biosafety Considerations”, 2000, “Lentiviral Vectors Biosafety Guidance & Safety Protocol for Research with Lentiviral Vectors”, 2009, “Lentiviral Biosafety Manual”, 2010).

<b>Vestimenta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guardapolvo</li> <li>• Barbijo</li> <li>• Pelo recogido</li> <li>• Doble guante colocado sobre la manga del guardapolvo</li> </ul>
<b>Manejo en el flujo laminar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizar flujo laminar y estufa destinados para trabajo con partículas lentivirales</li> <li>• Recipiente de descarte con una solución de hipodorito de sodio 10%, preparada en el momento</li> <li>• Tips con filtro para pipetas automáticas</li> <li>• No utilizar bomba de vacío</li> <li>• Colocar las placas con partículas lentivirales en un recipiente</li> </ul>

	plástico para movilizarlas fuera del flujo laminar y en las estufas
<b>Decontaminación del material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sumergir el material que estuvo en contacto con partículas lentivirales en una solución de hipoclorito de sodio 10% al menos 2 h, luego descartar como residuo patogénico</li> <li>• El flujo debe decontaminarse con etanol 70% y ser irradiado con luz ultravioleta (UV) durante 30 min</li> <li>• Las micropipetas y el material utilizado en el flujo laminar deben ser tratados con etanol 70% e irradiado con luz UV durante 30 min</li> </ul>

### 6.3.2. Generación de línea de CME *knockout* contra *Myst4* utilizando la tecnología CRISPR/Cas9

Para generar la línea *knockout* contra *Myst4* se utilizó el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP-PURO, el cual codifica para la proteína Cas9 y resistencia a Puromicina, y fue modificado por el Dr. Albert Ruzo Matias de la Universidad Rockefeller para además expresar la proteína GFP. Adicionalmente, presenta un sitio de clonado para el sgRNA que direcciona a la nucleasa Cas9 al sitio *target*. De esta manera, este plásmido contiene todo lo necesario para realizar la edición génica de interés y seleccionar los clones transfectados.

Se diseñaron dos sgRNA distintos para direccionar a la nucleasa Cas9 hacia el primer exón codificante del gen de *Myst4*, utilizando la herramienta *CRISPR design* (<http://crispr.mit.edu/>). A continuación se describen las secuencias de ambos sgRNA, los cuales fueron seleccionados por poseer la menor probabilidad de *off target*.

<b>sgRNA1</b>	<b>Forward</b>	5'-CACCGATCATTACAGGCGGTCCTT-3'
	<b>Reverse</b>	5'-AAACAAGGACCGCCGTGTAATGATC-3'



sgRNA2	Forward	5'-CACCGGTTTTTCATCGGTAAAC-3'
	Reverse	5'-AAACGTTTAACCGATGAAAAACGCC-3'

Los sgRNA fueron sintetizados como oligonucleótidos con secuencia Forward y Reverse y luego fueron hibridizados para su clonado, mediante incubación a 100°C y enfriamiento gradual *Over Night* (ON). Luego, se realizó el clonado de los sgRNA en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP-PURO a través de un ensayo de digestión y ligación simultánea con la enzima de restricción Bbs1 y la enzima ligasa T4, respectivamente. Luego de la transformación de bacterias competentes, las colonias transformantes fueron evaluadas por *colony* PCR con *primers* específicos. Las bacterias transformantes seleccionadas fueron utilizadas para realizar extracción de DNA plasmídico a mediana escala, y luego los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para verificar el éxito del clonado.

Una vez obtenidos los plásmidos con los sgRNA, se realizó la transfección de las células de la línea W4 utilizando el reactivo PEI. Al día siguiente, se realizó un cambio de medio por medio fresco con 3 µg/ml de Puomicina para seleccionar las células transfectadas. Los siguientes días se monitoreó la expresión de la proteína GFP en las células sobrevivientes mediante microscopía de fluorescencia. Se continuó con la selección por 3 días, y luego se realizó una dilución de las células de forma tal de que cada una sea un clon que generara una colonia independiente. Se mantuvieron los clones en crecimiento por una semana y luego fueron aislados manualmente mediante el uso de una aguja observando las colonias con una lupa. De esta manera, se aislaron 8 clones para cada sgRNA utilizado que fueron amplificados de manera separada para evaluar posteriormente las posibles modificaciones genéticas.

Para verificar si los distintos clones presentaban inserciones o deleciones (Indels) en el gen de *Myst4*, se realizó la extracción de DNA genómico y luego PCR a tiempo final con primers que flanquean la región de interés. Se evaluó el tamaño de las bandas obtenidas mediante un gel de agarosa 1%, encontrando en los clones generados con el

sgRNA1 algunas diferencias con respecto al producto de la línea W4 WT. Las bandas fueron purificadas y secuenciadas para su evaluación de Indels. Dado que los clones generados con el sgRNA2 no mostraron diferencias con la línea *wild type*, no se continuó con su análisis. El resultado de la secuenciación reveló que el clon 10 presentaba Indels en ambas copias del gen de *Myst4*, con una delección de 1 pb en una copia y una inserción de 118 pb en la otra, las cuales generaban un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón stop prematuro. Se confirmó la ausencia de la expresión proteica de *Myst4* mediante Western blot. Luego de verificar el ciclo celular mediante tinción con ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo, continuamos utilizando el clon N°10 para el análisis de la relevancia de *Myst4* en CME, el cual fue denominado W4 M4-/-.

### **6.3.3. Generación de líneas de CME para la represión inducible de *Myst4* utilizando la tecnología CRISPRi**

Para generar una línea de CME para la represión inducible de *Myst4* es necesario realizar en primer lugar una línea de CME que contenga el plásmido pHAGE TRE dCas9-KRAB integrado en el genoma por transducción lentiviral, y luego realizar sobre ésta una segunda transducción con el plásmido que codifica para la expresión del sgRNA de interés. En este trabajo de tesis, se generó la primera línea en las células parentales W4 y 46C, realizando la transducción lentiviral y posterior amplificación de clones aislados como describimos anteriormente. Se seleccionaron clones que presentaban la integración del DNA en el genoma verificada por PCR del DNA genómico. Las líneas obtenidas fueron llamadas W4 KRAB y 46C KRAB. Se verificó la expresión de la proteína de fusión dCas9-KRAB inducible mediante el agregado de Doxiciclina 0,25-1 µg/ml al medio de cultivo por 3 días, posterior extracción de RNA y detección del RNAm de esta proteína mediante RT-qPCR.

Se diseñaron dos sgRNA distintos para direccionar a la proteína de fusión dCas9-KRAB hacia la región promotora de *Myst4*, próxima al inicio de la transcripción del gen,

utilizando la herramienta *CRISPR design* (<http://crispr.mit.edu/>). A continuación se describen las secuencias de ambos sgRNA, los cuales fueron seleccionados por poseer la menor probabilidad de *off target*.

<b>sgRNA1</b>	<b>Forward</b>	5'-CACCGTAGCCCGCCTGGCCCCGGCCG-3'
<b>pMyst4</b>	<b>Reverse</b>	5'-AAACCGGCCGGGCCAGGCCGGGCTAC-3'
<b>sgRNA2</b>	<b>Forward</b>	5'-CACCGGTCCGGGCTGCGCCCCCGGC-3'
<b>pMyst4</b>	<b>Reverse</b>	5'-AAACGCCGGGGGCGCAGCCCCGGACC-3'

#### 6.3.4. Análisis de modificaciones en el genoma

##### *Purificación de DNA genómico*

Para la purificación de DNA genómico, se partió de un mínimo de  $1 \times 10^5$  células, las cuales fueron cosechadas, centrifugadas y resuspendidas en 100  $\mu$ l de Buffer de Lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20) suplementado con 10  $\mu$ g/ml de proteinasa K (Fermentas). Las muestras se incubaron 1h a 65°C, luego se les agregó 600  $\mu$ l de isopropanol y se centrifugaron a 12000 xg durante 15 minutos. Se realizó un lavado con etanol 70% y se resuspendió el DNA genómico obtenido en 30  $\mu$ l de agua miliQ (H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub>). Las muestras obtenidas se incubaron a 65°C durante 1 h para favorecer la disolución del DNA, y luego fueron conservadas a -20°C.

##### *PCR a punto final*

Para realizar las reacciones de PCR a punto final se utilizó la enzima DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, y una termocicladora *Peltier Thermal Cycler DNA* (BioRad). La temperatura de *annealing* se ajustó para cada par de *primers* utilizados. Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8 a 2%, según el tamaño de los productos.

## 6.4. Análisis de expresión de mRNA

### 6.4.1. Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total a partir de células en cultivo, utilizamos el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se cosecharon mediante tripsinización o por *scrapping* con 500  $\mu$ l de TRIzol, y fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o utilizadas en el momento para la extracción del RNA. El RNA obtenido fue cuantificado con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 6.4.2. Retro-transcripción (RT)

Para realizar la Retro-transcripción del RNA obtenido, se utilizó la enzima transcriptasa reversa MMLV (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante, y utilizando hexámeros al azar de DNA (*random primers*) como primers para la reacción. Se partió de 1-3  $\mu$ g de RNA total en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las muestras de cDNA obtenidas fueron diluídas 1/10 - 1/20 en  $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$  y fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 6.4.3. PCR en tiempo real

Para cuantificar la expresión de mRNA específicos en las distintas condiciones experimentales, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real a partir de cDNA (RT-qPCR), utilizando el kit *SYBR Green Master Mix* (Roche) y la termocicladora *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizaron dos réplicas técnicas por cada muestra y un control negativo sin muestra por cada par de primers utilizado. Los datos fueron analizados con el software LinReg (Ruijter *et al.*, 2009), a partir del cual se obtuvieron las eficiencias de la reacción de PCR para cada

par de *primers* y, con esta información, se calcularon los niveles teóricos iniciales de cDNA ( $N_0$ ) para cada condición. Se utilizó el gen GAPDH como normalizador (*housekeeping*) en todos los experimentos.

#### 6.4.4. *Primers* utilizados

A continuación se detallan los primers utilizados en este trabajo de tesis, algunos de los cuales fueron diseñados por nuestro laboratorio a través del software Geneious, el cual utiliza a la tecnología de Primer3 (Kearse *et al.*, 2012). La especificidad de los mismos fue verificada mediante la herramienta *Primer Blast* de NCBI.

<b>Dnmt3A</b>	Forward	TGTGGGAGCCTCAATGTCAC
	Reverse	CCTGCAGCAGTTGTTGTTCC
<b>Fgf5</b>	Forward	CTTCTGCCTCCTCACCAGTC
	Reverse	TCTGCAGATGGAAACCGATG
<b>Klf4</b>	Forward	TACCCTCCTTTCCTGCCAGA
	Reverse	TTTGCCACAGCCTGCATAGT
<b>Nanog</b>	Forward	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG
	Reverse	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
<b>Otx2</b>	Forward	ACCCGGTACCCAGACATCTT
	Reverse	TTCTTGGCAGGCCTCACTTT
<b>Myst4</b>	Forward	CGGCCAATGAGATTTACCGA
	Reverse	CCAACCAGATGACAGCCTTT
<b>Gapdh</b>	Forward	TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG
<b>Pgk1</b>	Forward	TGGGCAAGGATGTTCTGTTC
	Reverse	TGCAGTCCCAAAGCATCAT
<b>Gata6</b>	Forward	GCAATGCATGCGGTCTCTAC
	Reverse	CTCTTGGTAGCACCAGCTCA
<b>Tubb3</b>	Forward	GCCATTCTGGTGGACTTGGGA
	Reverse	CCAGCACCCTCTGACCAAA
<b>Sox1</b>	Forward	ATGCACAACCTCGGAGATCAG
	Reverse	ACTTGTCTTCTTGAGCAGC
<b>Essrb</b>	Forward	GTTTAGCTTTGCTCGCCTGG
	Reverse	GGTTTCTCCGCAAACACCAC
<b>Oct4</b>	Forward	TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG

	Reverse	TGACGGGAACAGAGGGAAAG
<b>Brachyury</b>	Forward	GACTTCGTGACGGCTGACAA
	Reverse	CGAGTCTGGGTGGATGTAG
<b>Nestina</b>	Forward	CTGCAGGCCACTGAAAAGTT
	Reverse	GACCCTGCTTCTCCTGCTC
<b>Blbp</b>	Forward	GGGTAAGACCCGAGTTCCTC
	Reverse	ATCACCACTTTGCCACCTTC

## 6.5. Análisis de niveles proteicos

### 6.5.1. Inmunofluorescencia

Para los análisis de inmunofluorescencia, las células fueron cultivadas en placas *Lab-Tek chamber slides* (Nunc) tratadas previamente con PDL-Laminina para favorecer la adhesión. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 minutos a TA, luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se permeabilizaron con 0,1% PBS-Triton X-100. El bloqueo se realizó con una solución de 10% suero normal de burro en PBS-Tween 0.1% (PBST). Los anticuerpos primarios fueron incubados en solución de bloqueo a 4°C ON y luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST. Los anticuerpos secundarios fueron incubados junto con DAPI en solución de bloqueo por 1 h a TA. Luego de 3 lavados se montaron las muestras con 5 µl de 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 y se tomaron las imágenes de fluorescencia en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX71. Las imágenes fueron procesadas utilizando el *software FIJI Is Just ImageJ (FIJI)* como se describe a continuación.

### *Procesamiento de imágenes utilizando FIJI*

Las imágenes fueron procesadas para la cuantificación de la fluorescencia específica mediante el *software FIJI* (Schindelin *et al.*, 2012). Este programa proviene del *software ImageJ* con el agregado de *plugins* específicos para diversos usos en biología molecular. En primer lugar, se generó un *stack* de todas las imágenes de un mismo anticuerpo y de una misma réplica, para realizar todo el procesamiento de la misma manera. A continuación se detalla un Macro con todo el procedimiento realizado.

```
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");
run("Subtract Background...", "rolling=200 sliding");
run("Median...", "radius=2");
setAutoThreshold("Yen dark");
//run("Threshold...");
//setThreshold(2, 255);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity display exclude clear add");
run("Measure");
```

En síntesis, se realizó la sustracción del ruido de fondo o *background*, luego se generó una máscara binaria para la selección de las regiones de interés (en este caso, el núcleo de las células donde se encuentra la señal), y luego se cuantificó la fluorescencia en esas regiones. Se realizaron 3 réplicas biológicas, y los resultados se mostraron como el promedio de la cuantificación de 10 imágenes, con alrededor de 40 células por imagen, por cada réplica biológica.

### **6.5.2. Western blot**

Para el ensayo de Western blot, las células fueron cosechadas y se colectaron las muestras proteicas utilizando el Buffer RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5 % Desoxicolato

de Sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas *Complete Mini EDTA-free* (Roche). Las muestras fueron resueltas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y luego transferidas a membranas de PVDF (Amersham), siguiendo protocolos convencionales (Mahmood y Yang, 2012). Dado que la proteína *Myst4* tiene un tamaño de aproximadamente 250 kDa, se utilizó un gel separador con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida de 8%, y se corrió durante 4 h. Se realizó el bloqueo de las membranas con PBST-BSA 0,1% durante 1 h a TA y luego se incubaron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo a 4°C ON. Luego de realizar 3 lavados en PBST, se incubaron los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo durante 1 h a TA. Las membranas fueron reveladas utilizando *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Amersham) en un equipo *G-Box System* (Syngene).

### 6.5.3. Anticuerpos utilizados

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

Nombre	Empresa y catálogo	Dilución para Western Blot	Dilución para Inmunofluorescencia
<b>MORF</b>	Santa Cruz sc-5720	1:500	1:200
<b>Nanog</b>	Santa Cruz sc-376915	-	1:100
<b>Oct4</b>	Santa Cruz sc-5279	-	1:200
<b>Sox2</b>	Santa Cruz sc-17320	-	1:200
<b>Ki67</b>		-	1:300
<b>Gapdh</b>	Santa Cruz sc-32233	1:500	-
<b>anti-mouse-Cy3</b>		-	1:500
<b>anti-rabbit-Cy2</b>		-	1:500
<b>anti-goat-488</b>	Invitrogen A11055	-	1:500
<b>anti-mouse-HRP</b>	Millipore AP124P	1:3000	-
<b>anti-goat-HRP</b>	Santa Cruz sc-2020	1:3000	-



## 6.6. Análisis de Proliferación y Ciclo Celular

### 6.6.1. Análisis de distribución del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio

Para analizar la distribución de fases del ciclo celular, las células fueron cosechadas y fijadas en etanol 70% ON. Al día siguiente, las células fueron re-hidratadas en PBS durante 15 minutos y luego resuspendidas en *Staining Buffer* (100 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40) agregando yoduro de propidio (Sigma) 25 µg/ml concentración final y RNAsa A (QIAGEN) a una concentración final de 60 µg/ml. Se incubaron durante 30 minutos y luego se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron los citómetros FACS-Aria y el BD-Accuri C6, todos de BD Biosciences. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJO, estableciendo umbrales para excluir células muertas y “dobletes”.

### 6.6.2. Ensayo de masa celular Cristal Violeta

Para el ensayo de cristal violeta, las células se fijaron con metanol por 10 minutos a -20°C. Luego se realizó la tinción con 0,5% Cristal Violeta en metanol durante 10 minutos a TA. Se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O destilada y se dejó secar por 15 minutos. Posteriormente se agregó una solución de ácido acético al 10% y se incubó 15 minutos a TA. Se trasvasaron las muestras a una placa de 96 wells con base plana transparente (Nunc) y se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas Optima Fluostar. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas por cada condición.

### **6.6.3. Ensayo de viabilidad MTT**

Para el ensayo de viabilidad MTT, se agregó MTT 5 mg/ml al medio de cultivo de las células y se incubó en estufa por 30 minutos. Luego se lavó con PBS y se incubó por 15 minutos con 200  $\mu$ l de isopropanol. Se trasvasaron las muestras a una placa de 96 wells con base plana transparente (Nunc) y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas Optima Fluostar. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas por cada condición.

### **6.6.4. Ensayo de proliferación por incorporación de EdU**

Para el ensayo de proliferación por incorporación de EdU, se utilizó el kit *Click-iT<sup>®</sup> EdU Flow Cytometry Assay Kit* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se analizó el porcentaje de células positivas para EdU, las cuales se encontraban en fase S del ciclo celular, mediante citometría de flujo utilizando un citómetro BD-Accuri C6 (BD Biosciences).

## **6.7. Análisis estadísticos**

Los resultados experimentales son presentados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) para al menos tres réplicas biológicas. Según el diseño experimental, la significancia estadística entre grupos fue analizada mediante ANOVA en bloques aleatorizados. Para ambos casos, se analizó la normalidad en las distribuciones de las variables mediante el test de Shapiro Wilks modificado. En el caso del ANOVA, se analizó además la homocedasticidad a través de la prueba de Levene y se realizaron comparaciones entre los grupos utilizando el test de Tukey, en los casos que fuera necesario. Consideramos las diferencias entre grupos como estadísticamente significativas cuando el P valor fue  $\leq$  a 0,05. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (JA di Rienzo *et al.*, 2013).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abdelalim, E. M. (2013) "Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells", *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(6), pp. 764–773. doi: 10.1007/s12015-013-9469-9.

Abranches, E. *et al.* (2009) "Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: A road map to neurogenesis in the embryo", *PLoS ONE*, 4(7). doi: 10.1371/journal.pone.0006286.

Ali, M. *et al.* (2012) "Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin.", *Journal of molecular biology*. Elsevier B.V., 424(5), pp. 328–38. doi: 10.1016/j.jmb.2012.10.004.

Ali, T., Renkawitz, R. y Bartkuhn, M. (2016) "Insulators and domains of gene expression", *Current Opinion in Genetics and Development*, 37, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.gde.2015.11.009.

Ang, Y.-S. *et al.* (2011) "Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network", *Cell*, 145(2), pp. 183–197. doi: 10.2217/ahe.11.91.Anxiety.

Avior, Y., Sagi, I. y Benvenisty, N. (2016) "Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(3), pp. 170–182. doi: 10.1038/nrm.2015.27.

Barberi, T. *et al.* (2003) "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice", *Nature Biotechnology*, 21(10), pp. 1200–1207. doi: 10.1038/nbt870.

Bernstein, B. E. *et al.* (2006) "A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells", *Cell*, 125, pp. 315–326. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041.

Bevan, M., Lane, M. y Cb, C. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucleic Acids Research*, 12(22), pp. 1513–1523. doi: 10.1093/nar/gkn907.

Boroviak, T. *et al.* (2014) "The ability of inner cell mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired upon epiblast specification", *Nature cell biol.*, 16(6), pp. 516–528. doi: 10.1038/ncb2965.The.

Boward, B., Wu, T. y Dalton, S. (2016) "Control of cell fate through cell cycle and

- pluripotency networks”, *Stem Cells*, (FEBRUARY), p. n/a-n/a. doi: 10.1002/stem.2345.
- Boyer, L. *et al.* (2005) “Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells”, *Cell*, 122(6), pp. 947–956. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.Core.
- Boyer, L. A. *et al.* (2006) “Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells”, *Nature*, 441(7091), pp. 349–353. doi: 10.1038/nature04733.
- Bradley, A. *et al.* (1984) “Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines”, *Nature*, 309(5965), pp. 255–256. doi: 10.1038/309255a0.
- Brons, I. G. M. *et al.* (2007) “Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos.”, *Nature*, 448(7150), pp. 191–195. doi: 10.1038/nature05950.
- Brown, C. D. *et al.* (2010) “A Comprehensive Map of Insulator Elements for the Drosophila Genome”, 6(1). doi: 10.1371/journal.pgen.1000814.
- Bulger, M. y Groudine, M. (2011) “Review Functional and Mechanistic Diversity of Distal Transcription Enhancers”, *Cell*. Elsevier Inc., 144(3), pp. 327–339. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.024.
- Burdon, T. *et al.* (1999) “Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells”, *Developmental Biology*, 210(1), pp. 30–43. doi: 10.1006/dbio.1999.9265.
- Campeau, P. M. *et al.* (2012) “Mutations in KAT6B, encoding a histone acetyltransferase, cause genitopatellar syndrome”, *American Journal of Human Genetics*, 90(2), pp. 282–289. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.11.023.
- Cedar, H. y Bergman, Y. (2009) “Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms”, *Nature Reviews Genetics*, 10(5), pp. 295–304. doi: 10.1038/nrg2540.
- Chambers, I. *et al.* (2007) “Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development”, *Nature*, 450(7173), pp. 1230–1234. doi: 10.1038/nature06403.
- Champagne, N. *et al.* (1999) “Identification of a Human Histone Acetyltransferase Related to Monocytic Leukemia Zinc Finger Protein”, *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), pp. 28528–28536. doi: 10.1074/jbc.274.40.28528.
- Chapuy, B., McKeown, M. y Lin, C. (2013) “Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma”, *Cancer Cell*, 24(6), pp. 777–790. doi: 10.1016/j.ccr.2013.11.003.Discovery.
- Chen, X. *et al.* (2008) “Integration of External Signaling Pathways with the Core

Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells”, *Cell*, 133(6), pp. 1106–1117. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.043.

Chen, Y. *et al.* (2004) “A constitutive super-enhancer: Homologous region 3 of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), pp. 1039–1044. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.136.

Christian, M. *et al.* (2010) “Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases”, *Genetics*, 186(2), pp. 756–761. doi: 10.1534/genetics.110.120717.

Christodoulou, C. *et al.* (2011) “Mouse ES and iPS cells can form similar definitive endoderm despite differences in imprinted genes”, *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp. 2313–2325. doi: 10.1172/JCI43853.

Clayton-Smith, J. *et al.* (2011) “Whole-exome-sequencing identifies mutations in histone acetyltransferase gene KAT6B in individuals with the say-barber-biesecker variant of Ohdo syndrome”, *American Journal of Human Genetics*. The American Society of Human Genetics, 89(5), pp. 675–681. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.10.008.

Cloonan, N. *et al.* (2008) “Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing”, *Nature Methods*, 5(7), pp. 613–619. doi: 10.1038/nmeth.1223.

Cohen, D. E. y Melton, D. (2011) “Turning straw into gold: Directing cell fate for regenerative medicine”, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 243–252. doi: 10.1038/nrg2938.

Costelloe, T. *et al.* (2013) “The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodelers promote DNA end resection”, 489(7417), pp. 581–584. doi: 10.1038/nature11353.The.

Desbaillets, I. *et al.* (2000) “Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis.”, *Experimental physiology*, 85(6), pp. 645–651. doi: 10.1263/jbb.103.389.

Dixon, J. R. *et al.* (2012) “Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions”, *Nature*. Nature Publishing Group, 485(7398), pp. 376–380. doi: 10.1038/nature11082.

Doiguchi, M. *et al.* (2016) “SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(February), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep20179.

Evans, M. J. y Kaufman, M. H. (1981) “Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos”, *Nature*, 292(5819), pp. 154–156.

Fleming, T. P. *et al.* (1984) “Trophectodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst.”, *Journal of embryology and experimental morphology*, 84(1), pp. 63–90. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6533258>.

Fouse, S. D. *et al.* (2008) "Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, Polycomb binding and histone H3 lys4/lys27 trimethylation", *Cell stem cell*, 2(2), pp. 160–169. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.017. Development.

Gaspar-Maia, A. *et al.* (2011) "Open chromatin in pluripotency and reprogramming", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 36–47. doi: 10.1038/nrm3036.

Gibson, W. T. *et al.* (2012) "Mutations in EZH2 cause weaver syndrome", *American Journal of Human Genetics*, 90(1), pp. 110–118. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.11.018.

Han, J. W. y Yoon, Y.-S. (2011) "Induced pluripotent stem cells: emerging techniques for nuclear reprogramming.", *Antioxidants & redox signaling*, 15(7), pp. 1799–1820. doi: 10.1089/ars.2010.3814.

Han, S. S. W., Williams, L. A. y Eggan, K. C. (2011) "Constructing and Deconstructing Stem Cell Models of Neurological Disease", *Neuron*. Elsevier Inc., 70(4), pp. 626–644. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.003.

Hanna, J. *et al.* (2008) "Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency", *Cell*. 2008/04/22, 133(2), pp. 250–264. doi: S0092-8674(08)00447-9 [pii] 10.1016/j.cell.2008.03.028.

Harikumar, A. y Meshorer, E. (2015) "Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells", *EMBO Rep*, in press(12), pp. 1609–1619. doi: 10.15252/embr.201541011.

Hay, D. *et al.* (2016) "Genetic dissection of the  $\alpha$ -globin super-enhancer in vivo", *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 48(8), pp. 895–903. doi: 10.1038/ng.3605.

Hayashi, K. *et al.* (2008) "Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states", 3(4). doi: 10.1016/j.stem.2008.07.027. Dynamic.

He, W. *et al.* (2013) "KAT5 and KAT6B are in positive regulation on cell proliferation of prostate cancer through PI3K-AKT signaling.", *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(12), pp. 2864–2871. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3843266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Heckman, L. D. ean, Chahrour, M. H. y Zoghbi, H. Y. (2014) "Rett-causing mutations reveal two domains critical for MeCP2 function and for toxicity in MECP2 duplication syndrome mice", *eLife*, 3, pp. 1–17. doi: 10.7554/eLife.02676.

Hindley, C. y Philpott, A. (2013) "The cell cycle and pluripotency.", *The Biochemical journal*, 451(2), pp. 135–43. doi: 10.1042/BJ20121627.

Hirai, H., Karian, P. y Kikyo, N. (2011) "Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor.", *The Biochemical journal*, 438(1), pp. 11–23. doi: 10.1042/BJ20102152.

Hiyama, E. y Hiyama, K. (2007) "Telomere and telomerase in stem cells.", *British journal of cancer*, 96(7), pp. 1020–4. doi: 10.1038/sj.bjc.6603671.

Hnisz, D. y Abraham, B. J. (2014) "Transcriptional super-enhancers connected to cell identity and disease", 155(4). doi: 10.1016/j.cell.2013.09.053.Transcriptional.

Van Houdt, J. K. J. *et al.* (2012) "Heterozygous missense mutations in SMARCA2 cause Nicolaides-Baraitser syndrome", *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 44(4), pp. 445–449. doi: 10.1038/ng.1105.

Howe, L. *et al.* (2001) "Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression", *Genes & Development*, 15, pp. 3144–3154. doi: 10.1101/gad.931401.that.

Ivanova, N. *et al.* (2006) "Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference", *Nature*, 442(7102), pp. 533–538. doi: 10.1038/nature04915.

JA di Rienzo *et al.* (2013) "Infostat - Software estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina", *Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*.

Ji, X. *et al.* (2016) "3D Chromosome Regulatory Landscape of Human Pluripotent Cells", *Stem Cell*. Elsevier Inc., (18), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.stem.2015.11.007.

Kearse, M. *et al.* (2012) "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data", *Bioinformatics*, 28(12), pp. 1647–1649.

Keller, G. (2005) "Embryonic stem cell differentiation : emergence of a new era in biology and medicine", pp. 1129–1155. doi: 10.1101/gad.1303605.).

Keller, G. M. (1995) "In vitro differentiation of embryonic stem cells", *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), pp. 862–869. doi: 10.1016/0955-0674(95)80071-9.

Khazaei, M., Ahuja, C. S. y Fehlings, M. G. (2017) "Induced Pluripotent Stem Cells for Traumatic Spinal Cord Injury", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(January), pp. 1–9. doi: 10.3389/fcell.2016.00152.

Kim, J. B. *et al.* (2008) "Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors", *Nature*. 2008/07/03, 454(7204), pp. 646–650. doi: nature07061 [pii] 10.1038/nature07061.

Kolodziejczyk, A. A. *et al.* (2015) “Single Cell RNA-Sequencing of Pluripotent States Unlocks Modular Transcriptional Variation”, *Cell Stem Cell*, 17(4), pp. 471–485. doi: 10.1016/j.stem.2015.09.011.

Kurosawa, H. (2007) “Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells”, *J Biosci Bioeng*, 103(5), pp. 389–398. doi: 10.1263/jbb.103.389.

“Lentiviral Biosafety Manual” (2010).

“Lentiviral Vectors Biosafety Guidance & Safety Protocol for Research with Lentiviral Vectors” (2009).

“Lentiviral Vectors Information and Biosafety Considerations” (2000) *Human Gene Therapy*, 11(Figure 1), pp. 2159–2192.

Levine, M. (2010) “Transcriptional enhancers in animal development and evolution”, *Current Biology*. Elsevier Ltd, 20(17), pp. R754–R763. doi: 10.1016/j.cub.2010.06.070.

Li, L. *et al.* (2014) “Synergistic transcriptional and post-transcriptional regulation of ESC characteristics by core pluripotency transcription factors in protein-protein interaction networks”, *PLoS ONE*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0105180.

Li, M., Liu, G.-H. y Izpisua Belmonte, J. C. (2012) “Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells.”, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(8), pp. 524–35. doi: 10.1038/nrm3393.

Liao, J. *et al.* (2009) “Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells”, *Cell Stem Cell*. 2008/12/23, 4(1), pp. 11–15. doi: S1934-5909(08)00615-2 [pii] 10.1016/j.stem.2008.11.013.

Liu, H. *et al.* (2008) “Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts”, *Cell Stem Cell*. 2008/12/02, 3(6), pp. 587–590. doi: S1934-5909(08)00537-7 [pii] 10.1016/j.stem.2008.10.014.

Loh, Y. H. *et al.* (2006) “The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells”, *Nature Genetics*, 38(4), pp. 431–440. doi: 10.1038/ng1760.

Long, H. K., Prescott, S. L. y Wysocka, J. (2016) “Ever-Changing Landscapes: Transcriptional Enhancers in Development and Evolution”, *Cell*. Elsevier, 167(5), pp. 1170–1187. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.018.

Lovén, J. *et al.* (2013) “Selective Inhibition of Tumor Oncogenes by Disruption of Super-Enhancers”, *Cell*, 153(2), pp. 320–334. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.036.



Mahla, R. S. (2016) "Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics", *International Journal of Cell Biology*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/6940283.

Mahmood, T. y Yang, P.-C. (2012) "Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting", *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), pp. 429–434.

Martin, G. R. (1981) "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Acad Sciences, 78(12), pp. 7634–7638.

Matsuda, K. *et al.* (2017) "ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network", *Development*, 144(11), pp. 1948–1958. doi: 10.1242/dev.143479.

McGraw, C., Samaco, R. y Zoghbi, H. (2012) "Adult neural function requires MeCP2", 333(6039), pp. 2011–2013. doi: 10.1126/science.1206593.Adult.

Medvedev, S. P., Pokushalov, E. a y Zakian, S. M. (2012) "Epigenetics of pluripotent cells.", *Acta naturae*, 4(4), pp. 28–46. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3548172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Merson, T. D. *et al.* (2006) "The Transcriptional Coactivator Querkopf Controls Adult Neurogenesis", *Journal of Neuroscience*, 26(44), pp. 11359–11370. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2247-06.2006.

Meshorer, E. y Misteli, T. (2006) "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), pp. 540–546. doi: 10.1038/nrm1938.

Miller, C. T. (2004) "moz regulates Hox expression and pharyngeal segmental identity in zebrafish", *Development*, 131(10), pp. 2443–2461. doi: 10.1242/dev.01134.

Murati, A. *et al.* (2004) "Variant MYST4-CBP gene fusion in a t(10;16) acute myeloid leukaemia", *British Journal of Haematology*, 125(5), pp. 601–604. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04960.x.

Murry, C. E. y Keller, G. (2008) "Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development", pp. 661–680. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.008.

Muzaffar, A. *et al.* (2012) "Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin",

*Journal of Molecular Biology*, 424(5), pp. 328–338. doi: 10.1021/ja8019214.Optimization.

Najm, F. J. *et al.* (2011) “Isolation of epiblast stem cells from pre-implantation mouse embryos”, *Cell stem cell*, 8(3), pp. 318–325. doi: 10.1016/j.stem.2011.01.016.Isolation.

Nichols, J. y Gardner, R. L. (1984) “Heterogeneous differentiation of external cells in individual isolated early mouse inner cell masses in culture.”, *Journal of embryology and experimental morphology*, 80, pp. 225–40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6747527>.

Nichols, J. y Smith, A. (2009) “Naive and primed pluripotent states.”, *Cell stem cell*. Elsevier Inc., 4(6), pp. 487–92. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.015.

Niwa, H. (2007) “How is pluripotency determined and maintained?”, *Development*, 134(4), pp. 635–646. doi: 10.1242/dev.02787.

Ohtsuka, S. y Dalton, S. (2008) “Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells.”, *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 15(2), pp. 74–81.

Ong, C. y Corces, V. G. (2011) “Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression”, *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 284–293. doi: 10.1038/nrg2957.

Ouyang, Z., Zhou, Q. y Wong, W. H. (2009) “ChIP-Seq of transcription factors predicts absolute and differential gene expression in embryonic stem cells.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), pp. 21521–6. doi: 10.1073/pnas.0904863106.

Pelletier, N. *et al.* (2002) “MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2”, *Oncogene*, 21(17), pp. 2729–2740. doi: 10.1038/sj.onc.1205367.

Petrij, F. *et al.* (1955) “Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP”, *Nature*, 376, pp. 348–351.

Pombo, A. y Dillon, N. (2015) “Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms.”, *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 16(4), pp. 245–257. doi: 10.1038/nrm3965.

Ran, F. A. *et al.* (2013) “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system”, *Nature protocols*, 8(11), pp. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.Genome.

Rokudai, S. *et al.* (2009) “Monocytic leukemia zinc finger (MOZ) interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest”, *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), pp. 237–244. doi: 10.1074/jbc.M805101200.

Rowbotham, S. P. *et al.* (2011) "Maintenance of Silent Chromatin through Replication Requires SWI/SNF-like Chromatin Remodeler SMARCD1", *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 42(3), pp. 285–296. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.036.

Ruijter, J. M. *et al.* (2009) "Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data", *Nucleic Acids Research*, 37(6). doi: 10.1093/nar/gkp045.

Saiz, N. y Plusa, B. (2013) "Early cell fate decisions in the mouse embryo", *Reproduction*, 145(3), pp. R65–R80. doi: 10.1530/REP-12-0381.

Sambrook, J. y W Russell, D. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, p. 999.

Sánchez Alvarado, A. y Yamanaka, S. (2014) "Rethinking Differentiation: Stem Cells, Regeneration, and Plasticity", *Cell*, 157(1), pp. 110–119. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.041.

Sander, J., Dahlborg, E. y Goodwin, M. (2010) "Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA)", *Nature ...*, 8(1), pp. 67–69. doi: 10.1038/nmeth.1542.Selection-Free.

Sanulli, S. *et al.* (2015) "Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation", *Molecular Cell*, 57(5), pp. 769–783. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.020.

Schindelin, J. *et al.* (2012) "Fiji: An open-source platform for biological-image analysis", *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.

Scott, E. K., Lee, T. y Luo, L. (2001) "Enok encodes a Drosophila putative histone acetyltransferase required for mushroom body neuroblast proliferation", *Current Biology*, 11(2), pp. 99–104. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00020-3.

Semple, B. D. *et al.* (2013) "Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species", *Progress in Neurobiology*, (0), pp. 1–16. doi: 10.1007/s10955-011-0269-9.Quantifying.

Sene, K. *et al.* (2007) "Gene function in early mouse embryonic stem cell differentiation", *BMC Genomics*, 8, pp. 1–21. doi: 10.1186/1471-2164-8-85.

Sharov, A. A. *et al.* (2008) "Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data", *BMC Genomics*, 9, pp. 1–19. doi: 10.1186/1471-2164-9-269.

Siller, R. *et al.* (2013) "Modelling Human Disease with Pluripotent Stem Cells", *Current Gene Therapy*, 13(2), pp. 99–110. doi: 10.2174/1566523211313020004.

Simo-Riudalbas, L. *et al.* (2015) "KAT6B Is a Tumor Suppressor Histone H3 Lysine 23 Acetyltransferase Undergoing Genomic Loss in Small Cell Lung Cancer", *Cancer Research*, 75(18), pp. 3936–3945. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3702.

Smith, A. G. *et al.* (1988) "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides", *Nature*, 336(6200), pp. 688–690. doi: 10.1038/336688a0.

Smith, R. y McLaren, A. (1977) "Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele.", *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 41(1), pp. 79–92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/591880>.

Stadtfeld, M., Brennand, K. y Hochedlinger, K. (2008) "Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells", *Curr Biol.* 2008/05/27, 18(12), pp. 890–894. doi: S0960-9822(08)00607-6 [pii] 10.1016/j.cub.2008.05.010.

Stead, E. *et al.* (2002) "Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities", *Oncogene*. 2002/11/26, 21(54), pp. 8320–8333. doi: 10.1038/sj.onc.1206015.

Szakszon, K. *et al.* (2013) "De novo mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase KAT6B in two patients with Say-Barber/Biesecker/Young-Simpson syndrome", *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 161(4), pp. 884–888. doi: 10.1002/ajmg.a.35848.

Takahashi, K. *et al.* (2007) "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors", *Cell*, 131(5), pp. 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006) "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*. 2006/08/15, 126(4), pp. 663–676. doi: S0092-8674(06)00976-7 [pii] 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tam, P. P. L. y Behringer, R. R. (1997) "Mouse gastrulation: The formation of a mammalian body plan", *Mechanisms of Development*, 68(1–2), pp. 3–25. doi: 10.1016/S0925-4773(97)00123-8.

Tarkowski, A. K. y Wróblewska, J. (1967) "Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage.", *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 18(1), pp. 155–180.

Tatton-Brown, K. *et al.* (2017) "Mutations in Epigenetic Regulation Genes Are a Major Cause of Overgrowth with Intellectual Disability", *American Journal of Human Genetics*. ElsevierCompany., 100(5), pp. 725–736. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.03.010.

Terns, R. M. y Terns, M. P. (2014) "CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed", *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 30(3), pp. 111–118. doi:

10.1016/j.tig.2014.01.003.

Thomas, T. *et al.* (2000) “Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development.”, *Development (Cambridge, England)*, 127(12), pp. 2537–2548.

Thomas, T. *et al.* (2006) “Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells”, pp. 1175–1186. doi: 10.1101/gad.1382606.lineages.

Thomson, M. *et al.* (2011) “Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers”, *Cell*. Elsevier Inc., 145(6), pp. 875–889. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.017.

Tsurusaki, Y. *et al.* (2012) “Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome”, *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 44(4), pp. 376–378. doi: 10.1038/ng.2219.

Ullah, M. *et al.* (2008) “Molecular Architecture of Quartet MOZ/MORF Histone Acetyltransferase Complexes”, *Molecular and Cellular Biology*, 28(22), pp. 6828–6843. doi: 10.1128/MCB.01297-08.

Varilly, P. y Chandler, D. (2012) “From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin”, v(2), pp. 265–275. doi: 10.1007/s10955-011-0269-9.Quantifying.

Walker, E. *et al.* (2007) “Prediction and Testing of Novel Transcriptional Networks Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Commitment”, *Cell Stem Cell*, 1(1), pp. 71–86. doi: 10.1016/j.stem.2007.04.002.

Wamstad, J. A. *et al.* (2012) “Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage”, *Cell*. Elsevier Inc., 151(1), pp. 206–220. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.035.

Wang, J. *et al.* (2010) “CBP Histone Acetyltransferase Activity Regulates Embryonic Neural Differentiation in the Normal and Rubinstein-Taybi Syndrome Brain”, *Developmental Cell*, 18(1), pp. 114–125. doi: 10.1016/j.devcel.2009.10.023.

Wei, L. *et al.* (2017) “Stem cell transplantation therapy for multifaceted therapeutic benefits after stroke”, *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 157, pp. 49–78. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.03.003.

Wei, Y. *et al.* (2016) “SEA: a super-enhancer archive”, *Nucleic acids research*, 44(D1), pp. D172-9.

Whyte, W. A. *et al.* (2013) “Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes”, *Cell*. Elsevier Inc., 153(2), pp. 307–319. doi:

10.1016/j.cell.2013.03.035.

Williams, E. O. *et al.* (2016) "Sirtuin 1 Promotes Deacetylation of Oct4 and Maintenance of Naive Pluripotency", *Cell Reports*. Elsevier Company., 17(3), pp. 809–820. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.046.

Williams, R. L. *et al.* (1988) "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.", *Nature*, 336(6200), pp. 684–687. doi: 10.1038/336684a0.

Williams, S. R. *et al.* (2010) "Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems", *American Journal of Human Genetics*. The American Society of Human Genetics, 87(2), pp. 219–228. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.07.011.

Wood, A. J. *et al.* (2012) "Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs", 333(6040), pp. 3–6. doi: 10.1126/science.1207773.Targeted.

Wray, J. *et al.* (2011) "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation", *Nature Cell Biology*, 13(7), pp. 838–845. doi: 10.1038/ncb2267.

Xiao, S. *et al.* (2017) "SMARCAD1 contributes to regulation of naïve pluripotency by interacting with histone citrullination", *Cell reports*, 18(13), pp. 3117–3128. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.070.SMARCAD1.

Yang, X.-J. y Ullah, M. (2007) "MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells", *Oncogene*, 26(37), pp. 5408–5419. doi: 10.1038/sj.onc.1210609.

Ying, Q.-L. *et al.* (2008) "The ground state of embryonic stem cell self-renewal.", *Nature*, 453(7194), pp. 519–23. doi: 10.1038/nature06968.

Ying, Q.-L. y Smith, A. (2003) "Defined Conditions for Neural Commitment", *Methods in Enzymology*, 365(23), pp. 327–341.

Ying, Q. L. *et al.* (2003) "Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture", *Nature Biotechnology*, 21(2), pp. 183–186. doi: 10.1038/nbt780.

Yu, J. *et al.* (2007) "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.", *Science (New York, N.Y.)*, pp. 1917–20. doi: 10.1126/science.1151526.

Zabidi, M. A. y Stark, A. (2016) "Regulatory Enhancer–Core–Promoter Communication via Transcription Factors and Cofactors", *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 32(12), pp. 801–814. doi: 10.1016/j.tig.2016.10.003.

Zhang, F. *et al.* (2011) “Programmable Sequence-Specific Transcriptional Regulation of Mammalian Genome Using Designer TAL Effectors”, *Nature Biotechnology*, 29(2), pp. 149–153. doi: 10.1038/nbt.1775.Programmable.

Zhang, Z. *et al.* (2011) “PRC2 Complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES Cells to Modulate ES Cell Pluripotency and Somatic Cell Reprograming”, *Stem Cells*, 29(2), pp. 229–240. doi: 10.1002/stem.578.

Zhu, Z. y Huangfu, D. (2013) “Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology”, *Development*, 140(4), pp. 705–717. doi: 10.1242/dev.086165.